

Cholinesterase

Butyrylthiocholine. Kinetic

Quantitative determination of cholinesterase (CHE) in serum and plasma IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

The method uses butyrylthiocholine as the specific substrate for cholinesterase (CHE). Cholinesterase catalyses the hydrolysis of butyrylthiocholine substrate forming butyrate and thiocholine. Thiocholine reduces hexacyanoferrate (III) to hexacyanoferrate (II). The decrease in absorbance is directly proportional to CHE activity in the sample^{7,8,9}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Cholinesterase is an enzyme present in plasma and synthesized by the liver. Its true physiological function is unknown, so its function may be to hydrolyze choline in plasma. Cholinesterase activity is usually measured for liver function, is a sensitive test of exposure to pesticides organophosphorus and identification of patients with the atypical form of enzyme whose presents high sensitivity to succinyl-choline^{1,5,6}. Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

R 1	Pyrophosphate pH 7,6	92 mmol/L
Buffer	Hexacyanoferrate (III)	2,5 mmol/L
R 2	Butyrylthiocholine	91 mmol/L
Substrate		

PREPARATION

Reagents are ready to use.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Stability: 30 days at 2-8°C after opening, if contamination avoided.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 405 nm.
- Thermostatic bath at 37°C (± 0,1°C)
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES^{1,2,3,4,5}

Fresh serum, plasma (EDTA heparin) not haemolyzed and promptly separated from the red blood cells. Do not use sodium fluoride as an anticoagulant because it inhibits cholinesterase. Stability: 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 405 nm
Cuvette: 1 cm light path
Temperature: 37°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette ^(Note 1):

	Reagent blank	Calibrator / Sample
Reagent 1 (µL)	1000	1000
Distilled water (µL)	20	--
Calibrator / Sample (µL)	--	20

4. Mix and incubate for 5 minutes.

5. Add:

Reagent 2 (µL)	200	200
----------------	-----	-----

6. Mix carefully and read the absorbance A_1 after 90 seconds and read the second absorbance A_2 after other 90 seconds.

7. Calculate: $\Delta A = A_1 - A_2$.

CALCULATIONS

$$\text{CHE Activity} = \frac{\Delta A \text{ Sample} - \Delta A \text{ Blank}}{\Delta A \text{ Calibrator} - \Delta A \text{ Blank}} \times \text{Calibrator conc.} = \text{U/L}$$

Units: One international unit (IU) is the amount of enzyme that transforms 1 µmol of substrate per minute, in standard conditions. The concentration is expressed in units per litre of sample (U/L).

Conversion factor:

$$\text{CHE (U/L)} \times 0,001 = \text{CHE (KU/L)}$$

$$\text{CHE (U/L)} \times 0,01667 = \text{CHE (ukat/L)}$$

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and technique for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES

Adults (37°C) Male: 5100-11700 U/L

Female: 4000-12600 U/L

In infants up to 6 months of age, cholinesterase activity is 40% to 50% higher than in adults. In young women, the enzyme activity is approximately 64% to 74% of that in adult males. The activity decreases during pregnancy.

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 150 U/L to linearity limit of 22000 U/L.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/10 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 10.

Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	Mean (mg/L)	SD	CV (%)	
Mean (mg/L)	7122	5182	6966	5060
SD	127,1	67,9	168,9	110,6
CV (%)	1,78	1,31	2,42	2,19

Sensitivity: 1 U/L = -0,000013 (A)

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained were the following:

Correlation coefficient (r)²: 0,998.

Regression equation: $y = 1,11 x + 384,58$.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

The test is not affected by the presence of ascorbic acid up to 20 mg/dL, haemoglobin up to 1000 mg/dL, bilirubin up to 60 mg/dL and lipids up to 1000 mg/dL.

NOTES

- In order to avoid contamination it is recommended to use disposable material.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

- NCCLS Document: "Procedures for the Collection of Arterial Blood Specimens; Approved Standard - Third Edition (1999)".
- Kaplan, L.A., Pesce, A.J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).
- EU-Dir 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.
- Jakobs, D.S., Kasten, B.L., Demmott, W.R., Wolfson, W.L.: "Laboratory Test Handbook", Lexi-Comp and Williams & Wilkins Ed. (2nd Edition - 1990).
- Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Proposal of Standard Methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C. II Cholinesterase (acylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). Eur.J.Clin.Chem.Clin. Biochem 30,163 (1992).

PACKAGING

Ref: 41210

Cont.

R1: 1x100 mL R2: 1x20 mL

Determinación cuantitativa de colinesterasa (CHE) en suero y plasma IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Método utiliza butiriltiocolina como sustrato específico para colinesterasa (CHE). La Colinesterasa cataliza la hidrólisis del sustrato de butiriltiocolina formando butirato y tiocolina. La tiocolina reduce el hexacianoferrato. La disminución en absorbancia es directamente proporcional a la actividad de CHE en la muestra^{7,8,9}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La colinesterasa es un enzima presente en el plasma y sintetizado por el hígado. Su verdadera función fisiológica se desconoce, por lo que su función sería hidrolizar colina en plasma. La actividad de la colinesterasa está regulada por la función del hígado, es una prueba sensitiva de la exposición de pesticidas organofosforos e identificación de pacientes con una forma atípica de la enzima que presenta una sensibilidad alta a la succinil-colina^{1,5,6}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Pirofosfato pH 7.6	92 mmol/L
Tampón	Hexacianoferrato (III)	2,5 mmol/L
R 2	Butiriltiocolina	91 mmol/L
Substrato		

PREPARACIÓN

Los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación durante el uso.

No utilice reactivos fuera de la fecha indicada.

Estabilidad: 30 días a 2-8°C una vez abierto, si se evita la contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o colorímetro para mediciones a 405 nm.
- Baño termostático a 37°C (± 0,1°C)
- Cubetas de paso de luz de 1,0 cm.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS^{1,2,3,4,5}

Suero fresco, plasma (EDTA heparina) no hemolizado y separado rápidamente de los glóbulos rojos. No utilizar fluoruro de sodio como anticoagulante porque inhibe la colinesterasa. Estabilidad: 7 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones de la prueba:
Longitud de onda:405 nm
Cubeta: paso de luz de 1 cm
Temperatura:37°C
- Ajustar a cero el instrumento con agua destilada.
- Pipetear en una cubeta ^(Nota 1).

	Blanco de reactivo	Calibrador/Muestra
Reactivo 1 (µL)	1000	1000
Agua destilada (µL)	20	--
Calibrador/Muestra (µL)	--	20

- Mezclar e incubar durante 5 minutos.
- Añadir:

	200	200
Reactivo 2 (µL)		

- Mezclar con cuidado y leer la absorbancia A₁ a los 90 segundos y efectuar una segunda lectura A₂ después de los próximos 90 segundos.
- Calcular: ΔA=A₁-A₂.

CÁLCULOS

$$\text{Actividad CHE} = \frac{\Delta A \text{ Muestra} - \Delta A \text{ Blanco}}{\Delta A \text{ Calibrador} - \Delta A \text{ Blanco}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{U/L}$$

Unidades: Una unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 µmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factor de conversión:

$$\text{CHE (U/L)} \times 0,001 = \text{CHE (KU/L)}$$

$$\text{CHE (U/L)} \times 0,01667 = \text{CHE (ukat/L)}$$

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda monitorizar el rendimiento de los procedimientos de la prueba: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores de control están fuera del rango definido, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio deberá disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Adultos (37°C)	Hombres:	5100-11700 U/L
	Mujeres:	4000-12600 U/L

En niños menores de 6 meses, la actividad de la colinesterasa es del 40% al 50% mayor que en adultos. En mujeres jóvenes, la actividad de la enzima es de un 64% al 74% mayor que en hombres adultos. La actividad disminuye durante el embarazo.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 150 U/L hasta el límite de linealidad de 22000 U/L.

Si los resultados obtenidos fuesen mayores que el límite de linealidad, diluir 1/10 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado por 10.

Precisión:

Media (mg/L)	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	7122	5182	6966	5060
SD	127,1	67,9	168,9	110,6
CV (%)	1,78	1,31	2,42	2,19

Sensibilidad: 1 U/L = -0,000013 (A)

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,998.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,11 x + 384,58.

Las características del método varían según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con ácido ascórbico hasta 20 mg/dL, hemoglobina hasta 1000 mg/dL, bilirrubina hasta 60 mg/dL y lípidos hasta 1000 mg/dL.

NOTAS

- Para evitar contaminación se recomienda utilizar material desechable.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFÍA

- NCCLS Document: "Procedures for the Collection of Arterial Blood Specimens; Approved Standard - Third Edition (1999)".
- Kaplan, L.A., Pesce, A.J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).
- EU-Dir 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.
- Jakobs, D.S., Kasten, Jr., B.L., Demmott, W.R., Wolfson, W.L.: "Laboratory Test Handbook", Lexi-Comp and Williams & Wilkins Ed. (2nd Edition - 1990).
- Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Proposal of Standard Methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C. II Cholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). Eur.J.Clin.Chem.Clin. Biochem 30,163 (1992).

PRESENTACIÓN

Ref: 41210

Cont.

R1: 1x100 mL R2: 1x20 mL

Détermination quantitative de cholinestérase (CHE) en sérum et plasma IVD

Conserver à 2 - 8°C.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

La méthode utilise de la butyrylthiocholine comme substrat spécifique pour la cholinestérase (CHE). La Cholinestérase catalyse l'hydrolyse du substrat de butyrylthiocholine en formant du butyrate et de la thiocholine. La thiocholine réduit l'hexacyanoferrate. La diminution dans l'absorption est directement proportionnelle à l'activité de CHE dans l'échantillon^{7,8,9}.

SIGNIFICATION CLINIQUE

La cholinestérase est une enzyme présente dans le plasma, synthétisée par le foie. Sa véritable fonction physiologique est méconnue, sa fonction serait donc d'hydrolyser la choline dans le plasma. L'activité de la cholinestérase est régulée par la fonction du foie, c'est une preuve sensitive de l'exposition des pesticide organophosphorés et de l'identification des patients avec une forme atypique de l'enzyme qui présente une sensibilité élevée à la succinylcholine^{1,5,6}.

Le diagnostic clinique doit être réalisé en prenant en compte toutes les données cliniques et de laboratoire.

RÉACTIFS

R 1	Pyrophosphate pH 7.6	92 mmol/L
Tampon	Hexacyanoferrate (III)	2,5 mmol/L
R 2	Butyrylthiocholine	91 mmol/L
Substrat		

PRÉPARATION

Les réactifs sont prêts à être utilisés.

CONSERVATION ET STABILITÉ

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette, quand ils sont gardés bien fermés à 2-8°C, à l'abri de la lumière et que leur contamination est évitée pendant l'utilisation.

Ne pas utiliser des réactifs qui ont dépassé la date d'expiration.

Stabilité : 30 jours à 2-8°C une fois ouvert, si la contamination est évitée.

Indicateurs de détérioration des réactifs :

- La présence de particules et de turbidité.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

- Spectrophotomètre ou colorimètre analyseur pour mesures à 405 nm.
- Bain thermostatique à 37°C (± 0,1°C)
- Cuvettes de passage de lumière à 1,0 cm.
- Équipement habituel de laboratoire.

ÉCHANTILLONS^{1,2,3,4,5}

Sérum frais, plasma (EDTA héparine) non hémolysé et rapidement séparé des globules rouges. Ne pas utiliser de sodium comme anticoagulant car il inhibe la cholinestérase. Stabilité: 7 jours à 2-8°C ou 3 mois à -20°C.

PROCÉDURE

- Conditions du test
Longueur d'onde: 405 nm
Cuvette: passage de lumière à 1 cm
Température: 37°C
- Régler à zéro l'instrument avec de l'eau distillée.
- Introduire la pipette dans une cuvette ^(Note 1):

	Blanc de réactif	Calibreur / Échantillon
Réactif 1 (µL)	1000	1000
Eau distillée (µL)	20	--
Calibreur/Échantillon (µL)	--	20

4. Mélanger et incuber pendant 5 minutes.

5. Ajouter :

Réactif 2 (µL)	200	200
----------------	-----	-----

6. Mélanger soigneusement et lire l'absorption A₁ à 90 secondes et réaliser une deuxième lecture A₂ après les 90 secondes suivantes.

7. Calculer : $\Delta A = A_1 - A_2$.

CALCULS

$$\text{Activité CHE} = \frac{(\Delta A) \text{ Échantillon} - (\Delta A) \text{ Blanc}}{(\Delta A) \text{ Étalon} - (\Delta A) \text{ Blanc}} \times \text{Conc. Calibreur} = \text{U/L}$$

Unités: Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme qui transforme 1 µmol de substrat par minute, en conditions standards. La concentration est exprimée en unité par litre (U/L).

Facteur de conversion:

$$\text{CHE (U/L)} \times 0,001 = \text{CHE (KU/L)}$$

$$\text{CHE (U/L)} \times 0,01667 = \text{CHE (ukat/L)}$$

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé de suivre le rendement des procédures du test : SPINTROL H Normal et Pathologique (Réf. 1002120 y 1002210).

Si les valeurs de contrôle sont en dehors de la gamme de tolérance, vérifier s'il y a des problèmes avec l'instrument, les réactifs et la technique.

Chaque laboratoire doit établir son propre Contrôle de Qualité et des corrections en cas de non-conformité des contrôles en termes de tolérances exigées.

VALEURS DE RÉFÉRENCE

Adultes (37°C)	Hommes:	5100-11700 U/L
	Femmes:	4000-12600 U/L

Chez les enfants âgés de moins de 6 mois, l'activité de la cholinestérase est de 40% au 50% plus élevée que chez les adultes. Chez les jeunes femmes, l'activité de la cholinestérase est de 64% au 74% plus élevée que chez les adultes. L'activité diminue pendant la grossesse.

Ces valeurs sont à titre indicatif. Il est conseillé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

Gamme de mesure : Depuis la limite de détection de 150 U/L jusqu'à la limite de linéarité de 22000 U/L.

Si les résultats obtenus étaient supérieurs à la limite de linéarité, diluer 1/10 avec NaCl 9 g/L et multiplier le résultat final par 10.

Précision :

	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
Moyenne (mg/L)	7122	5182	6966	5060
SD	127,1	67,9	168,9	110,6
CV (%)	1,78	1,31	2,42	2,19

Sensibilité: 1 U/L = -0,000013 (A)

Exactitude: Les réactifs SPINREACT (y) ne montrent pas de différences systématiques significatives quand ils sont comparés à d'autres réactifs commerciaux (x).

Les résultats obtenus étaient les suivants:

Coefficient de corrélation (r)² : 0,998.

Equation de la droite de régression: $y = 1,11x + 384,58$.

Les résultats des caractéristiques de la méthode dépendent de l'analyseur utilisé.

INTERFERENCES

Aucune interférence n'a été observée avec de l'acide ascorbique jusqu'à 20 mg/dL, hémoglobine jusqu'à 1000 mg/dL, bilirubine jusqu'à 60 mg/dL et lipides jusqu'à 1000 mg/dL.

REMARQUES

- Pour éviter la contamination il est conseillé d'utiliser un matériel jetable.
- SPINREACT dispose d'instructions détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.**

BIBLIOGRAPHIE

- NCCLS Document: "Procedures for the Collection of Arterial Blood Specimens; Approved Standard - Third Edition (1999)".
- Kaplan, L.A., Pesce, A.J.: "Clinical Chemistry", Mosby Ed. (1996).
- EU-Dir 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of Good Laboratory Practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.
- Jakobs, D.S., Kasten, Jr., B.L., Demmott, W.R., Wolfson, W.L.: "Laboratory Test Handbook", Lexi-Comp and Williams & Wilkins Ed. (2nd Edition - 1990).
- Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie. Proposal of Standard Methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37°C. II Cholinesterase (acylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.8). Eur.J.Clin.Chem.Clin. Biochem 30,163 (1992).

PRÉSENTATION

Réf. : 41210

Cont.

R1 : 1x100 mL R2 : 1x20 mL