

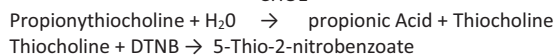


**CHOLINESTERASE (PTC)
ХОЛИНЕСТЕРАЗА
КИНЕТИЧЕН МЕТОД**

ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО, КИНЕТИЧНО ИЗСЛЕДВАНЕ НА ХОЛИНЕСТЕРАЗА В СЕРУМ, ПЛАЗМА ИЛИ ПЪЛНА КРЪВ

ПРИНЦИП НА МЕТОДА

СНОЕ



Полученият при реакцията жълт 5-Thio-2-nitrobenzoate има максимум на абсорбцията при 405nm. Скоростта на промяна на абсорбцията измерена при 405nm е право пропорционална на активността на холинестеразата.

РЕАГЕНТИ:

При разтваряне според инструкциите на опаковката реагентът съдържа:

- Propionylthiocholine 4 mM
- DTNB 0.4mM
- Buffer

Нереактивни стабилизатори и пълнители.

ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТИТЕ

ОБЩА ХОЛИНЕСТЕРАЗНА АКТИВНОСТ

Разтворете реагента с количеството дейонизирана вода, посочено на опаковката. След добавянето на водата, веднага запустете и разбъркайте като няколко пъти обърнете нагоре-надолу.

ДИБУКАИНОВ ИНХИБИТОР

Разтворете едно шишенце реагент с дибукаинов разтвор вместо с дейонизирана вода.

ФЛУОРИДЕН ИНХИБИТОР

Разтворете едно шишенце реагент с флуориден разтвор вместо с дейонизирана вода.

ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ

Реагентите са само за "ин vitro" употреба. Трябва да се спазват обичайните предпазни мерки за работа с лабораторни реагенти.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

Съхранявайте реагентите при 2-8°C. Реагентът е стабилен до изтичане на срока на годност, указан на опаковката. Разтвореният реагент е стабилен 3 дни в хладилник (2-8°C) и 6 часа при стайна температура.

Реагентът трябва да бъде изхвърлен ако в сухия реагент има образувани бучки, които могат да се дължат на евентуално проникване на влага. Разтвореният реагент не трябва да се използва, ако абсорбцията, измерена при 405 nm спрямо вода е по-висока от 1.2.

СЪБИРАНЕ И СЪХРАНЕНИЕ НА ПРОБИТЕ

Холинестеразната активност е стабилна в неразреден серум до 2 седмици при 2-6 °C и до 3 месеца при -20 °C. Серумът трябва да бъде отделен от съсиреците незабавно. EDTA не инхибира холинестеразната активност.

ИНТЕРФЕРИРАЩИ СУБСТАНЦИИ

Не трябва да се използва хемолизиран серум. В литературата са описани медикаментите и веществата, които влияят на холинестеразната активност.

ПРОЦЕДУРА ЗА МАНУАЛНА РАБОТА

1. Разтворете реагента според инструкциите.
2. Пипетирайте по 1.0ml от реагента в подходящи епруветки и ги оставете да се темперират при 30°C или 37°C.
3. Нулирайте спектрофотометъра с вода при 405 nm.
4. Добавете 0.010ml (10µl) от пробата (серум, плазма или хемолizat) към реагента. Разбъркайте добре.
5. След 15 секунди отчетете абсорбцията A1. Върнете епруветката при 30°C или 37°C за още 30 секунди и измерете отново абсорбцията A2.
6. Изчислете средната разлика в абсорбция ΔA за 30 секунди като извадите A1 от A2. Умножете по 2, за да получите ΔA за минута.
7. Изчислете холинестеразната активност (U/L) на пробата като умножите ΔA/min по фактор 7426.

Резервна процедура: Холинестеразната активност може да се измери като се използва 0.010ml (10µl) проба към 3.0ml реагент. Ако количествата проба и реагент са различни от тези, които се изискват в процедурата, трябва да се използва различен калибрационен фактор.

ИЗСЛЕДВАНЕ ЗА ДИБУКАИНОВА ИЛИ ФЛУОРИДНА ИНХИБИЦИЯ

Като следвате описаната по-горе процедура, изчислете холинестеразната активност на пробите като използвате приготвени с дибукаинов или

флуориден разтвор реагенти. За да определите процента инхибиция на активността, вижте "Изчисления".

ИЗЧИСЛЕНИЯ

КИНЕТИЧНА ПРОЦЕДУРА

$$U/L = \frac{\Delta A/min \times TV \times 1000}{13.6 \times LP \times SV} = \frac{\Delta A/min \times TV \times 1000}{13.6 \times 1.0 \times 0.01}$$

- Където:
- ΔA/min = средна разлика в абсорбцията на минута
- TV = общ обем на реакцията (1.01ml)
- SV = обем на пробата (0.01ml)
- 13.6 = милимоларна абсорбтивност на DTNB
- LP = светлинен път (1cm)
- 1000 = преизчисление на IU/ml в IU/L

Забележка: Приготвянето на хемолizat включва 20-кратно разреждане на пробата. В този случай резултатът, получен от горната проба трябва да се умножи по 20.

Пример: A1=0.316, A2=0.491

$$A2-A1 = 0.491 - 0.316 = 0.175$$

$$\Delta A/min = 0.175 \times 2 = 0.350$$

$$0.350 \times 7426 = 2599$$

ДИБУКАИНОВА И ФЛУОРИДНА ИНХИБИЦИЯ

Дибукаинова инхибиция на холинестеразната активност (%)

$$100 - \frac{(CHE - D)}{CHE} \times 100$$

Флуоридна инхибиция на холинестеразната активност (%)

$$100 - \frac{(CHE - F)}{CHE} \times 100$$

Където CHE – холинестеразна активност, измерена с обикновен холинестеразен реагент

CHE – D - холинестеразна активност на пробата, измерена с реагент приготвен с 0.3 mMol/L дибукаин

CHE – F - холинестеразна активност на пробата, измерена с реагент приготвен с 40 mMol/L натриев флуорид

Еритроцитна холинестеразна активност:

ESChE – изчислява се от резултатите получени за плазмена еритроцитна холинестеразна активност HChE и хематокрит Hct (стойност на хематокрит в десетичен еквивалент) на пробата

$$HChE = (EChE \times Hct) + (PChE \times (1-Hct))$$

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

ОГРАНИЧЕНИЯ

Силно липемични или иктерични проби трябва да се правят с корекция със сляпа проба.

Процедурата не включва дибукаин или флуорид в изследвания за резистентност.

ФАКТОРИ ЗА ТЕМПЕРАТУРНА КОНВЕРСИЯ

темп. на пробата желана температура фактор

30	37	1.29
37	30	0.77

ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Дадените стойности са за 30 °C.
Серум: 3100-7700 U/L

Плазма: 1700-4100 U/L
Пълна кръв: 4400-8200 U/L

Еритроцити: 4400-8200 U/L

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ТЕСТА

1. Линеиност: 8000 IU/L при 30 °C.

2. Сравнения: Изследване, сравняващо настоящия метод с подобен метод даде за пълна кръв коефициент на корелация 0.96 и уравнение на регресията y = 1.00x - 103, а за серум/плазма 0.99 и y = 0.96x + 63.

3. Точност:

	В серия	Между серии
Средна стойн.	4539	3717
Станд. откл.	173	162
C.V.(%)	3.8	4.4

RE:03/03

Производител: Teco Diagnostics, 1268 N. Lakeview Avenue, Anaheim, CA 92807 USA Tel. 714 693 7788 Fax: 714 693 3838

Вносител: "ЕТГ" ЕООД, София 1504, ул. Тракия №15, офис 1