 <p>DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ) PODER JUDICIAL, COSTA RICA</p> <p>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO</p>	<p>PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN NORMADO ESPECIFICO</p> <p>P-DCF-ECT-TOX-007</p>
	<p>VERSION: 03</p> <p>Rige desde: 10/12/2020</p>

<p>Elaborado o modificado por:</p> <p>Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes Perito, Sección Toxicología</p> <p>Dr. Diego Arias Alfaro Jefe, Sección Toxicología</p>	<p>Revisado por Líder Técnico:</p> <p>Dra. María de los Ángeles Sancho Brenes Líder Técnico de Sección/Unidad de Confirmatorios/Plaguicidas</p>
<p>Visto Bueno Encargado de Calidad:</p> <p>Dra. Lilliana Fallas Monge Encargado de Calidad a.i. de la Sección de Toxicología</p>	<p>Aprobado por:</p> <p>Dr. Diego Arias Alfaro Jefe, Sección de Toxicología</p>

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	30/11/2010	12/11/2018	Versión Inicial del Procedimiento		GBA
02	12/11/2018	10/12/2020	Se modificó formato, numeración, alcance, referencias y anexos. Se eliminaron puntos del procedimiento y materiales de la lista. Se incluyeron parámetros de validación y restricciones de linealidad.	019-2018	DAA
03	10/12/2020		Revisión. Cambio control inhibido	011-2020	DAA

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 2 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

1 Objetivo:

Determinar la actividad enzimática de la colinesterasa eritrocítica en muestras de sangre para determinar exposición aguda a plaguicidas inhibidores de colinesterasa.

2 Alcance:

Este procedimiento permite determinar la actividad de la colinesterasa eritrocítica en muestras de sangre anticoaguladas con EDTA, con al menos 4 gramos por decilitro de hemoglobina. Las muestras preservadas con fluoruro no son aptas para el análisis. La muestra no debe presentar coágulos que impidan tomarla con la micropipeta, si esto ocurre la muestra se considera insatisfactoria por coagulación. La muestra es estable por 8 días en refrigeración.

Para la determinación de la actividad de la colinesterasa eritrocítica se debe determinar al mismo tiempo el contenido de hemoglobina de la muestra, ya que la actividad de la enzima debe reportarse por gramo de hemoglobina (UI/g Hb). El reactivo de colinesterasa eritrocítica permite determinaciones lineales de 0 a 1470 UI/g Hb (3.1).

Antes del proceso de validación se pudo demostrar que el uso de cubetas plásticas de volumen reducido (1,5 mL) en el UV/VIS Varian Cary 50 produce señales bajas en la determinación de colinesterasa, por lo que en este equipo se deben utilizar cubetas de 1 cm x 1 cm de paso de luz.

La metodología presenta los siguientes parámetros de validación para hemoglobina y colinesterasa eritrocítica:

Nombre del parámetro de validación	Valor obtenido del parámetro	Criterio de aceptación y rechazo
1. Veracidad determinación de hemoglobina	Sesgo= 8,6%	<13,5 % de sesgo
2. Precisión de la determinación de hemoglobina	CV= 7,8 %	<10 % CV
3. Veracidad en la determinación de colinesterasa eritrocítica	Sesgo= 5,1%	<20 % de sesgo
4. Precisión en la determinación de colinesterasa eritrocítica	CV= 4,8 %	<15 % CV

3 Referencias:

- 3.1** AOAC Official Method 991.10. Cholinesterase Activity in Whole Blood Enzymatic-Spectroscopic Method. Official Method of Analysis of AOAC International. 10th ed. Vol.I, USA, 1999.
- 3.2** Bio-Tec Internacional S.A., Colinesterasa eritrocítica. Folleto instructivo.
- 3.3** Ellman G. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, Vol. 7, 88-95, 1961.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 3 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

- 3.4** George P, Abernethy M. "Improved Ellman Procedure for Erythrocyte Cholinesterase" Clinical Chemistry. Volumen 29/2, 365-368, 1983.
- 3.5** ICSH. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). J Clin Pathol; 49:271-274, 1996.
- 3.6** Jiménez-Díaz M, Schosinsky-Neveermann K. "Valores de referencia de colinesterasa plasmática y eritrocítica en población costarricense. Comparación del desempeño clínico de ambas enzimas". Revista Costarricense de Ciencias Médicas. Volumen 21 No. 3-4, 117-126, 2000.
- 3.7** Miller, James N. y Miller, Jane C. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4Ta Ed., Prentice-Hall con sello autorizado de Pearson Educación, S.A., Impreso en España, 1994.
- 3.8** Procedimiento para la Elaboración de Procedimientos, Departamento de Ciencias Forenses. Organismo de Investigación Judicial (O.I.J.), Versión vigente.
- 3.9** Procedimiento Para la Estimación de incertidumbre de los análisis forenses, Departamento de Ciencias Forenses. Organismo de Investigación Judicial (O.I.J.). Versión vigente.
- 3.10** Saenz G. et al. Normalización de la Metodología Preparación Nacional del Estándar de Calibración y del Hemolizado Control. Rev. Cost. Cienc. Méd.; 5(1): 83-96, 1984.
- 3.11** Validación y estimación de incertidumbre de determinación de colinesterasa eritrocítica. Informes 001-TOX-VAL-(1)-2011, 001-TOX-VAL-(2)-2011 y 001-TOX-INC-(1)-2011.

4 Equipos y Materiales:

4.1 Equipo:

Agitador de tubos de ensayo por inversión (rotatorio).

Baño maría de recirculación a una temperatura de 30° C ± 1° C.

Botella de vidrio ámbar de 1 L.

Botella plástica de 100 mL.

Cabina de bioseguridad clase 2-B2

Cámara de bioseguridad tipo I.

Congelador (<0°C)

Cubetas de poliestireno de 3 mL de 10 x 10 mm de paso de luz nuevas o lavadas.

Dispensador automático de disoluciones de 1 a 10 mL para el reactivo de hemoglobina.

Espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) Varian Cary 50 BIO, para cubeta de 1 cm de paso de luz de sistema óptico de doble haz interno o similar con control de temperatura en la celda.

Etiquetas.

Formulario "Registro de análisis en serie de colinesterasa" versión más reciente.

Formulario "Cálculo de la actividad de Colinesterasa Eritrocítica" Versión más reciente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 4 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

Formulario "Reporte individual de la actividad de colinesterasa eritrocítica" Versión más reciente.

Formulario "Registro de preparación de disoluciones".

Formulario "Registro de uso y control de material de referencia".

Gabacha.

Gradillas para tubos de ensayo de 13 mm.

Guantes desechables, de látex u otro material.

Hoja de cálculo "Hoja cálculo Colinesterasa dmmmm_aa"

Hoja de cálculo: "Gráfico control"

Hoja de cálculo "Datos totales"

Horno de laboratorio, rango 20-240° C ($\pm 10^{\circ}\text{C}$).

Lavadora automática de cristalería.

Lentes de seguridad.

Micropipeta automática de 1 μL a 10 μL con puntas nuevas.

Micropipeta automática de 10 μL a 100 μL con puntas nuevas.

Micropipeta automática de 100 μL a 1000 μL con puntas nuevas.

Microtubos plásticos tipo Eppendorf de 1-2 mL nuevos o lavados.

Pipeta automática de 1 a 10 mL.

Pipeta graduada de vidrio de 10 mL.

Pizetas plásticas de 500 mL.

Probeta de 10 mL, 100 mL y 1000 mL.

Puntas de pipeta automática de 1 a 10 mL

Refrigerador (0 a 10°C).

Tubos de ensayo de vidrio 13 x 100 mm ó 10 x 75 mm nuevos o lavados.

Tubos de extracción de sangre al vacío de 5 o de 7 mL con EDTA (tapón morado similar a Vacutainer). No son reutilizables.

Nota: Lave la cristalería y el material plástico según lo especificado en el PON para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Agua desionizada

Disolución de cloro concentrada, se adquiere comercialmente.

Disolución de hipoclorito de sodio al 0,5 % (Ver Anexo 1).

Disolución madre de metamidofos entre 1000 y 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol. Ver Anexo 1.

Disolución de trabajo de reactivo de color para análisis de colinesterasa eritrocítica

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 5 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

(Ver Anexo 1).

Disolución de trabajo de reactivo de hemoglobina Drabkin (Ver Anexo 1).

Disolución de trabajo de sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica (Ver Anexo 1).

Etanol p.a (70-90%)

Hemolizado control para hemoglobinometría (HiCN) HEMOCIHATA. CIHATA, Universidad de Costa Rica. Denominado hemolizado control de hemoglobina o similar.

Jabón alcalino para lavado de cristalería (Extran® alcalino o similar).

Reactivo de color para análisis de colinesterasa eritrocítica de la casa comercial BIOTEC o similar, concentrado 10 X: 5,5´ ditiobis-2-nitrobenzoato, hemolizante, inhibidor específico de colinesterasa sérica en amortiguador de fosfatos pH 7,6, estable a 2-10° C hasta fecha de expiración indicada en la etiqueta.

Reactivo de hemoglobina Drabkin concentrado Chromatest 50 X o similar. Estable a temperatura indicada en la etiqueta hasta la fecha indicada en la etiqueta.

Sangre control para colinesterasa eritrocítica de nivel normal (dentro de valores de referencia). Denominada sangre control normal para colinesterasa eritrocítica.

Sangre inhibida. Denominada sangre control inhibido para colinesterasa eritrocítica. Ver Anexo 1.

Sangre anticoagulada de donador o banco de sangre.

Sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica de la casa comercial BIOTEC o similar, Ioduro de acetil-tiocolina y estabilizadores. Estable en congelación hasta fecha de expiración indicada en la etiqueta.

6 Condiciones Ambientales:

No.	Condición ambiental	Valor mínimo	Valor máximo	Otras características
1	La preparación de las muestras	temperatura ambiente	temperatura ambiente	Cámara de bioseguridad tipo o Cabina de bioseguridad clase 2-B2

7 Procedimiento:

7.1 Preparación inicial de las muestras:

7.1.1 Utilice gabacha, guantes desechables y lentes de seguridad.

7.1.2 Para la preparación, verificación y conservación de reactivos y materiales críticos, así como de material de referencia y de disoluciones preparadas a partir de CRM refiérase al Procedimiento para el manejo general de casos en la Sección de Toxicología Forense.

7.1.3 Como técnico encargado del análisis, elabore un listado con los objetos que va a analizar y entréguela al encargado de la bodega de indicios para que busque las muestras.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 6 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO	P-DCF-ECT-TOX-007	

7.1.4 Revise, como funcionario encargado del análisis, que los objetos entregados por el encargado de la bodega de indicios correspondan a lo que se solicitó mediante el listado con los objetos que va a analizar.

7.2 Colinesterasa eritrocítica:

7.2.1 Encienda el baño maría de recirculación alrededor de una hora antes de realizar las lecturas.

7.2.2 Saque del congelador la disolución de trabajo de sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica (un microtubo para cada 5 muestras/controles) y colóquelo en el baño a 30° C. Manténgalo en el baño en todo momento. Tome en cuenta que las muestras/controles se montan por duplicado.

7.2.3 Saque de la refrigeradora la disolución de trabajo de reactivo de color para análisis de colinesterasa eritrocítica. Coloque la sangre control normal para CEE y la sangre control inhibido para CEE en el agitador de tubos de ensayo por inversión dentro de la cámara de bioseguridad y espere a que todo alcance temperatura ambiente.

7.2.4 Realice el montaje de las muestras/controles por duplicado en tubos de ensayo limpios, secos y rotulados según el siguiente cuadro:

Rotulación	Control inhibido CEE	Control normal CEE	Muestra incógnita CEE (N° objeto)
Disolución de trabajo de reactivo de color para análisis de CEE	2 mL	2 mL	2 mL
Sangre control normal para CEE	—	5 µL	—
Sangre control inhibido para CEE	5 µL	—	—
Sangre muestra incógnita	—	—	5 µL

7.2.5 Utilice la pipeta automática de 1-10 mL para medir los 2,0 mL de la disolución de trabajo de reactivo de color para análisis de CEE. Utilice la micropipeta de 1 a 10 µL para medir los 5 µL de cada muestra o control.

7.2.6 Tape cada tubo con papel parafilm y homogenice por inversión manual leve.

7.2.7 Deje en reposo a temperatura ambiente al menos por diez minutos para asegurar hemólisis completa.

7.3 Hemoglobina:

7.3.1 Saque de la refrigeradora el hemolizado control de hemoglobina y colóquelo en el agitador de tubos de ensayo por inversión dentro de la cámara de bioseguridad y espere a que alcance temperatura ambiente.

7.3.2 Coloque la botella con dispensador automático que contiene la disolución de trabajo de reactivo de hemoglobina Drabkin en la cámara de bioseguridad.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 7 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

7.3.3 Utilizando el dispensador automático, coloque 5,0 mL de disolución de trabajo de reactivo de hemoglobina Drabkin en dos tubos de ensayo limpios, secos y rotulados por cada muestra/control.

7.3.4 La determinación de hemoglobina también se realiza por duplicado, según el siguiente cuadro:

Rotulación	Control inhibido Hb	Control normal Hb	Control de Hb	Muestra incógnita Hb (Nº objeto)
Disolución de trabajo de reactivo de Hb	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
Sangre control normal para CEE	—	20 µL	—	—
Sangre control inhibido para CEE	20 µL	—	—	—
Hemolizado control de hemoglobina	—	—	20 µL	—
Sangre muestra incógnita	—	—	—	20 µL

7.3.5 Utilice la micropipeta de 10 a 100 µL para medir los 20 µL de sangre de cada muestra/control. Tape cada tubo con papel parafilm y homogenice por inversión manual leve.

7.3.6 Deje en reposo a temperatura ambiente al menos por diez minutos para asegurar hemólisis completa.

7.4 Lecturas en el UV/VIS para colinesterasa eritrocítica.

7.4.1 Transporte los tubos de las muestras/controles preparados anteriormente y llévelos en una gradilla al lugar donde se encuentra el espectrofotómetro. Coloque los tubos dentro del baño a 30°C y espere 5 minutos a que alcancen la temperatura deseada.

7.4.2 Para programar el espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) Varian Cary 50 abra el archivo Condiciones UV. MKN que se encuentra en C:\UV-VIS Varian 50BIO\Colinesterasa eritrocítica\. Este abre el programa Cary WIN UV que opera el espectrofotómetro y carga los parámetros de lectura en el equipo. (Ver Anexo 2).

7.4.3 Llene una cubeta con agua desionizada. Coloque en el portacubetas. En la pantalla principal del programa oprima en la opción "Cero" y después "OK" en el mensaje que aparece (Ver Anexo 2).

7.4.4 En la pantalla principal del programa oprima en la opción "Preparar". Se desplegará una pantalla con varias cejillas. Presione en la cejilla "Muestras" (Ver Anexo 2). Llene la información de los controles y muestras que va a analizar, iniciando con el control normal, control inhibido, y después las muestras incógnitas en orden creciente de número de objeto y número de autopsia, coloque las dos réplicas de cada muestra/control seguidas indicando r1 para la primera réplica y r2 para la segunda.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 8 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

- 7.4.5** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "INICIAR" (Ver Anexo 2). El software le irá indicando mediante un mensaje en la pantalla cuál muestra/control debe leer.
- 7.4.6** Agregue, en una cubeta 100 µL del sustrato que se encuentra en el baño e inmediatamente saque del baño el tubo que va a leer y vacíe todo el contenido en la cubeta con el sustrato, coloque en el espectrofotómetro y presione "OK" en la pantalla con el aviso. De inmediato aparece una nueva pantalla con una cuenta atrás de 2:00 minutos, presione de nuevo "OK" en esta pantalla (Ver Anexo 2). Realice así la lectura de todas las muestras/controles.
- 7.4.7** Al final guarde la información como "dd-mm-aa.BKN" en el directorio "UV-VIS Varian 50 BIO/Colinesterasa eritrocítica"(accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "salvar datos como")
- 7.5 Lecturas en el UV/VIS para hemoglobina:**
- 7.5.1** Acceda al directorio C:/UV-VIS Varian 50 BIO/Hemoglobina/ en la computadora que controla el UV/VIS Varian Cary 50 BIO.
- 7.5.2** Abra el archivo "Condiciones hemoglobina dd-mm-aa" de fecha más reciente. Automáticamente se abrirá el software "Cary Win UV" con las condiciones de lectura de hemoglobina vigente.
- 7.5.3** Llene una cubeta con disolución de trabajo de reactivo de Hb. Coloque en el portacubetas. En la pantalla principal del programa oprima en la opción "Cero" (Ver Anexo 2).
- 7.5.4** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "Preparar". Se desplegará una pantalla con varias cejillas. Presione en la cejilla "Muestras" (Ver Anexo 2). Llene la información de los controles y muestras que va a analizar, iniciando con el control normal, control inhibido, control de hemoglobina y después las muestras incógnitas en orden creciente con el número de objeto y el número de autopsia, el equipo ya tiene definido que se trata de un análisis por duplicado, solo es necesario ingresar la información una vez por muestra/control.
- 7.5.5** En la pantalla principal del programa oprima en la opción "INICIAR" (Ver Anexo 2). Se despliega una pantalla con la lista de muestras que se van a analizar, oprima "OK" en esta pantalla.
- 7.5.6** El software le irá indicando mediante un mensaje en la pantalla cuál muestra/control debe leer. Llene una cubeta con la muestra correspondiente, coloque en el espectrofotómetro y presione "OK" en la pantalla con el aviso. Realice la lectura de todas las muestras/controles. Utilice la misma cubeta para las dos réplicas de la misma muestra/control, simplemente descarte el contenido de la primera réplica y deje escurrir unos segundos la cubeta invertida antes de leer la segunda réplica.
- 7.5.7** Al final guarde la información como "Hemo dd-mm-aa.BKN" en el directorio "UV-VIS Varian 50 BIO/Hemoglobina" (accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "salvar datos como")
- 7.5.8** Imprima un reporte en PDF accediendo a "Fichero" en el menú principal del programa, opción "imprimir").
- 7.5.9** Llene la información de la bitácora de control del equipo.
- 7.5.10** Salga del programa Cary Win UV pero no apague la computadora.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 9 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Los resultados de la prueba se rechazarán cuando el valor de los controles (hemolizado control de hemoglobina, control normal y control inhibido) estén fuera de ± 2 desviaciones estándar en los gráficos de control.	± 2 DS	Cuando alguno de los controles se sale del rango aceptado, el montaje de este debe repetirse. Si el problema persiste, debe revisarse el vencimiento de los reactivos, y cambiarse el control.
2	La diferencia entre las réplicas para colinesterasa eritrocítica y para hemoglobina tanto en las muestras como en los patrones no debe ser mayor a un 5 %.	5% CV	Si la variación entre réplicas es mayor a un 5 % y la diferencia no es suficiente para cambiar la interpretación de la prueba (la actividad sigue siendo normal o sigue siendo inhibida, aunque se utilice el valor menor o el valor mayor de las dos réplicas en el cálculo) se puede sacar un promedio de las dos réplicas y reportarlo dos veces en lugar de las dos réplicas. Esto debe indicarse en las observaciones de la hoja de cálculo para colinesterasa eritrocítica (Ver 9.1). Si la variación entre réplicas es mayor a un 5 % y la interpretación de la prueba cambia cuando se usa una réplica o la otra (inhibida con una y normal con la otra), se deben montar 2 réplicas más, si estas segundas réplicas si cumplen, deben reportarse las segundas. Si el problema persiste debe hacerse un promedio de las cuatro réplicas realizadas y reportar dos veces este promedio, esto debe indicarse en las observaciones de la hoja de cálculo para colinesterasa eritrocítica (Ver 9.1).
3	Para la colinesterasa eritrocítica, la concentración de hemoglobina de la muestra debe ser mayor a 4 g/dL.	4 g/dL	Las muestras con hemoglobina inferior se consideran insatisfactorias y se reportan como tales en el legajo digital, en anotaciones del Registro de Datos y Resultados del SADCF
4	La colinesterasa eritrocítica es estable por una semana mantenida en refrigeración, sin embargo, muchas veces realizar el análisis antes de este tiempo es imposible.	8 días	Posterior a los ocho días, el análisis debe realizarse, no obstante, debe indicarse que, si hubiera ocurrido una inhibición por carbamatos, la actividad pudo haberse recuperado incluso en menos de una semana.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 10 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

9.1 Cálculos:

- 9.1.1** El valor de la colinesterasa eritrocítica se calcula utilizando una hoja de cálculo denominada "Hoja cálculo Colinesterasa ddmmm_aa" que se encuentra en el servidor "Toxicología-Documentos" con la siguiente dirección: H:\reporte\Colinesterasa y Hemoglobina\. Salve esta hoja como ddmmm_aa en la carpeta del año y mes correspondiente dentro de H:\reporte\Colinesterasa y Hemoglobina\.
- 9.1.2** Esta hoja de cálculo está compuesta de varios formularios, se puede acceder a cada formulario en las distintas pestañas de la hoja de cálculo que tienen un nombre abreviado del formulario que está contenido.
- 9.1.3** En la primera hoja de la "Hoja cálculo Colinesterasa ddmmm_aa" nombrada como "RAS" ingrese la información sobre la muestras, controles y reactivos en los espacios sombreados. Seguidamente revise en el formulario "Cálculo de la actividad de colinesterasa eritrocítica" que está al ingresar a la pestaña "Colinesterasa y Hb" si las diferencias entre réplicas para hemoglobina y colinesterasa en las muestras y los controles es aceptable (<5%) y si la exactitud de los controles es la adecuada, si no lo es proceda según se indica en el punto 2 del apartado de Criterios de Aceptación y Rechazo.
- 9.1.4** Para los tres controles de la determinación (control inhibido de CEE, el control normal de CEE y el control de hemoglobina) se llevan gráficos de control utilizando una hoja de cálculo denominada "Gráfico Control.xls" que se encuentra en el servidor "Toxicología-Documentos" con la siguiente dirección: H:\reporte\Colinesterasa y Hemoglobina\GRAFICOS CONTROL\.
- 9.1.5** Ingrese los datos para los controles en las pestañas: hemo normal, coli normal y coli inhibida. Observe los gráficos de control que están al lado de cada una de estas pestañas y observe el punto que acaba de ingresar. Estos deben estar entre ± 2 desviaciones estándar.
- 9.1.6** Una vez que las diferencias entre réplicas, la precisión y exactitud de los controles sea aceptable y se tenga resultados entre 2 DS en los gráficos de control, proceda a imprimir en PDF los formularios "Reporte colinesterasa" que están en las hojas denominadas "No.1...No.12" de la "Hoja cálculo Colinesterasa ddmmm_aa"
- 9.1.7** La hoja de cálculo "Gráfico Control.xls" permite el ingreso de 30 determinaciones. Una vez que se completen estas 30 determinaciones, se procede a guardar esta hoja de cálculo como: "Gráfico control ddmmmaa al ddmmmaa.xls" estas fechas corresponden a la fecha de la primera determinación y la última.
- 9.1.8** Copie estos en el archivo "Datos Totales.xls", que también se encuentra en el servidor "Toxicología-Documentos" con la siguiente dirección: H:\reporte\Colinesterasa y Hemoglobina\GRAFICOS CONTROL\. Elimine los datos que estuvieron afuera de ± 2 desviaciones estándar y se recalcule el promedio y la desviación estándar para cada control.
- 9.1.9** Establezca, con estos nuevos datos de promedios y desviaciones, los nuevos límites para un nuevo archivo "Gráfico Control.xls". En las casillas en blanco se reportan otros treinta datos.
- 9.1.10** Las fórmulas para el cálculo de la concentración de hemoglobina y de la actividad de la colinesterasa se describen a continuación:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 11 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

- Cálculo de la actividad de colinesterasa:

$$A_{coli} = \frac{\Delta A_r * V_t}{E * C_m} / Hb$$

A_{coli} = Actividad de colinesterasa eritrocítica en UI/ g Hb

ΔA_r = Cambio de absorbancia por minuto

Hb = Hemoglobina (g/dL)

V_t = Volumen total de reacción (mL)

E = Coeficiente de absortividad μ molar (μ mol/L) del 5-tionitrobenzoato a 460 nm.

C_m = Volumen de muestra (mL)

- Cálculo de la concentración de la hemoglobina:

$$Hb\left(\frac{g}{dL}\right) = \frac{A^{540} * M * F}{\epsilon^{540} * 1 * 1000 * 10}$$

Hb = Concentración de hemoglobina en g/dL

A^{540} = Absorbancia a 540 nm.

M = Masa molecular relativa de la hemoglobina obtenida de 64458/4.

F = Factor de dilución (20 μ L en 5,02 mL) de 251.

ϵ = Absortividad milimolar (11,0).

1 = Paso de luz (1 cm).

1000 = Factor de conversión de mg a g.

10 = Factor de conversión de L a dL.

9.2 Evaluación de la incertidumbre:

9.2.1 Para la evaluación de la incertidumbre de esta metodología se siguen los lineamientos establecidos en el "Procedimiento Para la Estimación de incertidumbre de los análisis forenses" (3.10) (Ver informe de cálculo de incertidumbre 3.12).

9.2.2 La hoja de cálculo "Hoja cálculo Colinesterasa ddm_m_aa" que se encuentra en el servidor "Toxicología-Documentos" con la siguiente dirección: H:\reporte\Colinesterasa y Hemoglobina\ realiza la estimación de las incertidumbres expandidas de la forma numérica.

9.2.3 Las incertidumbres expandidas obtenidas por la hoja de cálculo corresponden al intervalo con $k=1,96$ $p=0,95$ normal. Estas se calculan en la pestaña "Colinesterasa y Hb" pero no se reportan en el formulario individual con el resultado de cada muestra.

9.2.4 Como ejemplo de la incertidumbre obtenida:

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 12 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

- Para una actividad de la colinesterasa eritrocítica: 581 ± 82 UI/g Hb. Lo que expresado como intervalo sería de 499-663 UI/g Hb ($p=0,05$).

10 Reporte de Análisis y Resultados:

- 10.1** Incorpore en el legajo digital de cada caso el formulario "Reporte colinesterasa que se genera en 9.1.6.
- 10.2** Reporte los resultados en el SADCF y en el Dictamen Criminalístico.
- 10.3** Reporte la actividad de la colinesterasa eritrocítica incluyendo los rangos de referencia que correspondan dependiendo del sexo sin utilizar la incertidumbre, por ejemplo (CEE para hombres):
- Actividad de la colinesterasa eritrocítica: 336 UI/g Hb (Valores de referencia 262-418 UI/g Hb).

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

- 11.1** Utilice siempre gabacha, anteojos de seguridad y guantes desechables al manipular las muestras.
- 11.2** Siempre que salga del área de laboratorios, deseche los guantes, lavase las manos y deje la gabacha en la entrada del mismo.
- 11.3** Informe cualquier accidente donde se presuma contacto con material bio-infeccioso al Jefe de Sección o quién este encargado del laboratorio en ese momento para que se le indique el procedimiento a seguir.
- 11.4** Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.
- 11.5** Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.

12 Simbología:

CEE: colinesterasa eritrocítica.

CIHATA: Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines de la Universidad de Costa Rica.

% CV: Coeficiente de Variación Porcentual

DCF: Departamento de Ciencias Forenses.

EDTA: Sal de sodio o potasio del ácido etilendiaminotetracético.

Hb: Hemoglobina (g/dL).

ICSH: International Council for Standardisation in Haematology:

ddmmaa: significa día, mes y año.

N/A: No aplica.

O.I.J: Organismo de Investigación Judicial.

PDF: Formato de documento portátil.

PON: Procedimiento de Operación Normado.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 13 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO	P-DCF-ECT-TOX-007	

RAS: Registro de Análisis en Serie.

rpm: revoluciones por minuto.

SADCF: Sistema automatizado del Departamento de Ciencias Forenses.

UI: unidades Internacionales (umol/min/L).

UV-VIS: Espectrofotometría Ultravioleta Visible.

13 Terminología:

Colinesterasa eritrocítica (CEE): Enzima que se encuentra en los eritrocitos y es inhibida por los plaguicidas tipo organofosforados y carbamatos. Se utiliza como un marcador de intoxicación con estas sustancias.

Control inhibido: Corresponde a una muestra de sangre cuya actividad de colinesterasa eritrocítica es conocida e inferior al valor mínimo según los valores de referencia para la población costarricense. Se analiza junto con las muestras incógnitas a manera de control positivo.

Control normal: Corresponde a una muestra de sangre cuya actividad de colinesterasa eritrocítica es conocida y está dentro de los valores de referencia para la población costarricense. Se analiza junto con las muestras incógnitas a manera de control negativo.

Muestra incógnita: Muestra de sangre que se desea analizar para determinar su actividad de colinesterasa eritrocítica.

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Preparación de reactivos.
2	Pantallas para lectura de colinesterasa y hemoglobina del programa Cary Win UV.
3	Condiciones de lectura de colinesterasa eritrocítica y hemoglobina en el UV/VIS Varias Cary 50 BIO.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 14 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

Anexo No. 1

Preparación de reactivos

Preparación de una disolución de hipoclorito de sodio al 0,5 %.

Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta.

Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de hipoclorito al 0,5 %, utilizando la siguiente formula:

$$(C_d) \times (V_d) = (C_c) \times (V)$$

despejando se obtiene: $(V) = (C_d) \times (V_d) / (C_c)$, donde:

(CD): Concentración deseada, 0,5%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente.

(V): Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente.

Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente (V) al recipiente que va a contener la disolución de hipoclorito al 0,5% (ejemplo: el recipiente puede ser una pizeta de 500mL, Vd= 500 mL).

Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de agua destilada necesario para completar el volumen de la disolución de hipoclorito al 0,5% deseado.

Agite suavemente por inversión manual. Identifique el recipiente que va a contener la disolución preparada como "Disolución de hipoclorito al 0,5 %" y rotule con la fecha de preparación e iniciales de quién la prepara .

Almacene a temperatura ambiente. Esta disolución es estable al menos por 3 meses.

Disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5 % a 1%:

Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta.

Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de cloro para lavado de aproximadamente 0,5 % a 1%, utilizando la siguiente formula:

$$(C_d) \times (V_d) = (C_c) \times (V)$$

despejando se obtiene: $(V) = (C_d) \times (V_d) / (C_c)$, donde:

(CD): Concentración deseada, aproximadamente 0,5% a 1%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente.

(V): Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 15 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO	P-DCF-ECT-TOX-007	

Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente (V) a l recipiente que va a contener la disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5 % a 1% (ejemplo: el recipiente puede ser una tina plástica para lavado de 30 L de volumen aproximado, Vd= 30000mL).

Adicione agua de grifo hasta aproximadamente la mitad del volumen del recipiente utilizado para contener la disolución de cloro para desinfección de aproximadamente 0,5 % a 1% deseado.

Prepare esta disolución inmediatamente antes de usar y descártela después de ser utilizada.

Disolución de trabajo de reactivo de hemoglobina Drabkin:

Realice la dilución apropiada según las instrucciones de preparación del reactivo con agua desionizada. Pase a una botella de vidrio ámbar de 1 L provista de un dispensador automático de disoluciones de 1 a 10 mL. Rotule (sustancia, concentración, fecha, iniciales).

Conserve a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento del reactivo de hemoglobina Drabkin que utilizó.

Disolución de trabajo de sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica:

Saque del congelador el sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica de la casa comercial BIOTEC. Colóquelo sobre la mesa del laboratorio y espere a que alcance temperatura ambiente.

Mida 10 mL de agua tipo I utilizando una pipeta de vidrio de 10 mL, deposítelos en el frasco que contiene el sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica. Coloque el frasco en el agitador de tubos de ensayo por inversión por 15 minutos.

Utilizando una micropipeta de 100-1000 µL deposite 530 µL de la disolución de trabajo de sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica en microtubos de plástico ámbar de 1 mL. El reactivo alcanza para llenar 18 microtubos con este volumen.

Rotule cada microtubo (sustancia, concentración, fecha, iniciales). Conserve en congelación hasta la fecha de vencimiento del sustrato para análisis de colinesterasa eritrocítica que utilizó.

Preparación de disolución madre de metamidofos.

Busque el material de referencia de metamidofos. Pese el patrón antes de utilizarlo en la balanza analítica y anote la información necesaria en el "Registro de uso y control de material de referencia" de la sustancia.

Pese entre 5 y 20 mg de la sustancia en un balón aforado de 5 mL, utilice balanza analítica.

Vuelva a pesar el patrón y anote en el "Registro de uso y control de material de referencia" de la sustancia.

Afore el balón con metanol.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 16 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO	P-DCF-ECT-TOX-007	

Utilice el "Registro de Preparación de disoluciones" con toda la información requerida. En la celda "tipo de preparación" elija la opción "utilizando masa por medición" y calcule la concentración de la sustancia tomando en cuenta la masa pesada, la pureza del patrón y el volumen de la disolución madre.

Pase a un vial ámbar silanizado de 5 mL con tapa con teflón. Conserve en congelación durante un máximo de dos años.

Codifique la disolución madre con el código interno del material de referencia empleado más la letra "M" (de madre) y el número que corresponde al día-mes-año de la preparación. Rotule con la identificación de la sustancia, la concentración, la fecha de preparación, el disolvente y las iniciales de quién prepara.

Anote la información necesaria en el Formulario "Registro de uso y control de material de referencia"

Sangre inhibida:

Saque de la refrigeradora al menos 10 mL de sangre de donador anticoagulada con EDTA sangre de banco de sangre. Deposite 10 mL en un tubo cónico tapa rosca de 50 mL. Espere alrededor de 15 minutos a que alcance temperatura ambiente.

Agregue el volumen adecuado de una disolución madre de metamidofos de entre 1000 y 5000 ug/mL en metanol para obtener una concentración de 10 ug/mL en la sangre.

Tape firmemente y coloque en agitación por inversión por 15 minutos.

Coloque en un baño maría a 37°C por 15 minutos. Deje enfriar por alrededor de 15 minutos. Pase a un tubo cónico de 15 mL.

Rotule como sangre inhibida, con la fecha de preparación y las iniciales. Conserve en refrigeración por un máximo de 6 meses.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 17 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

Anexo No. 2
Pantallas para lectura de colinesterasa y hemoglobina del programa Cary Win UV

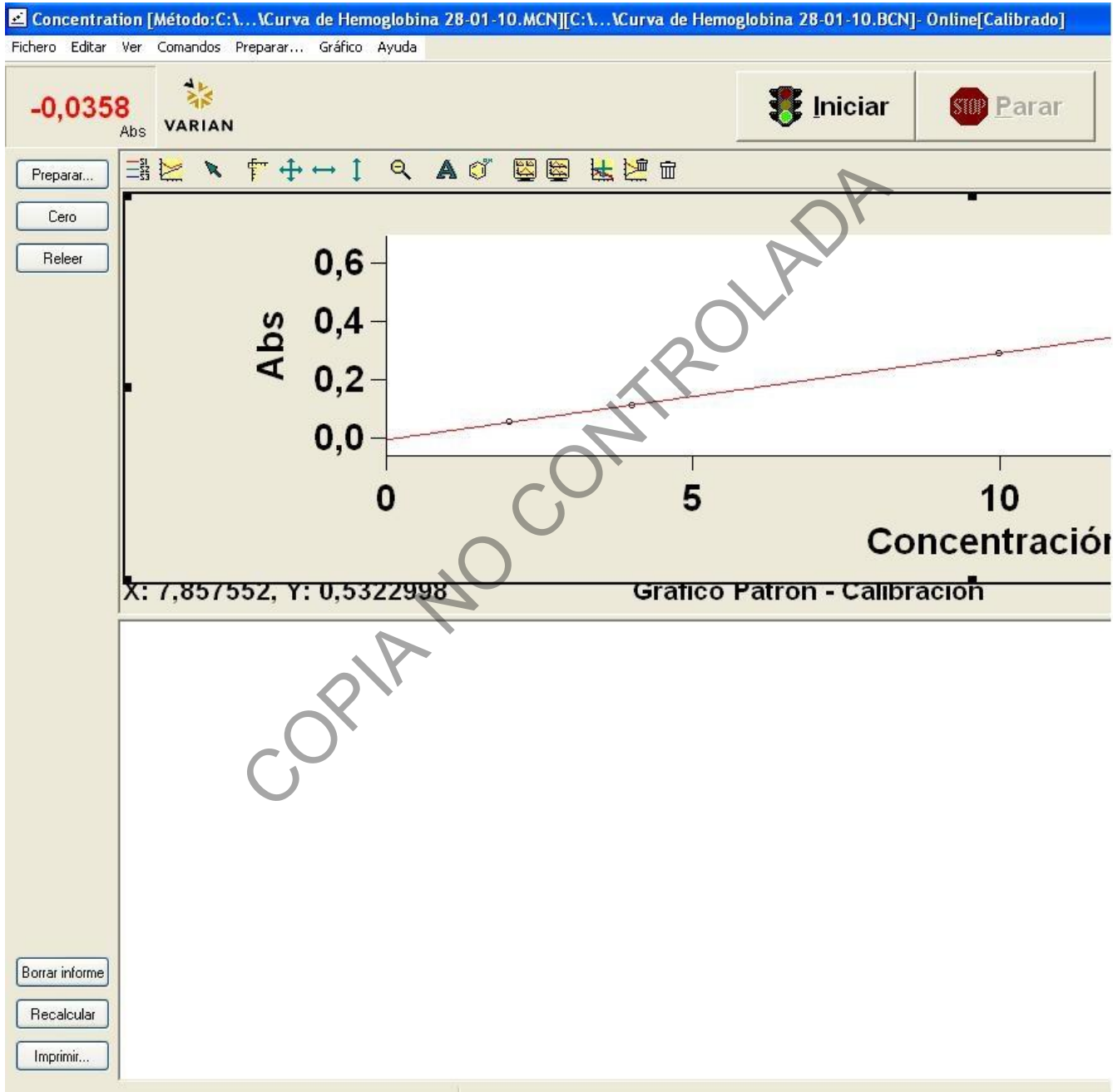


Imagen No. 1: Pantalla principal

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 18 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO	P-DCF-ECT-TOX-007	

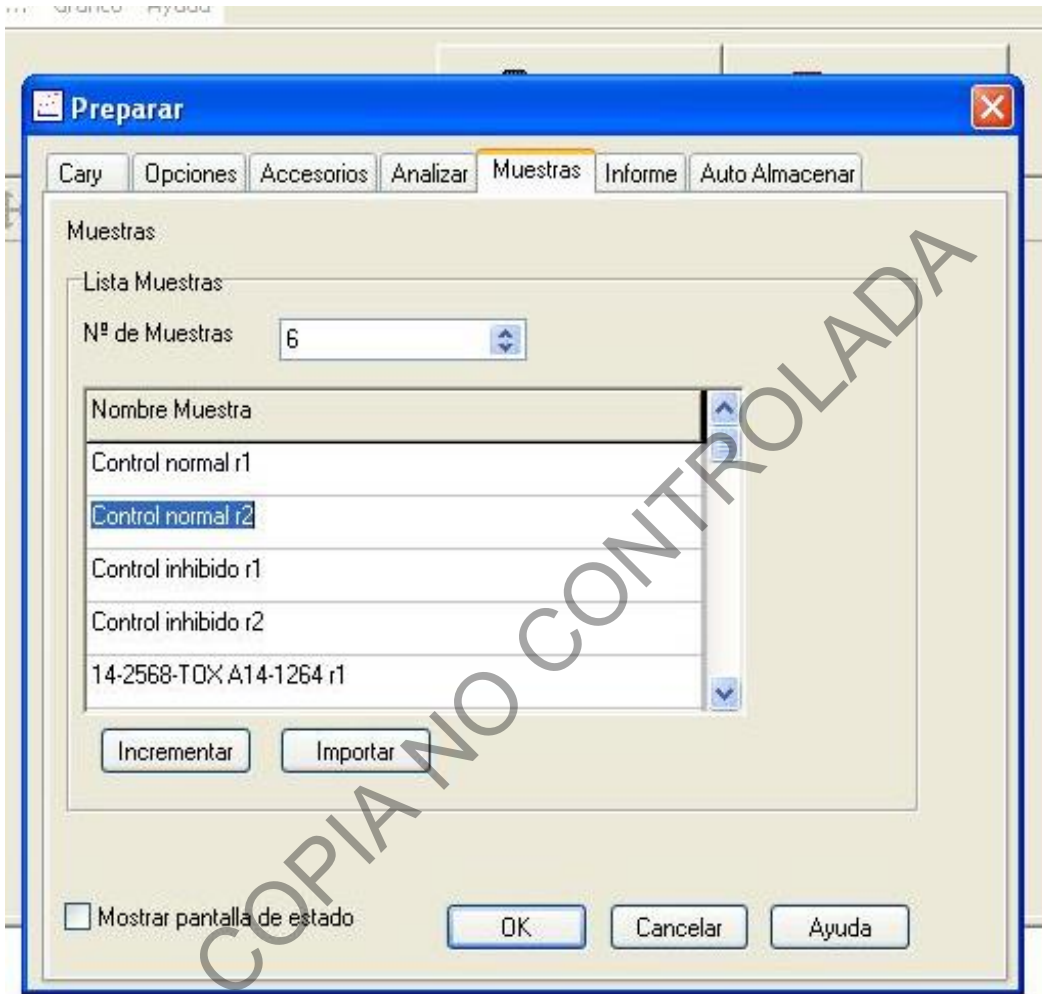


Imagen No. 2: Pantalla para introducir información de muestras de colinesterasa

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 19 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO	P-DCF-ECT-TOX-007	

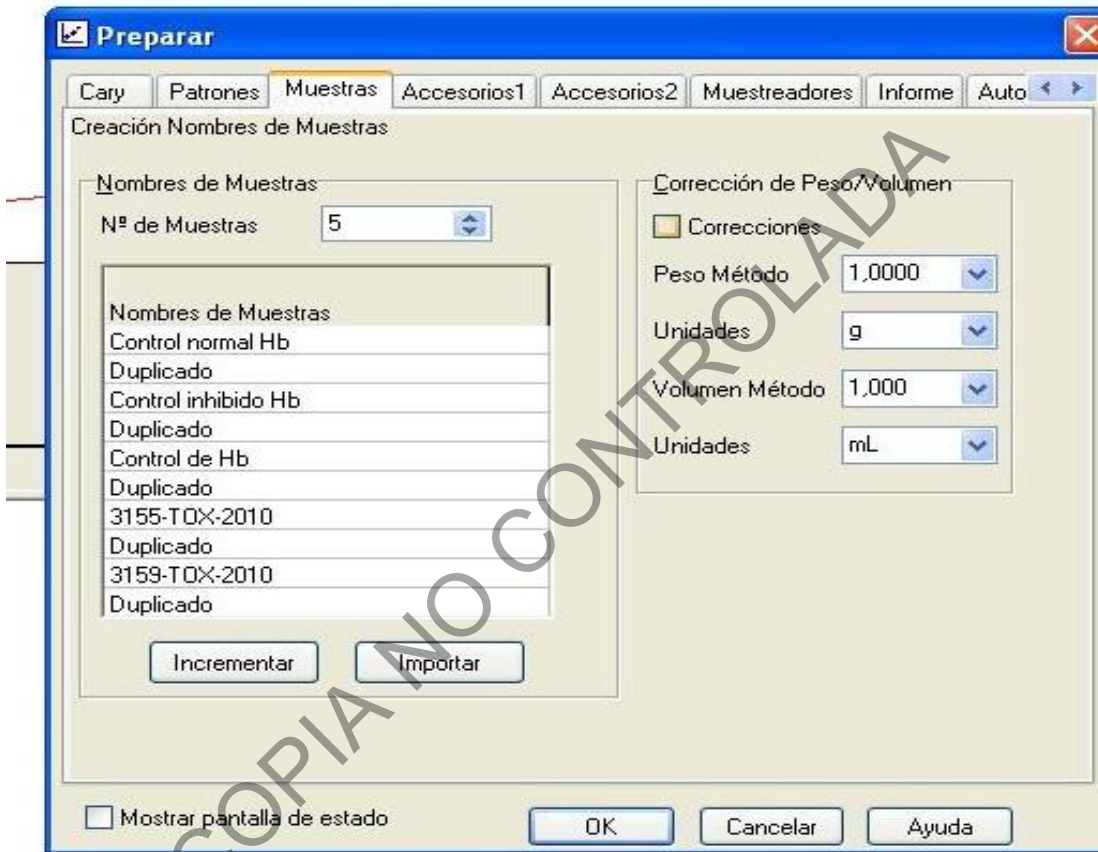


Imagen No. 4: Pantalla para introducir información de muestras de hemoglobina

Anexo No. 3

Condiciones de lectura de colinesterasa eritrocítica y hemoglobina en el UV/VIS Varias Cary 50 BIO.

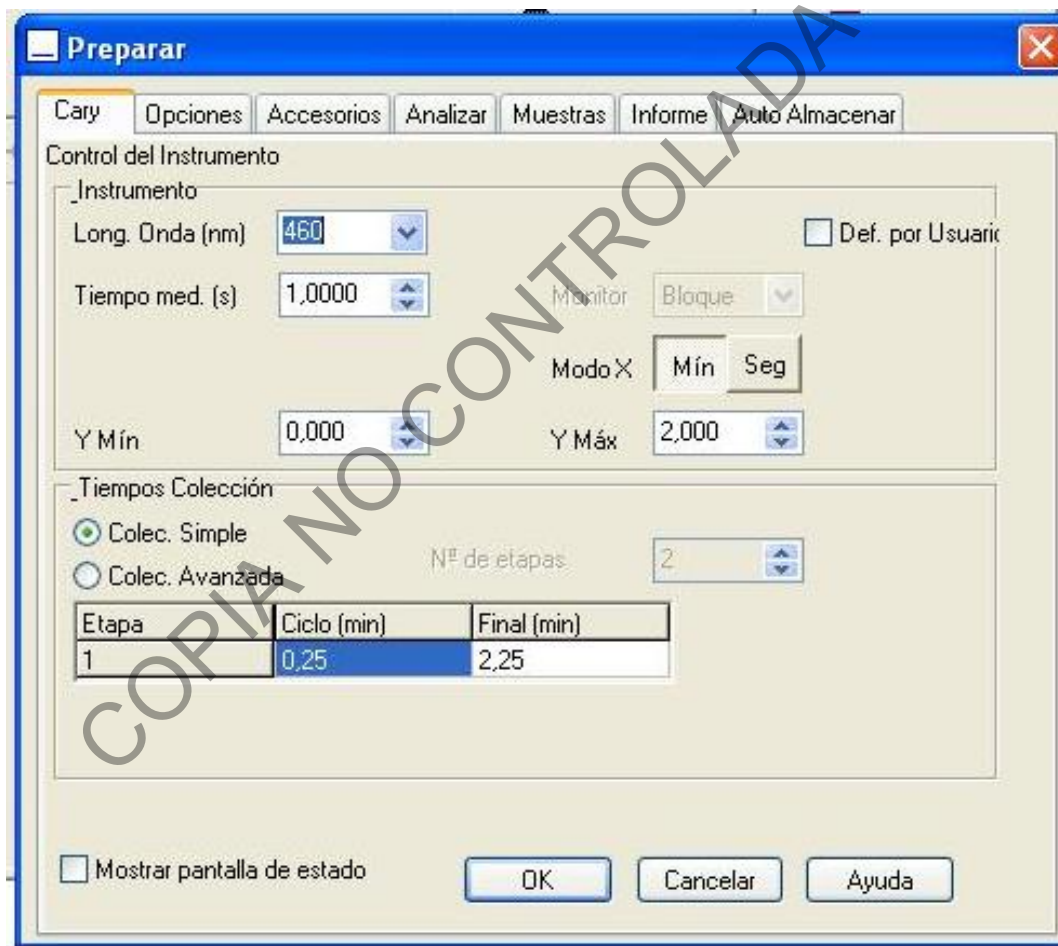


Imagen No. 5 Condiciones de lectura de colinesterasa eritrocítica (cinética)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 21 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO		P-DCF-ECT-TOX-007

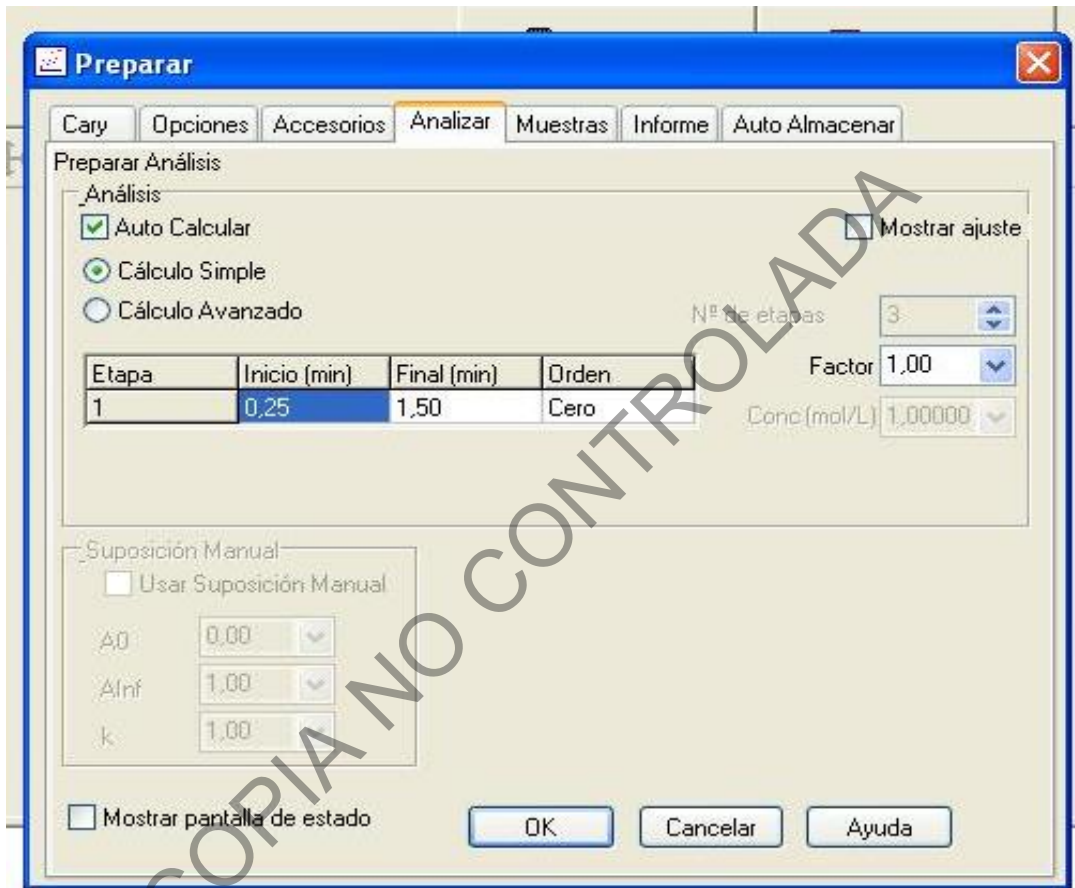


Imagen No. 6 Condiciones de lectura de colinesterasa eritrocítica (análisis)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 03	PAGINA: 22 de 22
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA COLINESTERASA EN MATRICES BIOLÓGICAS POR EL MÉTODO CINÉTICO	P-DCF-ECT-TOX-007	

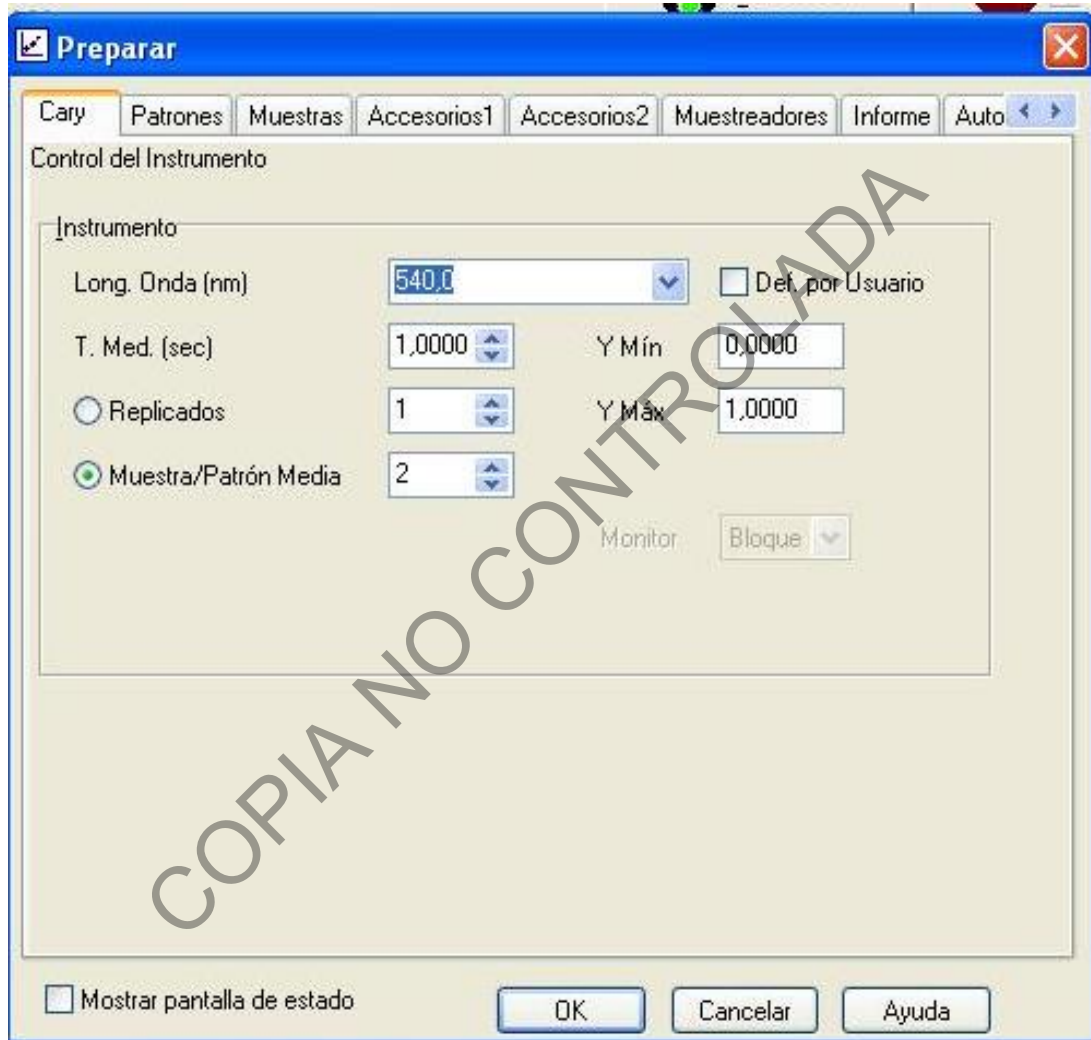


Imagen No. 7 Condiciones de lectura de hemoglobina