

# Cholinesterase - Dibucaine

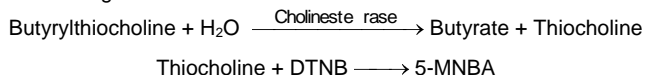
Ancillary reagent. Dibucaine inhibition

## Quantitative determination of cholinesterase with dibucaine inhibition IVD

Store at 2-8°C

### PRINCIPLE OF THE METHOD

Butyrylthiocholine kinetic method using dibucaine as inhibitor. Cholinesterase hydrolysed butyrylthiocholine to butyrate and thiocholine. Thiocholine reacts with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) to form 5-mercapto-2-nitrobenzoic acid (5-MNBA), according the following reactions:



The rate of 5-MNBA formation, measured photometrically, is proportional to the enzymatic activity of cholinesterase in the sample<sup>1,2</sup>.

### 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 succinylcholine.

The dibucaine percent inhibition is determined in addition to total activity cholinesterase to detect the presence of an abnormal genetic variant of cholinesterase<sup>1,5,6</sup>.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

### REAGENTS

CHOLINESTERASE Ref: 1001100		
<b>R 1</b> Buffer	Phosphate pH 7.7	50 mmol/L
<b>R 2</b> Substrate	5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (5,5 DTNB) Butyrylthiocholine	0.25 mmol/L 7 mmol/L
CHE-DIBUCAINE		
<b>R 3</b> Inhibitor	Dibucain Chlorhidrate	2.6 mmol/L

### PREPARATION

Working reagent (WR):

Dissolve (→) one tablet of R 2 Substrate in one vial of R 1.

Cap vial and mix gently to dissolve contents.

**Inhibition (WR-I):**

Add 300 µL of R 3 Inhibitor to working reagent (WR).

Stability: 2 hours at 2-8°C.

### 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 the tablets if appears broken.

Do not use reagents over the expiration date.

**Signs of reagent deterioration:**

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 405 nm ≥ 0.70.

### ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 405 nm.
- Thermostatic bath at 25°C, 30°C o 37°C (± 0.1°C)
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment (Note 1).

### SAMPLES

Serum or heparinized plasma<sup>1</sup>: Stability 7 days at 2-8°C.

### PROCEDURE

- Assay conditions:  
Wavelength: ..... 405 nm  
Cuvette: ..... 1 cm light path  
Constant temperature ..... 25°C / 30°C / 37°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water or air.
- Pipette into a cuvette:

	25 - 30°C	37°C
Without inhibitor WR (mL)	1.5	1.5
With inhibitor WR-I (mL)	1.5	1.5
Sample (µL)	10	--
Sample diluted 1/2 with NaCl 9 g/L (µL)	--	10

- Mix. Read initial absorbance (A) of the sample, start the stopwatch and read absorbances at 30 seconds intervals thereafter for 1.5 minutes.
- Calculate the difference between absorbances and the average absorbance differences per 30 seconds (ΔA/30 s).

### CALCULATIONS

$$25^{\circ} - 30^{\circ}\text{C} \quad \Delta A / 30 \text{ s} \times 22537^* = \text{U/L}$$

$$37^{\circ}\text{C} \quad \Delta A / 30 \text{ s} \times 45074^* = \text{U/L}$$

* $T_v \times 1000$ ε × LP × Sv	Tv= Total volumen in mL ε DTNB = 13.5 at 405 nm LP= Light path Sv= Sample volum in mL
------------------------------------	--

$$\text{Percent inhibition (\%): } 100 - \frac{\text{Activity with inhibitor (U/L)}}{\text{Activity without inhibitor (U/L)}} \times 100$$

**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).

### QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINTROL 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<sup>1,2</sup>

**Percent inhibition of cholinesterase activity by dibucaine:**

Normal 70-90% Heterozygotes 30-70% Homozygotes 0-20%

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

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Measuring range:** Up to *linearity limit* of 0.250 ΔA/30 s.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

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

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

### INTERFERENCES

Moderate hemolytic will not interfere in the results<sup>1,2</sup>. A list of drugs and other interfering substances with cholinesterase determination has been reported by Young et. al<sup>3,4</sup>.

### NOTES

- Use glass containers only. Inhibitors may be extracted from some plastics.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

### BIBLIOGRAPHY

- King M. Cholinesterase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1108-1111.
- Whittaker M. et al. Comparasion of a Commercially Available Assay System with Two Reference Methods for the Determination of Plasma Cholinesterase Variants. Clin. Chem 1983;(29/10); 1746-1760.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

### PACKAGING

Ref: 1001101

Cont.

R3: 1 x 5 mL

## Colinesterasa - Dibucaina

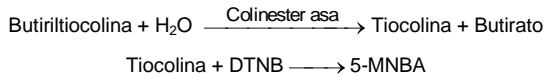
Reactivo auxiliar. Inhibición de la dibucaina

### Determinación cuantitativa de colinesterasa con inhibición de dibucaina IVD

Conservar a 2-8°C

#### PRINCIPIO DEL METODO

Método de butirilcolina cinética usando la dibucaina como inhibidor. La colinesterasa hidroliza la butiriltiocolina a tiocolina y butirato. La tiocolina reacciona con el ácido 5.5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) y forma ácido 5-mercapto-2-nitrobenzoico (5-MNBA), según el siguiente esquema de reacción:



La velocidad de formación de 5-MNBA, determinado fotométricamente, es proporcional a la actividad enzimática de colinesterasa en la muestra ensayada<sup>1,2</sup>.

#### SIGNIFICADO CLINICO

La colinesterasa es una enzima presente en el plasma, sintetizada en el hígado. Su función fisiológica no se conoce claramente, aunque se le atribuye un papel importante como regulador de la concentración de la colina en el plasma. La determinación de su actividad nos ayuda a evaluar la función hepática, detectar la exposición excesiva a pesticidas organofosforados e identificar pacientes con formas atípicas de la enzima que presentan una sensibilidad aumentada al anestésico succinilcolina<sup>1,5,6</sup>. El porcentaje de inhibición de la dibucaina se determina complementariamente a la actividad de la colinesterasa para detectar la presencia de variantes anormales de colinesterasa<sup>1,5,6</sup>. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

#### REACTIVOS

CHOLINESTERASE Ref: 1001100		
<b>R 1</b> Tampón	Fosfato pH 7,7	50 mmol/L
<b>R 2</b> Substrato	Ac. 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (5,5 DTNB) Butiriltiocolina	0,25 mmol/L 7 mmol/L
CHE-DIBUCAINE		
<b>R 3</b> Inhibidor	Clorhidrato de Dibucaina	2,6 mmol/L

#### PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT):  
Disolver (→) un comprimido de R 2 Substrato en un vial de R 1 Tampón. Tapar el vial y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.  
**Inhibición (RT-I):**  
Añadir 300 µL de R 3 Inhibidor al reactivo de trabajo (RT).  
Estabilidad: 2 horas a 2-8°C.

#### CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar las tabletas si aparecen fragmentadas. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.  
**Indicadores de deterioro de los reactivos:**  
- Presencia de partículas y turbidez.  
- Absorbancias (A) del Blanco a 405 ≥ 0,70.

#### MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 405 nm.  
- Baño termostatable a 25°C, 30°C ó 37°C (± 0,1°C)  
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.  
- Equipamiento habitual de laboratorio (Nota 1).

#### MUESTRAS

Suero o plasma heparinizado<sup>1</sup>. Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

#### PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:  
Longitud de onda: ..... 405 nm  
Cubeta: ..... 1 cm paso de luz  
Temperatura constante ..... 25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

	25° - 30°C	37°C
Sin inhibidor RT (mL)	1,5	1,5
Con inhibidor RT-I (mL)	1,5	1,5
Muestra (µL)	10	--
Muestra diluida 1/2 con ClNa 9 g/L (µL)	--	10

- Mezclar. Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada 30 segundos durante 1,5 min.
- Calcular el promedio de la diferencia de absorbancia por intervalo de 30 segundos (ΔA/30 s).

#### CALCULOS

$$25^\circ - 30^\circ\text{C} \quad \Delta A / 30 \text{ s} \times 22537^* = \text{U/L}$$

$$37^\circ\text{C} \quad \Delta A / 30 \text{ s} \times 45074^* = \text{U/L}$$

* Tv x 1000 ε x LP x Sv	Tv= Volumen total en mL ε DTNB = 13.5 a 405 nm LP= Paso de luz Sv= Volumen muestra mL
----------------------------	--

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = 100 - \frac{\text{Actividad con inhibidor (U/L)}}{\text{Actividad sin inhibidor (U/L)}} \times 100$$

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

#### CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

#### VALORES DE REFERENCIA<sup>1,2</sup>

**Porcentaje de inhibición de la actividad de colinesterasa por la dibucaina:**

Normal 70-90% Heterocigotos 30-70% Homocigotos 0-20%

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

#### CARACTERISTICAS DEL METODO

**Rango de medida:** Hasta el límite de linealidad 0.250 ΔA / 30 s. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.  
**Exactitud:** Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x). Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

#### INTERFERENCIAS

Hemólisis moderada no interfiere en los resultados<sup>1,2</sup>. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la colinesterasa<sup>3,4</sup>.

#### NOTAS

- Usar solo material de vidrio. Los inhibidores pueden liberarse de algunos plásticos<sup>1</sup>.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

#### BIBLIOGRAFIA

- King M. Cholinesterase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1108-1111.
- Whittaker M. et al. Comparasion of a Commercially Available Assay System with Two Reference Methods for the Determination of Plasma Cholinesterase Variants. Clin. Chem 1983;(29/10); 1746-1760.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

#### PRESENTACION

Ref:1001101 Cont. R3: 1 x 5 mL