ХОЛИНЭСТЕРАЗА (cholinesterase) 1001100

Для кинетического определения холинэстеразы в сыворотке или плазме с использованием бутирилтиохолина.

IVD (для диагностики in vitro) Хранить при 2–8°C.

Код: 1001100 20 x 3 мл

ПРИНЦИП МЕТОДА

Холинэстераза катализирует гидролиз бутирилтиохолина в бутират и тиохолин. Тиохолин реагирует с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота (DTNB) с образованием 5-меркапто-2-нитробензойной кислоты (5-MNBA) в соответствии со следующим уравнением реакции:

$$\text{Бутирилтиохолин} + H_2O \xrightarrow{\text{ХЭ}} \text{Бутират} + \text{тиохолин}$$

$$\text{Тиохолин} + \text{ДТНБ} \longrightarrow \text{5-MNBA}$$

Скорость образования 5-MNBA, измеряемая фотометрически при 405 нм, пропорциональна каталитической активности (концентрации) холинэстеразы, присутствующей в пробе[1,2].

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Холинэстераза – это фермент плазмы, синтезируемый в печени. Его истинная физиологическая функция не известна, так его функцией может быть гидролиз холина в плазме. Активность холинэстеразы обычно измеряется для оценки функции печени, так как он является чувствительным тестом на контакт с фосфорорганическими пестицидами, а также для выявления пациентов с атипичными формами фермента, которые имеют высокую чувствительность к сукцинил-холину[1,5,6].

Клинический диагноз не может быть поставлен по результату одного теста, он должен определяться по совокупности клинических и других лабораторных данных.

РЕАГЕНТЫ

Реагент 1 **R1** буфер	Фосфатный буфер pH 7,7	50 ммоль/л
Реагент 2 **R2** субстрат	5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота (DTNB) Бутирилтиохолин	0,25 ммоль/л 7 ммоль/л

ПОДГОТОВКА

Рабочий реагент: Разведите 1 таблетку субстрата (R2) в одном флаконе буфера (R1).
Закройте крышку и тщательно перемешайте до полного растворения содержимого.
Рабочий реагент стабилен 2 ч при 2-8°C.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ

Все компоненты набора стабильны до указанной на упаковке даты (expiration date) в плотно закрытом флаконе при 2-8°C, в защищенном от света месте и с соблюдением правил, предотвращающих контаминацию при использовании. Не используйте таблетки при их разрушении. Не используйте реагенты после окончания срока годности.

Признаки порчи реагентов:

- присутствие частиц или мутности.
- абсорбция бланка (A) при 405 нм ≥1,200.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Спектрофотометр и колориметр с фильтром 405 нм (или биохимический анализатор).
- Термостат с температурой 25, 30 или 37°C (± 0,1°C) (или биохимический анализатор).
- Соответствующие кюветы с оптическим путем 1,0 см.
- Общее лабораторное оборудование.

ПРОБЫ

Сыворотка или гепаринизированная плазма[1]. Стабильность 7 дней при 2-8°C.

ПРОЦЕДУРА

1. Условия теста:
   Длина волны : 405 нм
   Оптический путь : 1 см
   Температура : 25, 30 или 37°C (Температура должна быть стабильной (±0,5°C))
   Измерение : против бланка по дистил.воде или воздуху, увеличение оптической плотности.
   Метод : кинетика по фактору (22710), время задержки 30с, время реакции 90с
2. Настройте прибор на ноль по дистиллированной воде или воздуху.
3. Подогреть рабочий реагент и кюветы до нужной температуры (25/30/37°C). Пипетируйте в кювету непосредственно перед измерением:

	Полумикрометод		Микрометод		ChemWell	
	25, 30°C	37°C	25, 30°C	37°C	25, 30°C	37°C
Проба	10 мкл	5 мкл	5 мкл	2,5 мкл	2 мкл	1 мкл
Рабочий реагент (R1+2)	1,5 мл	1,5 мл	750 мкл	750 мкл	300 мкл	300 мкл

4. Перемешать, инкубировать в течение 30 секунд.
5. Измерить начальную оптическую плотность (A), затем измерять оптическую плотность каждые 30с в течение 1,5 мин.
6. Вычислить среднее изменение оптической плотности за минуту: ΔA/мин.

ВЫЧИСЛЕНИЕ

Рассчитать активность щелочной фосфатазы в пробе:

25, 30°C (Е/л)= ΔA/мин x 11355

37°C **(Е/л)= ΔA**/мин **x 22710**

Единицы: 1 международная единица (Е/л или U/L) – это количество фермента, которое трансформирует 1 мкмоль субстрата в минуту при стандартных условиях. Концентрация выражается в единицах на литр пробы (Е/л).

Фактор для перевода международных единиц (Е/л) в единицы СИ (кат/л):

1 Е/л = 16.67×10^{-9} кат/л = 16.67×10^{-3} мккат/л; 1 мккат/л = 60 Е/л

Коэффициенты температурной конверсии

Для коррекции результатов относительно другой температуры умножьте на:

Температура исследования	Коэффициенты конверсии для		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1.00	1.24	1.55
30°C	0.81	1.00	1.26
37°C	0.64	0.80	1.00

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контрольную сыворотку с каждой серией тестов. Мы рекомендуем контрольные сыворотки SPINTROL Normal и Pathological (Кат.№ 1002120 и 1002210). Если значения контролей выходят за указанный диапазон, проверьте прибор, реагенты и технику выполнения. Каждая лаборатория должна разработать собственную систему контроля качества и соответствующие действия, если контроли не показывают приемлемых результатов.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ[1]

25°C	30°C	37°C
3000 – 9300 Е/л	3714 – 11513 Е/л	**4659 – 14443 Е/л**

Эти значения приведены для ориентационных целей; каждая лаборатория должна представить свои собственные значения референтного диапазона.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Диапазон измерения (37°C**)**: от определяемого уровня в 7 Е/л до предела линейности 9084 Е/л.

Если полученные результаты превышают предел линейности, пробы следует разбавить 1:5 физраствором (9 г/л NaCl) и повторить исследование, полученный результат умножить на 5.

Воспроизводимость:

	Внутри серии (n=20)		Между сериями (n=20)	
Среднее (U/L)	5992	3087	6277	3254
SD	70	56,1	50,5	66,0
CV (%)	1,17	1,82	0,80	2,03

Чувствительность: 1 Е/л= 0,0004 A/мин.

Правильность: Результаты, полученные с помощью реагентов SPINREACT (y) не показали систематических различий при сравнении с другими коммерческими реагентами (x).

Результаты оценки характеристик теста зависят от используемого анализатора.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Повышенный гемолиз не оказывает влияние на результаты[1,2]. Список лекарств и других веществ, влияющих на определение ХЭ, представлен Young et. al[3,4].

ПРИМЕЧАНИЕ

Реагенты могут быть использованы как на автоматических анализаторах, так и на обычных фотометрах с ручной процедурой. **Процедуры для некоторых автоматических анализаторов доступны по запросу**.

ЛИТЕРАТУРА:

1. King M. Cholinesterase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1108-1111.
2. 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.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995. PACKAGING Ref: 1001100 20 x 3 mL Cont.