

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

09 листопада 2012 р.

І.Б. Демченко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами

30 жовтня 2012 р.

І.П. Семенів

Код за НК 024:2023 – 52964

REF №HP027.01

ТУ У 24.4-24607793-017-2003

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ХОЛІНЕСТЕРАЗИ У БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ З АЦЕТИЛХОЛІНХЛОРИДОМ

IVD

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для кількісного визначення активності холінестерази у сироватці крові в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях, науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **80 мікро-, 40 напівмікро- або 20 макровизначень** (з урахуванням холостих і калібрувальних проб) (Див. *Примітку 2*).

Діапазон визначаємих активностей - від 5,0 мкмоль/(с×л) до 110,0 мкмоль/(с×л).

Коефіцієнт варіації в серії – не більше 10 %.

Чутливість ⁶ на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 0,1 мкмоль/(с×л) (540 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

Під дією холінестерази відбувається гідроліз ацетилхоліну з утворенням оцтової кислоти і холіну. Оцтова кислота знижує рН розчину, що встановлюється за допомогою індикатора (зміна забарвлення з малинового в жовтий колір). Зміна інтенсивності забарвлення пропорційна активності ферменту в аналізованій пробі.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|---|--|
| 1. Буферно-індикаторний розчин | - 2 флакони по (50 ± 2) мл; |
| 2. Субстрат: наважки або в розчині | - 4 мікропробірки по (0,205 ± 0,010) мг;
або 1 флакон з (5,0 ± 0,5) мл; |
| 3. Розчин інгібітору | - 1 флакон з (5,0 ± 0,5) мл |
| 4. Калібрувальний розчин
(оцтова кислота 0,1 моль/л) | - 1 ампула або флакон з (5,0 ± 0,5) мл |

ЗРАЗОК

Сироватка.

Сироватка крові після 12 годинного голодування. Гемоліз недопустимий. Зразки стабільні при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С протягом 7 діб або до трьох місяців при температурі мінус 20 °С. Уникати повторного заморожування та відтаювання зразка.

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **540 (500-560) нм** в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм.
2. Водяний термостат або автоматична водяна баня, які здатні підтримувати температуру (плюс 37 ± 1) °С.
3. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
4. Піпетки місткістю 0,1 та 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Буферно-індикаторний розчин** готовий до роботи. Перед використанням витримати реактив при кімнатній температурі 30 хв. Розкритий реактив використати протягом тижня.

2. **Розчин субстрату.**

Із наважки: До вмісту однієї мікропробірки додати 1,25 мл деіонованої води. Реактив використати протягом 3 діб, зберігаючи при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Рідкий: Готовий до роботи. Розчин стабільний. (Для відбору субстрату з флакону використовувати **ТІЛЬКИ сухі піпетки.**)

3. **Розчин інгібітору.** Готовий до використання. Розчин стабільний.

4. **Калібрувальний розчин.** Готовий до використання. Розчин стабільний.

5. **Розчини 2-4** стабільні до закінчення гарантійного терміну придатності (при дотриманні умов зберігання, зазначених на упаковці).

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, наведеною в таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба				Контроль мутності				Холоста проба				Калібрувальна проба			
	Мікро	Напів-мікро	Макр	о	Мікро	Напів-мікро	Макр	о	Мікро	Напів-мікро	Макр	о	Мікро	Напів-мікро	Макр	о
Індикаторно-буферний розчин	1,250	2,50	5,0		-	-	-		1,250	2,50	5,0		1,250	2,50	5,0	
Фізіологічний розчин	-	-	-		1,35	2,70	5,4		0,025	0,05	0,1		0,500	0,10	0,2	
Калібрувальний розчин	-	-	-		-	-	-		-	-	-		0,025	0,05	0,1	
Прогрівають 5 хв при температурі плюс 37 °С у водяному термостаті, наступні реагенти вносять у термостатовані пробірки.																
Зразок	0,025	0,05	0,1		0,025	0,05	0,1		-	-	-		-	-	-	
Розчин субстрату	0,050	0,10	0,2		-	-	-		0,050	0,10	0,2		-	-	-	
Перемішують і інкубують при плюс 37 °С протягом 30 хв																
Розчин інгібітору	0,050	0,10	0,2		-	-	-		0,025	0,10	0,2		0,050	0,10	0,2	
Вимірюють (не пізніше чим через 10 хв) оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{досл.}}$), контроль мутності ($E_{\text{м}}$), холостої проби ($E_{\text{хол}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{кал}}$) проти дистильованої води. Фотометрування - див. розділ «Обладнання».																

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Одну- дві холості проби ставлять на серію дослідних проб. Контроль мутності ставлять для кожної проби.

Розрахунок ведуть за формулою(1):

$$E_{\text{рез}} = E_{\text{хол}} + E_{\text{м}} - E_{\text{досл}} \quad , \text{де} \quad (1)$$

$E_{\text{хол}}$ – оптична щільність холостої проби, од. опт. щільності;

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

$E_{\text{м}}$ – оптична щільність контролю мутності, од. опт. щільності;

$E_{\text{рез}}$ – результуюча оптична щільність, од. опт. щільності.

Розрахунок активності холінестерази ведуть за формулою (2).

$$C = \frac{E_{\text{рез}}}{E_{\text{хол}} - E_{\text{кал}}} \times 37,0 \quad , \text{де} \quad (2)$$

C - активність холінестерази, мкмоль/(с×л);

37 - фактор перерахунку, мкмоль/(с×л).

$$\underline{\underline{\text{мкмоль}/(\text{с} \times \text{л}) = \text{мккат}/\text{л} = 60 \text{ Е}/\text{л}(\text{У}/\text{л}) = 3,6 \text{ мкмоль}/(\text{год} \times \text{мл})}}$$

НОРМАЛЬНІ МЕЖІ АКТИВНОСТІ ФЕРМЕНТУ ПРИ 37 °С

Сироватка крові (45 – 95) мкмоль/(с×л) або (160 – 340) мкмоль/(год×мл)

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

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Холінестераза синтезується в печінці і визначається для оцінки функції печінки. Пониження активності холінестерази говорить про порушення її синтезу.

Визначення активності холінестерази особливо важливе при діагностиці атипових форм ферментів і при отруєнні фосфорорганічними інсектицидами^{2,3}.

Активність сироваткової холінестерази знижена при гострих інфекціях, легеневій емболії, м'язовій дистрофії та інфаркті міокарду^{2,3}.

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

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції та процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями активності, 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.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

На хід визначення можуть впливати деякі ліки і речовини^{2,3,4,5}.

ПРИМІТКА

1. Якщо екстинція дослідної проби проти дистильованої води становить менше 0,1 од. опт. щільності, то дослідну сироватку розводять фізіологічним розчином 1 до 1. Результат множать на 2.

2. Розраховано на загальний об'єм реакційної суміші: 5,5 мл (макро-), 2,75 мл (напівмікро-), 1,375 мл (мікро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:

Індикаторно-буферний розчин : Аналізуємий розчин : Розчин субстрату : Розчин інгібітору
= 50 : 1 : 2 : 2

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. Медицинские лабораторные технологии. Справочник/Под ред. А.И. Карпищенко. С.-П.: Интермедика, 2002, стр.45-46
2. Whitaker M, et al Comparison of a Commercially Available Assay System with Two Reference Methods for the Determination of Plasma Cholinesterase Variants., Clin Chem 1983; (29/10); 1746-1760.
3. Young DS, Effects of drugs on Clinical Lab. Tests 4th ed AACC Press, 1995.
4. King M, Cholinesterase, Kaplan A et al. Clin Chem The C. V. Mosby Co. St Lous. Toronto. Princeton 1984; 1108-1111.
5. Young DS, Effects of disease on Clinical Lab. Tests 4th ed AACC Press, 2001.
6. 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: filiclit@ukr.net <http://www.feliclit.com.ua>