

EVALUACION DE UN METODO PARA LA DETERMINACION DE COLINESTERASA

Las colinesterasas, enzimas de origen hepático distribuidas en diversos tejidos, así como en plasma y glóbulos rojos, intervienen en la conducción de estímulos nerviosos. La determinación de su actividad tiene importancia en una variedad de situaciones clínicas y particularmente en los casos de intoxicaciones con insecticidas de uso corriente en la actualidad. En el presente trabajo se evalúan los parámetros de precisión, exactitud y linealidad para un método de ensayo cinético automatizable de determinación de colinesterasa sérica.

Tallano, Carina; Capriotti, Gustavo - Depto Investigación y Desarrollo - Centro de Investigación y Biotecnología - Wiener Laboratorios S.A.I.C. - Rosario - Argentina.

Introducción

Las colinesterasas son un grupo de enzimas de origen hepático capaces de hidrolizar los ésteres de colina para producir ácido y colina libre.

El descubrimiento de que la colinesterasa en plasma difiere de la colinesterasa de los glóbulos rojos causó cierta confusión en la terminología. Actualmente se utiliza para la de los glóbulos rojos el término acetilcolinesterasa.

Las colinesterasas son ubicuas y presentes en la mayoría de los tejidos. Si bien su función biológica no se encuentra completamente caracterizada, se sabe que están relacionadas con la transmisión de los impulsos eléctricos en la placa neuromuscular. La ausencia de la enzima, conduciría a la acumulación de

acetil colina en las terminaciones neuromusculares impidiendo los cambios de polarización de las membranas y la conducción de impulsos. La colinesterasa de los glóbulos rojos o acetilcolinesterasa hidroliza específicamente la acetilcolina, mientras que la plasmática puede hidrolizar también otros ésteres, como la butiriltiocolina, utilizada como sustrato para la determinación de su actividad "in vitro".

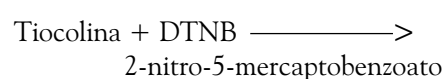
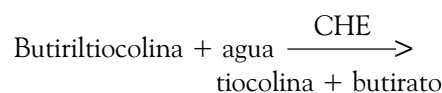
La colinesterasa plasmática no tiene un rol fisiológico determinado aunque se ha visto que contribuye a prevenir excesos de acetilcolina evitando que alcance niveles indeseables en el organismo.

Los niveles de colinesterasa no se encuentran afectados por condiciones como factores dietarios, sexo, ciclo menstrual o embarazo. Se observan au-

mentos sólo ocasionalmente y en general en procesos que estimulan la síntesis o involucran destrucción celular. Por ejemplo una producción incrementada de glóbulos rojos llevará a un aumento de la colinesterasa ya que el eritrocito joven es muy rico en la enzima. Niveles disminuidos de la enzima pueden estar relacionados con anomalías en la síntesis, provocada por una enfermedad adquirida o un desorden congénito. Sin embargo muy frecuentemente son un reflejo de la presencia de sustancias específicas como ciertos insecticidas organofosforados que inhiben la acción de la enzima. En este caso, la determinación de colinesterasa plasmática es esencial para el diagnóstico. Existen diversos métodos para la determinación de la actividad de colinesterasa plasmática basados en distintos principios de reacción. En el presente trabajo se informan los resultados de la evaluación de un método cinético para uso en analizadores automáticos, con sustrato butiriltiocolina y lectura a 405 nm (Colinesterasa AA Wiener lab.). Se llevaron a cabo ensayos para comprobar su comportamiento que incluyeron: precisión, linealidad, y exactitud.

Materiales y Métodos

El método en ensayo se basa en el siguiente esquema de reacción:



Por acción de la colinesterasa plasmá-

tica (CHE), la butiriltiocolina se escinde liberando tiocolina y butirato. La tiocolina liberada reacciona posteriormente con el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) para dar lugar a la formación de 2-nitro-5-mercaptobenzoato, que tiene un máximo de absorción a 405 nm.

La actividad de CHE se determina midiendo la velocidad de aumento de absorbancia de este compuesto.

Muestra: se utilizaron muestras de sueros y plasmas heparinizados con valores de actividad de CHE baja, media y alta. También se utilizaron sueros control (Standatrol S-E Wiener lab.) con concentraciones normales y altas de la enzima.

Instrumental: se utilizó un analizador Express plus.

Resultados

Precisión intra-ensayo:

Se ensayaron por duplicado sueros control con actividades normales y altas de CHE. Se corrieron dos veces cada uno a lo largo de 20 días sucesivos, utilizando el kit en ensayo.

Aplicados los protocolos de evaluación de precisión propuestos por el NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards), a estos datos se obtienen los resultados de las tablas I y II.

Los resultados se muestran en la tabla III y gráfico 1.

Exactitud:

Para determinar la exactitud clínica del método se realizó un estudio de correlación utilizando 47 sueros, 30 plasmas heparinizados y 23 plasmas obtenidos con EDTA, con actividades baja, media y alta, abarcando un rango entre 1730 U/l y 14375 U/l. Los resultados obtenidos con el kit en ensayo se compararon con los obtenidos con el kit Sigma Diagnostics de similar principio de reacción.

Los ensayos se llevaron a cabo en un analizador Express plus.

Los resultados pueden observarse en el gráfico 2.

Discusión y conclusiones

Se denominan compuestos organofosforados (COF) a aquellas sustancias orgánicas derivadas de la estructura química del fósforo.

Se han utilizado como fármacos en el tratamiento de enfermedades como miastenia gravis, glaucoma, algunos tumores y enfermedad de Alzheimer. En la industria como aditivos del petróleo, en la preparación de barnices, colorantes, cuero artificial, impermeabilizantes, ignífugos etc.. A pesar

Tabla I: precisión intra-ensayo

Muestra	Nivel	D.S.	C.V.
Suero: nivel normal	4820 U/l	± 55 U/l	1,14 %
Suero: nivel alto	8852 U/l	± 86 U/l	0,97 %

Tabla II: precisión total

Muestra	Nivel	D.S.	C.V.
Suero: nivel normal	4820 U/l	± 97 U/l	2,00 %
Suero: nivel alto	8852 U/l	± 174 U/l	1,97 %

Linealidad:

Para demostrar la linealidad del producto se determina la actividad de CHE en 5 soluciones con actividades comprendidas entre 1383 U/l y 17359 U/l, por cuadruplicado.

de que su uso como arma química fue prohibido por los organismos internacionales en 1930, se sabe que algunos países lo siguen utilizando con ese fin. Sin embargo, el uso más relevante de estos compuestos es en la agricultura



Agenda de Cursos

✓ **Curso de especialista en endocrinología ginecológica y reproductiva para bioquímicos**

Organiza

Sociedad Argentina de Endocrinología ginecológica y reproductiva

Directores

**Dra. Marta Cortelezzi;
Dra. Damasia Becu**

Dirigido a

bioquímicos, biólogos y químicos con orientación biológica

Curso Teórico - Práctico

Duración: 2 años

Módulos

- . Bases moleculares de la endocrinología ginecológica y reproductiva
- . Métodos diagnósticos: ensayos hormonales y biomoleculares
- Psiconeuroinmunoendocrinología
 - . Prolactina - Tiroides
 - . Eje gonadal - Pubertad
 - . Evaluación clínica y bioquímica de las disfunciones menstruales
 - . Infertilidad y aborto recurrente
 - . Testículo - Estudio del semen
 - . Evaluación hormonal y del metabolismo fosfocálcico en la menopausia
 - . Estados hiperandrogénicos
 - . Embarazo normal y patológico

Lugar

Auditorio Schering, Blanco Encalada 1391 Cap. Fed.

**Informes e Inscripción
Secretaría SAEGRE - Charcas
2589 3° B - 1425 Cap. Fed.
Tel / Fax 4821-2606
E-mail saegre@pure.com.ar**

como insecticida. En la actualidad los COF son los plaguicidas empleados con mayor frecuencia en todo el mundo, por ello son tan frecuentes las intoxicaciones.

Tras la exposición a un COF, éste o sus metabolitos se unen mediante su radical fosfórico al lugar esterásico de la CHE, produciendo una inactivación de la misma, con la consiguiente sobreestimulación colinérgica que será lo que dominará el cuadro. Dependiendo de la gravedad puede observarse desde un cuadro leve de vómitos, miosis y sialorrea, hasta uno grave con depresión de consciencia y parálisis respiratoria.

La determinación de los niveles de CHE es la prueba de laboratorio de mayor valor para confirmar el diagnóstico de una intoxicación aguda por COF. En casos de intoxicación severa, la sensibilidad de la prueba es prácticamente del 100%. Se han correlacionado los valores muy bajos de la CHE con la gravedad de la intoxicación aguda. En intoxicaciones leves no se ha demostrado tal correlación, y la CHE sólo tendría un valor diagnóstico pero no pronóstico.

El método propuesto en este estudio para la determinación de CHE utiliza 10 µl de muestra con un tiempo total de reacción de 3 minutos. La lectura se efectúa

Tabla III: linealidad

Actividad de colinesterasa	Replicado 1 (U/l)	Replicado 2 (U/l)	Replicado 3 (U/l)	Replicado 4 (U/l)
1	1399	1440	1383	1528
2	5219	5503	5077	5230
3	9366	9280	9399	9432
4	13613	13312	13534	13304
5	17264	17359	17200	17406

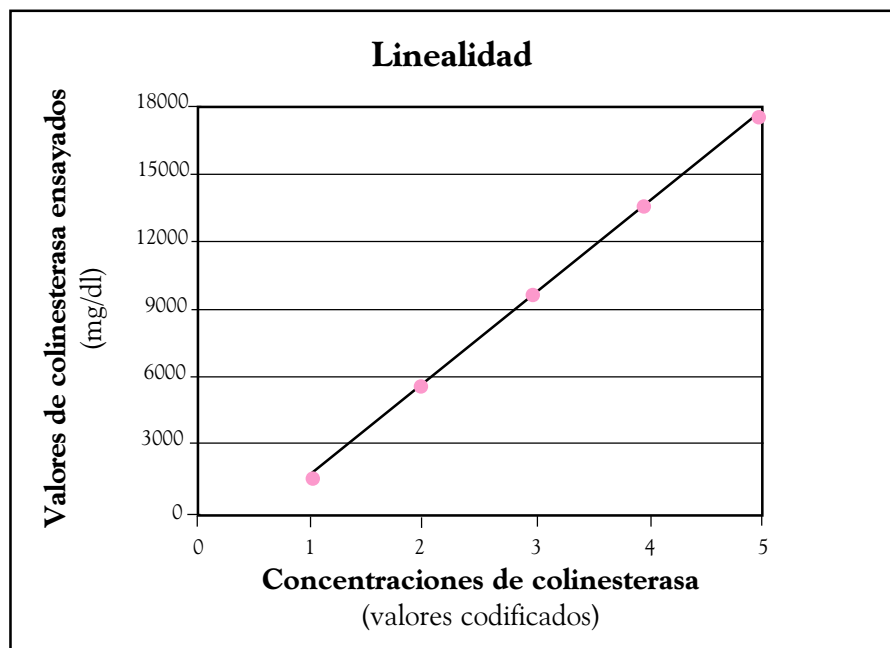


Gráfico 1

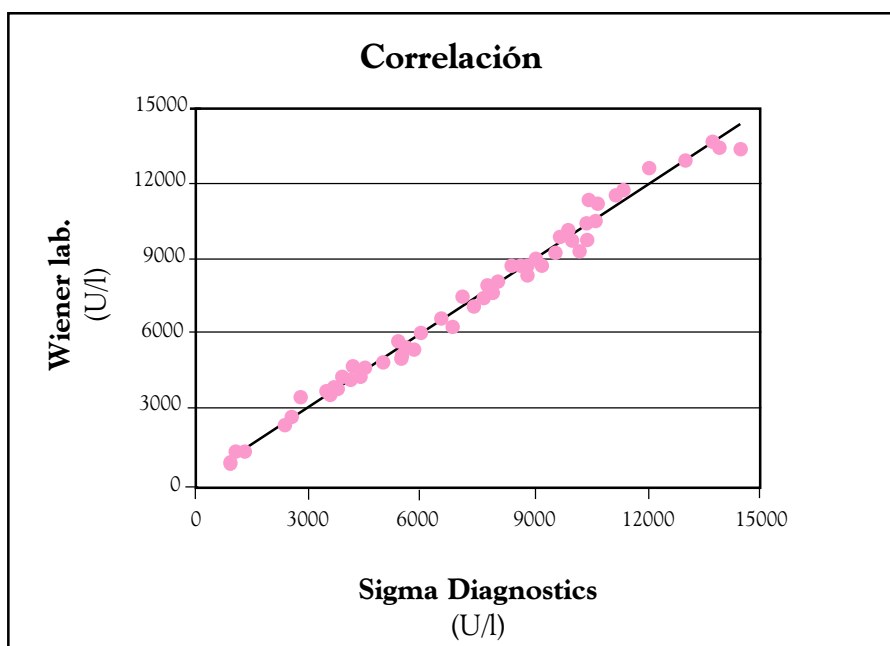


Gráfico 2

túa a 405 nm en forma automática. La exactitud obtenida, determinada por el ensayo de correlación con un método de similares características mostró un coeficiente de correlación $r = 0.996$, con una ecuación de correlación $y = -56 + 1.013x$.

En el análisis de precisión se obtuvo una desviación standard (DS) de ± 55 U/l y un coeficiente de variación (CV) de 1,14 % para los niveles normales de suero y DS = ± 86 U/l con CV = 0,97% para niveles altos.

La reacción es lineal entre 1383 U/l y 17359 U/l abarcando el rango clínicamente significativo.

En conclusión, el método presentado reúne las características de performance necesarias para su uso en la clínica.



Se detalla a continuación una serie de ensayos realizados en un hospital de la ciudad de Rosario, Argentina, para estudiar el comportamiento del kit Sífilis ELISA recombinante Wiener lab.

El método en ensayo se basa en la determinación de anticuerpos específicos existentes en la muestra por reacción con antígenos recombinantes de *Treponema pallidum* inmovilizados sobre un soporte. El volumen de muestra es de 10 ul. La lectura de los resultados se realiza a 450 nm (primaria) / 620 nm (secundaria). La reacción se efectúa a temperatura ambiente y $37 \pm 2^\circ\text{C}$ según los pasos. El tiempo total de reacción es variable ya que puede utilizarse una técnica con reveladores separados o con reveladores premezclados. En el primer caso, 90 ± 2 minutos y en el segundo 70 ± 2 minutos. El color desarrollado debe leerse dentro de los 30 minutos. En el presente ensayo se estudió el comportamiento de este kit con muestras provenientes del laboratorio del Hospital Carrasco de la ciudad de Rosario, que concentra las muestras para detección de sífilis de pacientes ambulatorios y análisis prenupciales.

Con el fin de tener una medida de la Sensibilidad del kit se procesaron 42 muestras que habían resultado reactivas para VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), para TPHA (*Treponema pallidum* Hemagglutination Assay) o ambas, así como 4 controles de reactividad conocida.

Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, empleando la técnica con reveladores separados.

Los resultados se observan en la Figura I. De las 42 muestras, 35 resultaron reactivas para ELISA y TPHA (método de referencia).

Se observaron dos resultados ELISA reactivos con índices de positividad (IP) 1,4 y 2,1 respectivamente, no coincidentes con TPHA no reactivas. Las dos muestras fueron probadas nuevamente

EVALUACION DE UN METODO ELISA PARA LA DETECCION DE SIFILIS

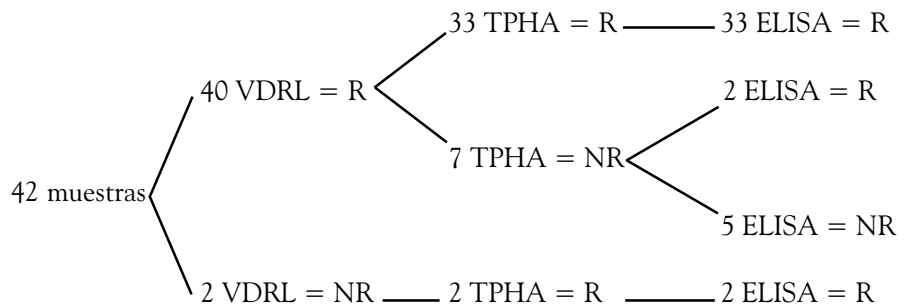
Dra. Cristina Pellicanó, Bioquímica, Jefe de Laboratorio Hospital I. Carrasco, Rosario, Argentina; Cecilia Maximino, Bioquímica, Laboratorio Hospital Carrasco, Rosario, Argentina.

por duplicado utilizando un método TPHA dando resultados no reactivo y reactivo débil o dudoso respectivamente. Estas muestras no fueron reensayadas por ELISA.

- De las 135 muestras de suero, 13 resultaron reactivas para ELISA. De estas últimas muestras, 11 fueron confirmadas con TPHA.

Los IP de las dos muestras discordan-

Figura I



R = Reactivo; NR = No Reactivo

Para tener una medida de la Especificidad del kit, se efectuó un ensayo sobre 138 muestras (135 sueros provenientes de pacientes ambulatorios y ensayos prenupciales y 3 de líquidos cefalorraquídeo: LCR). Todas las muestras fueron ensayadas con método VDRL y ELISA.

Las muestras reactivas para ELISA fueron ensayadas también con TPHA.

Los resultados obtenidos se observan en la Figura II.

- Las muestras de LCR resultaron no reactivas para VDRL y ELISA.

tes fueron 1,2 y 1,6 respectivamente. De estas dos muestras una (IP = 1,2) fue ensayada nuevamente por ELISA dando resultado no reactivo. La otra muestra (IP = 1,6) no pudo ser ensayada nuevamente por ELISA.

Conclusiones

En la comparación con el método de TPHA usado como referencia se observa una buena sensibilidad y especificidad, con mejores resultados repitiendo la prueba de ELISA en los niveles cercanos a la zona de indeterminación.

Figura II

