



## Набор для определения ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Кат. № : C511  
Производитель: Teco Diagnostics (США)

**Внимание:** основой при проведении анализа есть оригинал инструкции на англ. языке.

### ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

Реагент холинэстеразы используется для диагностики *in vitro* в количественном кинетическом определении холинэстеразы в человеческой сыворотке, плазме или цельной крови.

### ПРИНЦИП

В анализе холинэстеразы имеют место следующие реакции:



Холинэстераза гидролизует пропионитхолин (PTC), образуя тиохолин, который взаимодействует с 5,5'-дителиобис-2-нитробензойной кислотой (DTNB), образуя желтый 5-тио-2-нитробензоат с максимальной мерой поглощения света при 405 нм. Поэтому, коэффициент изменения в мере поглощения света при 405 нм прямо пропорционален действию холинэстеразы.

### СОСТАВ РЕАГЕНТОВ

Реагент холинэстераза (PTC), при перерастворении согласно указаниям, имеет следующие активные компоненты. Приблизительная концентрация каждого компонента следующая: Пропионитхолина 4мМ, DTNB 0.4 мм, буфера и неактивных стабилизаторов и наполнителей.

### ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ И ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Реагент холинэстеразы (PTC) предназначен для диагностического использования *in vitro*.

Необходимо соблюдать обычные предосторожности при использовании лабораторных реагентов.

### ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Храните сухой реагент охлажденным (2 - 8°C). Реагент стабилен до окончания срока годности, указанного на этикетке. Перерастворенный реагент стабилен в течение 6 часов при комнатной температуре (15 - 30°C) или 3 дня при 2 - 8°C.

### ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

#### ПОЛНАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ:

Перерастворите реагент холинэстеразы (PTC) с объемом деионизированной воды, указанным на этикетке. После добавления воды закройте флакон и немедленно переверните несколько раз.

#### ДИБУКАИНОВЫЙ ИНГИБИТОР:

Перерастворите одну пробирку реагента холинэстеразы (PTC) с раствором дибукаина вместо деионизированной воды.

#### ФТОРИСТЫЙ ИНГИБИТОР:

Перерастворите одну пробирку реагента холинэстеразы (PTC) с фтористым раствором, вместо деионизированной воды.

### УХУДШЕНИЕ РЕАГЕНТА

Реактив должен быть забракован если:

1. Влажность проникла во флакон и произошло слипание.
2. Перерастворенный реагент имеет меру поглощения света против воды больше 1.2 при 405 нм.

### СБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦА

Активность холинэстеразы стабильна в неразбавленной сыворотке целых 2 недели при 2 - 8°C и до 3 месяцев при 20°C. Сгусток должен быть удален из сыворотки немедленно. ЭДТА не ингибирует активность холинэстеразы.

Подготовка образца для измерения активности холинэстеразы в цельной крови проводится следующим образом. Внесите кровь, содержащую ЭДТА как противосвертывающее средство. Тщательно смешайте цельную кровь. Часть крови удаляется для определения гематокрита. Приготовьте гемолизат крови путем смешивания 0.1

мл крови с 1.9 мл дистиллированной воды. Смешивайте до завершения гемолиза. Центрифугируйте остающуюся кровь, чтобы получить чистую плазму. Определите действия холинэстеразы в плазме и гемолизате, следуя указаниям в разделе "Процедура". Образцы для определения активности холинэстеразы гемолизата устойчивы в течение 8 часов во время хранения при 2 - 8°C.

### ВЛИЯЮЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Образцы гемолизированной сыворотки не должны использоваться. Известны определенные лекарства и другие вещества, которые влияют на активность холинэстеразы.

### ТРЕБУЕМЫЕ, НО НЕ ПОСТАВЛЯЕМЫЕ МАТЕРИАЛЫ

1. Анализатор, с секцией контроля температуры, способен точно измерять меру поглощения света при 405 нм.
2. Пробирки для анализа с оптическими свойствами, подходящими для использования при 405 нм.
3. Пипетирующие устройства для точного распределения объемом, необходимых для анализа.
4. Таймер.
5. Растворы дибукаина и фторида натрия.

### АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА

Обратитесь к располагаемой аппликации.

### РУЧНАЯ ПРОЦЕДУРА

1. Перерастворите реагент согласно инструкциям.
2. Пипетируйте 1.0 мл реагента в соответствующие пробирки и доведите до 30°C или 37°C.
3. Обнулите спектрофотометр водой при 405 нм.
4. Добавьте 10 мкл образца (сыворотки, плазмы или гемолизата). Хорошо перемешать.
5. Через 15 секунд измерьте меру поглощения света (A1). Возвратите пробирку в 30°C или 37°C еще на 30 секунд измерьте другую меру поглощения света (A2).
6. Вычислите  $\Delta A$  30 секунд, вычитая A1 от A2, Умножьте на 2, чтобы получить  $\Delta A$  в минуту.
7. Вычислите активность холинэстеразы (Е/л) образца, умножив  $\Delta A$ /мин. на 7426.

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ОБЪЕМЫ

Активность холинэстеразы может также быть определена использованием 10 мкл образца и 3 мл реагента. Должны использоваться различные калибровочные коэффициенты, если объемы образца и реагента отличаются от объемов, требуемых в процедурах.

### АНАЛИЗЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ДИБУКАИНА И ФТОРИДА

При следовании тех же самых этапов, поданных в Процедуре, определите активность холинэстеразы в образцах, использующих реагенты с содержанием дибукаина и фторида, подготовленных согласно инструкциям, предоставленных в Подготовке Реагентов. Для определения процента активности ингибирования см. Калькуляции.

### ВЫЧИСЛЕНИЯ (КИНЕТИЧЕСКИЕ)

$$\text{Активность холинэстеразы (Е/л)} = \frac{\Delta A/\text{мин.} \times TV \times 1000}{13.6 \times LP \times SV}$$

$\Delta A/\text{min.}$	= изменение абсорбции в минуту.
TV	= Общий объем (1.01 мл)
SV	= Объем образца (0.01 mL)
13.6	= Абсорбция DTNB миллимолях
LP	= Световая дорожка (1 см)
1000	= Переведение Е/мл в Е/л

$$\text{Активность холинэстеразы (Е/л)} = \frac{\Delta A/\text{мин.} \times TV \times 1000}{13.6 \times 1.0 \times 0.01}$$

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Подготовка гемолизата предусматривает 20-кратное разбавление образца; поэтому, активность холинэстеразы в гемолизате, вычисленная формулой выше, должна быть умножена на 20, чтобы компенсировать разбавление.

$$\begin{array}{l} \text{Пример:} \quad A_1 = 0.316 \quad A_2 = 0.491 \\ A_2 - A_1 = 0.491 - 0.316 = 0.175 \\ \Delta A/\text{мин.} = \Delta A/30 \text{ секунд} \times 2 = 0.350 \end{array}$$

Активность холинэстеразы (Е/л) в образце =  $0.350 \times 7426 = 2599$

**ИНГИБИРОВАНИЕ ДИБУКАИНА И ФТОРИДА**

Вычислите процент ингибирования активности холинэстеразы (Е/л) следующим образом:

$$\text{Ингибирование активности холинэстеразы дибукаином (\%)} = 100 - \frac{(\text{CHE} - \text{D})}{\text{CHE}} \times 100$$

$$\text{Ингибирование активности холинэстеразы фторидом (\%)} = 100 - \frac{(\text{CHE} - \text{F})}{\text{CHE}} \times 100$$

Где:

CHE = активность холинэстеразы в образце определяется использованием реагента без содержания и дибукаина и фторида.

CHE-D = активность холинэстеразы в образце определяется использованием реагента, содержащего 0.3 ммоль/л дибукаина.

CHE-F = активность холинэстеразы в образце определяется использованием реагента, содержащего 40 ммоль/л фторида натрия.

**Активность холинэстеразы эритроцитов:**

Активность холинэстеразы эритроцитов (EChE) высчитывается из результатов, полученных для значения активности холинэстеразы эритроцитов плазмы (PChE), гемолизата холинэстеразы (HChE) и гематокрита (Hct) в образце.

$$(\text{HChE}) = (\text{EChE} \times \text{Hct}^*) + (\text{PChE} \times (1 - \text{Hct}^*))$$

$$\text{EChE} = \frac{\text{HChE} - (\text{PChE} \times (1 - \text{Hct}^*))}{\text{Hct}^*}$$

\* Значение гематокрита, выраженное как десятичное число.

**ОГРАНИЧЕНИЯ**

1. С чрезвычайно липемической или иктерической сывороткой необходимо провести коррекцию бланком.
2. Эта процедура не включает изучений дибукаина или фторида на сопротивление.

**КАЛИБРОВКА**

Процедура калибровки делается посредством миллимолярной поглотительной способности 5-тио-2-нитробензойной кислоты, которая составляет 13.6 при 405 нм. Диапазон линейности этого реагента изменяется в зависимости от соотношения образца к реагенту. Верхний предел линейности согласно этой процедуре - 8,000 Е/л с соотношением образца к реагенту 1:100.

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

Рекомендуется, чтобы высокие и низкие значения холинэстеразы были включены в каждый набор анализа.

Для контроля качества может использоваться имеющийся в продаже контрольный материал с установленными значениями холинэстеразы.

Коэффициент преобразования температуры для человеческой сыворотки

Assay Temp.	Желаемая температура		
	25	30	37
25	1.00	1.20	1.55
30	0.83	1.00	1.29
37	0.65	0.77	1.00

**ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ**

Ожидаемый диапазон активности холинэстеразы сыворотки при 30°C был определен в следующем виде:

Сыворотка	3100-7700 Е/л
Плазма	1700-4100 Е/л
Цельная кровь	3300-5500 Е/л
Эритроциты	4400-8200 Е/л

**РАБОЧИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

1. Линейность: 8000 МЕ/л при 30°C.
2. Чувствительность: изменение меры поглощения света 0.001/мин. при 405 нм соответствует 7.4 Е/л активности холинэстеразы при указанных условиях этой системы анализа.
3. Сравнение: изучение, проведенное между данной процедурой и одним из товарных изделий на цельной крови привело к коэффициенту корреляции 0.96 с регрессией  $y = 1.00 \times -103$  (к-

- во = 20), и на сыворотке / плазме привело к коэффициенту 0.99 с регрессией  $y = 0.96 \times + 63$  (к-во = 47).
4. Изучения точности:

В пределах процедуры			Между процедурами		
Среднее (Е/л)	СО	КВ (%)	Среднее (Е/л)	СО	КВ (%)
4539	173	3,8	4603	153	3,3
3717	162	4,4	3760	151	4,0

**ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА:****ЧМП «ДИАМЕБ»**

Ул. Черновола, 97, г. Ивано-Франковск, 76005

Тел.: (0342) 775122 Тел/факс: (0342) 775612

E-mail: [info@diameb.com](mailto:info@diameb.com)