

**ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ СІАЛОВИХ КИСЛОТ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ КОЛОРИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ****IVD****ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір застосовується для визначення концентрації сіалових кислот у сироватці крові, плазмі людини в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях, науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **100 макро-, 200 напівмікро- чи 400 мікрОВИЗНАЧЕНЬ** сіалових кислот (з урахуванням холостих і калібрувальних проб) (Див. *Примітку 1*).

Діапазон визначаємих концентрацій - від 1 ммоль/л до 4 ммоль/л.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 5 %.

Чутливість<sup>3</sup> на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 0,01 ммоль/л (532 нм).

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

**ПРИНЦИП МЕТОДУ**

При нагріванні глікопротеїдів сироватки (плазми) крові в кислому середовищі з гідролізуючим реагентом вивільняються сіалові кислоти. Після осадження білків центрифугуванням сіалові кислоти, що залишаються в супернатанті, при нагріванні з кольороутворюючим реагентом утворюють забарвлені сполуки рожевого кольору. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна концентрації сіалових кислот в дослідній пробі.

**СКЛАД НАБОРУ**

1. Гідролізуючий реагент - 1 флакон з (100 ± 2) мл або 2 флакони по (50 ± 2) мл;
2. Кольороутворюючий реагент - 1 флакон з (40 ± 2) мл;
3. Калібратор сіалових кислот - 1 флакон з (3 ± 0,1) мл (точне значення концентрації сіалових кислот (А) зазначено на флаконі з калібратором)

**ОБЛАДНАННЯ**

1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **532 (500-560)** нм в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності і довжині оптичного шляху 10 мм.
2. Водяний термостат або автоматична водна баня, яка здатна підтримувати температуру (плюс 100 ± 2) °С.
3. Пробірки скляні місткістю 20 мл та скляні центрифужні (згідно з чинними нормативними документами).
4. Піпетки місткістю 1 і 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).
5. Центрифуга для пробірок (швидкість 3000 об/хв).

**АНАЛІЗУЕМИЙ МАТЕРІАЛ**

**Сироватка, плазма (ЕДТО або гепаринізована).**

Концентрація сіалових кислот стабільна протягом 7 діб при температурі від 0 °С до плюс 4 °С або протягом 4 тижнів при температурі мінус 20 °С за умови, що сироватка або плазма щільно закриті.

**Підготовка до дослідження:** здача крові повинна проводитися натще.

## ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

**1. Гідролізуючий реагент та Кольороутворюючий реагент** готові до застосування і придатні до терміну, вказаного на упаковці.

**2. Калібратор сіалових кислот.** Флакон з ліофілізатом обережно відкривають, не допускаючи втрат сухої речовини, і до флакону піпеткою відміряють ( **$3,00 \pm 0,03$  мл**) бідистильованої води. (Концентрація і адекватність подальшого результату залежать від точності виконання цього етапу приготування.) Флакон знову закривають пробкою і його вміст періодично перемішують круговим обертанням, не струшуючи і не допускаючи утворення піни, витримують при кімнатній температурі на протязі 30 хв, до повного розчинення ліофілізату. Перед відбиранням проби на аналіз необхідно ретельно перемішати вміст флакону.

Негайно закривати флакони після закінчення роботи, щоб уникнути випаровування реактиву або його контамінації.

## ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, наведеною в таблиці 1 (Див. *Примітку 2*).

Таблиця 1

Відміряти в пробірку, мл	Сироватка, плазма, калібратор			Холоста проба		
	Макро	Напівмікро	Мікро	Макро	Напівмікро	Мікро
Гідролізуючий реагент	<b>1,0</b>	0,5	0,25	<b>1,0</b>	0,5	0,25
Вода бідистильована або деіонізована	<b>2,0</b>	1,0	0,5	<b>2,6</b>	1,3	0,65
Аналізуємий зразок	<b>0,6</b>	0,3	0,15	-	-	-
Вміст <i>центрифужних</i> пробірок ретельно перемішати, <u>закрити пробірки гумовими пробками</u> і поставити <u>у бурхливо киплячу</u> водяну баню на <b>5 хв</b> . Потім одразу пробірки охолодити в проточній холодній воді і центрифугувати <b>5 хв</b> при 3000 об/хв.						
Супернатант	<b>2,0</b>	1,0	0,50	<b>2,0</b>	1,0	0,50
Кольороутворюючий реагент	<b>0,4</b>	0,2	0,10	<b>0,4</b>	0,2	0,10
В усіх випадках ретельно перемішати, <u>закрити пробірки гумовими пробками</u> , інкубувати <b>точно 15 хв у бурхливо киплячій</b> водяній бані. Потім пробірки одразу охолодити в проточній холодній воді. Додати						
Вода бідистильована або деіонізована	<b>2,0</b>	1,0	0,50	<b>2,0</b>	1,0	0,50
Вміст пробірок <b>ретельно</b> перемішати і виміряти оптичну щільність ( $E_{\text{кал}}$ ) калібрувальної або дослідної проби ( $E_{\text{досл}}$ ) <b>проти холостої проби</b> . Забарвлення стабільне протягом <b>30 хв</b> . Фотометрування – див. розділ „Обладнання”.						

## РОЗРАХУНОК КОНЦЕНТРАЦІЇ СІАЛОВИХ КИСЛОТ

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал}}} \times A \quad \text{ммоль/л, де:} \quad (1),$$

C - концентрація сіалових кислот в біологічній рідині, ммоль/л;

$E_{\text{досл.}}$  - оптична щільність дослідної проби, од. оптичної щільності;

A - концентрація сіалових кислот в калібрувальній пробі, ммоль/л;

$E_{\text{кал}}$  - оптична щільність калібрувальної проби, од. оптичної щільності.

## КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції і процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями, визначеними даним методом. Наприклад: „ФілоНорм” або „ФілоПат” (Україна).

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

## НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ <sup>2</sup>

- у сироватці крові (2,0 — 2,33) ммоль/л вільної нейрамінової кислоти або сіалових кислот

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (Належної Лабораторної Практики) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

### **ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Сіалові кислоти - речовини, присутні у всьому організмі, але, в основному, в зв'язаному вигляді. Сіалові кислоти є N-ацетильними похідними нейрамінової кислоти, яка відіграє важливу роль в якості будівельних блоків структурних полісахаридів. Нейрамінова кислота являє собою похідне дев'ятивуглецевої цукрової кислоти. Її можна розглядати як продукт приєднання шестивуглецевого аміноцукру до трьохвуглецевої цукрової кислоти. Нейрамінова кислота і її похідні - сіалові кислоти у вільному стані присутні в крові, лікворі, слині та інших біологічних субстратах. Найбільше їх в слині і слизових оболонках, деяка кількість є в крові. Завдяки сіаловим кислотам секрет слизових стає більш в'язким, що дозволяє їм виступати захистом від фізичного і хімічного впливу.

У сироватці крові сіалові кислоти зв'язуються з її білками і частиною гормонів, дозволяючи їм циркулювати в крові більш тривалий час. Від сіалових кислот також залежить тривалість циркуляції в крові еритроцитів і лімфоцитів. Встановлено, що процес старіння еритроцитів пов'язаний з тим, що в їх оболонці зменшується кількість сіалових кислот.

Якщо в крові збільшується концентрація сіалових кислот - значить, йде розпад міжклітинного матриксу. Це буває при запаленні. Наприклад, нейрамінідаза відщеплює від глікопротеїнів N-ацетілнейрамінову (сіалову) кислоту, і вже дестабілізований глікопротеїн поглинається макрофагами. Тому концентрація сіалових кислот в крові - **характеристика стану сполучної тканини**. При запальних процесах ця концентрація набагато зростає, що можливо визначити лабораторно.

Вміст нейрамінових кислот в сироватці крові різко **зростає** при багатьох інфекційних захворюваннях, недостатності кровообігу II і III ступеня, інфекційному міокардиті, туберкульозі, ракових пухлинах, лейкозах, лімфогранулематозі, дистрофічних і запальних процесах в нирках (нефроз, нефрит) і печінці (гепатоз), ендокардиті, остеомієліті, поліартриті; обтураційній жовтяниці, хвороби Ходжкіна, гострому апендициті, деструктивних процесах, а також при ураженні сполучної тканини (колагенози) і серцевого м'яза, інфаркті міокарда, також підвищений рівень може вказувати на розвиток ревматоїдного артрити; **знижується** при цирозі печінки, перніціозній анемії, хворобі Коновалова-Вільсона, гемохроматозі, дегенеративних процесах в центральній нервовій системі.

Найчастіше аналіз призначається ревматологом з метою діагностики розвитку ревматоїдного артрити, показаннями при цьому є симптоми хвороби:

- хворобливість суглобів (часто це невеликі периферичні суглоби, причому ураження симетричне);
- обмеження їх рухливості;
- припухлість і почервоніння шкіри над ураженими суглобами.

З віком вміст нейрамінових кислот в сироватці крові також збільшується.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

### **ПРИМІТКА**

1. **Розраховано на загальний об'єм реакційної суміші для вимірювання: 4,4 мл (макро-), 2,2 мл (напівмікро-), 1,1 мл (мікро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:**

**Гідролізуючий реагент : Аналізуємий розчин = 100 : 60**

**Супернатант : Кольороутворюючий реагент = 100 : 20**

2. На першому етапі гідроліз варто проводити у скляних центрифужних пробірках, подальшу обробку можливо виконувати у звичайних скляних пробірках.

## УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап., под ред. В.В.Меньшикова, Москва, 1999, "Лабинформ", с.112.
2. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. - Биохимические анализы в клинике. Справочник 2-е изд., - Москва, 2001, «Медицинское информационное агенство», с.118.
3. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).



ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,

Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32

Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34

Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54

E-mail: [felicit@ukr.net](mailto:felicit@ukr.net) <http://www.felicit.com.ua>