



**NÁVOD K POUŽITÍ**

**CHOLINESTERÁZA 360**

**KATALOGOVÉ ČÍSLO 706**

**IVD** **CE**



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## **POUŽITÍ**

Souprava Cholinesteráza 360 se používá ke stanovení enzymové aktivity cholinesterázy v krevním séru na automatických analyzátorech.

## **SOUHRN**

Rozeznáváme dva typy enzymů, které jsou schopny hydrolyzovat acetylcholin. Acetylcholinesteráza, která selektivně hydrolyzuje acetylcholin, je označována jako pravá cholinesteráza se nachází v erytrocytech, v plicích, slezině, nervových zakončeních a šedé kůře mozkové. Tento enzym štěpí acetylcholin uvolňovaný z nervosvalových destiček na zakončeních vláken motorických nervů, čímž dochází k uvolnění dříve staženého svalu. Druhým typem cholinesterázy je tak zvaná pseudocholinestráza, která štěpí i jiné estery cholinu a je obsažena v játrech, pankreatu, srdci a séru. Pseudocholinesteráza vzniká v ribosomech jaterních buněk a je uvolňována do krevního oběhu.

Diagnostický význam má především sledování snížené aktivity cholinesterázy, která může být způsobena poruchou proteosyntézy při těžké hepatopatii, ale i při proteinové malnutrici. Snížení aktivity cholinesterázy může být dále způsobeno intoxikací organofosfáty a insekticidy. Zvýšení aktivity cholinesterázy je pozorováno u nemocných s vystupňovanou proteosyntézou na příklad při nefrotickém syndromu, u alkoholismu a některých dalších stavech. Sledování zvýšené aktivity cholinesterázy však nemá diagnostický význam<sup>1</sup>.

## **PRINCIP METODY**

Cholinesteráza katalyzuje hydrolyzu substrátu butyrylthiocholinu za vzniku butyrátu a thiocholinu. Thiocholin redukuje hexakvanoželezitan na hexakvanoželeznatan. Pokles absorbance při 405 nm je úměrný aktivitě cholinesterázy<sup>2</sup>.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## **SLOŽENÍ SOUPRAVY**

1 ČINIDLO	3 x 100 ml:	Fosfátový pufr	100 mmol/l
		Hexakvanoželezitan draselný	2,5 mmol/l
		Detergenty, stabilizátory	
2 ČINIDLO	1 x 60 ml:	Butyrylthiocholin	89,8 mmol/l

## **PŘÍPRAVA ČINIDEL**

1 ČINIDLO a 2 ČINIDLO jsou připraveny k přímému použití.

## **STABILITA SOUPRAVY**

1 ČINIDLO a 2 ČINIDLO jsou při teplotě 2–8 °C stabilní až do doby expirace. Činidla chráníme před světlem.

## **POUŽITÝ MATERIÁL**

Ke stanovení se používá krevní sérum. Sérum lze skladovat při teplotě +20 až +25 °C 8 hodin, při +4 až +8 °C 7 dní a při teplotě –20 °C 1 rok<sup>3</sup>. Ke stanovení enzymatické aktivity CHS lze použít i plasmu. Jako protisrážlivé činidlo se používá EDTA nebo heparin.

## **POSTUP ANALÝZY**

	VZOREK [μl]	STANDARD [μl]	KONTR. VZOREK [μl]
SÉRUM	20	–	–
STANDARD	–	20	–
1 ČINIDLO	1000	1000	1000

Vše se promíchá a po 5 minutové inkubaci při 37 °C přidáme



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

	VZOREK [ $\mu$ l]	STANDARD [ $\mu$ l]	KONTR. VZOREK [ $\mu$ l]
2 ČINIDLO	200	200	200

Vše se promíchá a inkubuje 90 vteřin při 37 °C. Po inkubaci odečteme počáteční absorbanci a měření opakujeme po 30, 60 a 90 vteřinách. Z měření vypočítáme pokles absorbance za 30 vteřin  $dA/30$ vteřin. Měření provádíme při 405 nm, při bichromatickém měření je pomocná vlnová délka 500 nm.

## **VÝPOČET**

Aktivita CHS( $\mu$ kat/l) =  $CHS_{KAL}/dA_{KAL} \cdot dA_T$

$CHS_{KAL}$  - aktivita CHS v kalibrátoru ( $\mu$ kat/l)

$dA_{KAL}$  - pokles absorbance kalibrátoru za 30 vteřin

$dA_T$  - pokles absorbance testu za 30 vteřin

## **KALIBRACE A KONTROLA**

Ke kalibraci se používají komerčně dodávané kalibrátory například LYONORM kalibrátor firmy ERBA-LACHEMA. Ke kontrole lze použít kontrolní séra dodávaná řadou firem, například LYONORM HUM N a HUM P firmy ERBA-LACHEMA.

## **REFERENČNÍ INTERVAL<sup>4</sup>**

Dospělí v séru při 37 °C

Muži 66 – 180  $\mu$ kat/l

Ženy 77 – 188  $\mu$ kat/l



## ZNAKY ANALYTICKÉ METODY

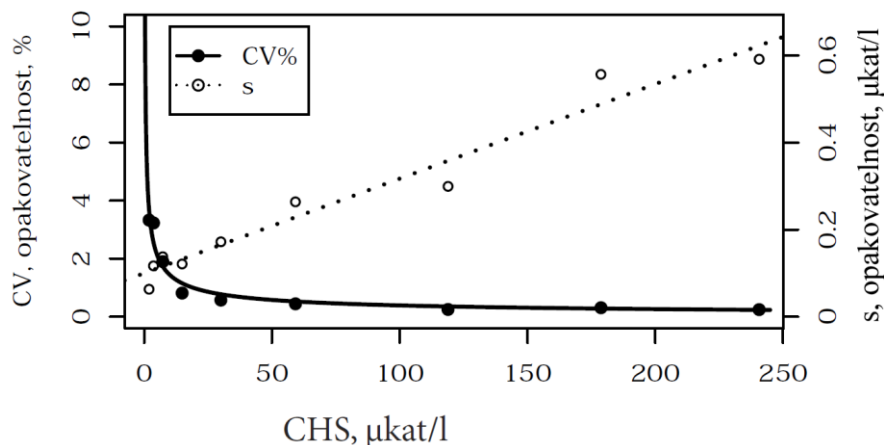
### **NEPŘESNOST**

Odhady nepřesnosti v sérii a celkové nepřesnosti byly získány měřením na základě protokolu EP5-A NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)<sup>5</sup>. Celkový počet pozorování byl N=80 u každé koncentrace séra. Výsledky v tabulce jsou platné pro měření na analyzátoru Hitachi 911 firmy Roche.

Vzorek	Průměr μkat/l	Směrodatná odchylka μkat/l				Celková CV %	N
		uvnitř série	Mezi sériemi	mezi dny	celková		
Nízký sérový pool	54,5	0,59	0	1,02	1,18	2,16	80
Vysoký sérový pool	199,1	1,12	0,39	2,44	2,71	1,36	80

### **PROFIL PŘESNOSTI**

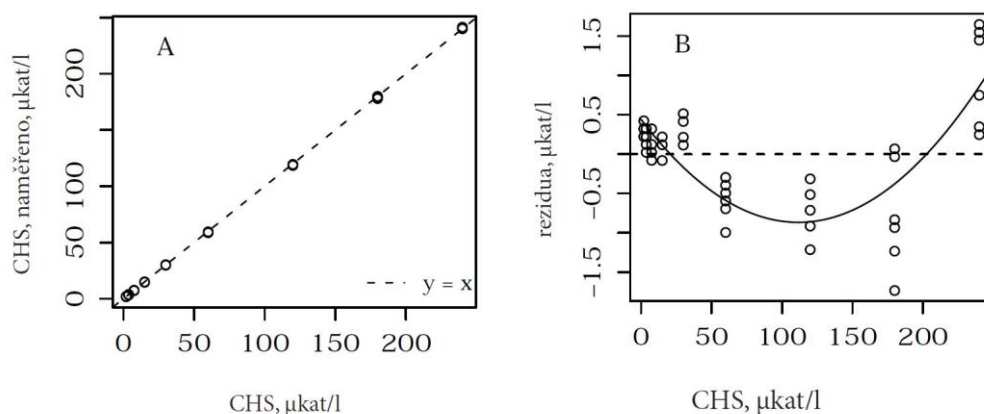
Profil přesnosti byl sestaven na základě opakovaného měření vzorků sér pacientů a vzorků ředěných fyziologickým roztokem s aktivitou v rozmezí 1,9 – 240 μkat/l. Při aktivitě cholinesterázy 1,90 μkat/l je variační koeficient (opakovatelnost) 3,7 % a s rostoucí aktivitou cholinesterázy postupně klesá, až na hodnotu 0,3 % při aktivitě cholinesterázy 240 μkat/l.





## LINEARITA

Linearita stanovení aktivity cholinesterázy byla testována v oblasti koncentrací 1,9 – 240  $\mu\text{kat/l}$ . Statistické testy svědčí o odchylkách od linearit v uvedeném rozsahu (F-test  $(7,54) = 3,9$   $p < 0,03$ , program<sup>6</sup>), přímka prochází počátkem. Odchyly od čistě lineárního průběhu odpovídají možnostem principu měření a souvisí rovněž s obsahem detergentů v reakční směsi a citlivostí metody. Prakticky jsou však odchylky malé a při srovnání s žádoucím bias pro katalytickou aktivitu cholinesterázy z biologické variability stanovení<sup>9</sup> (2,9 %) linearita vyhovuje (viz graf residuí).



### Test linearit stanovení cholinesterázy

**A.** Regresní přímka  $y = 0,990 \cdot x - 0,018$ ,  $r = 0,9999$ ,  $s_{y/x} = 0,66$   $\mu\text{kat/l}$ ,  $n = 63$ .

Úsek na ose y (0,018 g/l) je statisticky nevýznamný,  $p > 0,05$ .

**B.** Graf residuí. Maximální velikost residuí je asi 1,5  $\mu\text{kat/l}$  při aktivitách  $> 100$   $\mu\text{kat/l}$ .

### MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

Výpočtem z opakovaného měření blanku ( $n = 20$ ) byla mez detekce odhadnuta na 0,24  $\mu\text{kat/l}$  a mez stanovitelnosti<sup>6</sup> na 0,72  $\mu\text{kat/l}$ .

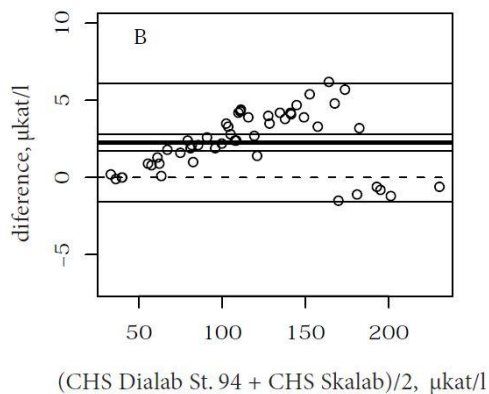
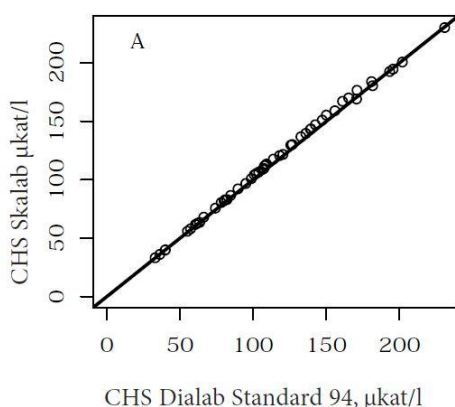
### INTERFERENCE

Při stanovení cholinesterázy v séru interferuje hemoglobin, proto hemolytické vzorky neanalyzujeme. Bilirubin neinterferuje do hodnoty 340  $\mu\text{mo/l}$ . Young a spol. uvádějí vliv léků a dalších látek, které interferují při stanovení cholinesterázy v séru<sup>7</sup>.



## **SROVNÁNÍ SE SOUPRAVOU DIALAB STANDARD METOD 94**

Bylo analyzováno 50 vybraných vzorků pacientů metodou stanovení cholinesterázy pomocí soupravy firmy DIALAB Cholinesteráza Standard Method 94 na analyzátoru Hitachi 911. Stejně vzorky byly analyzovány soupravou Cholinesteráza 360 firmy Skalab na shodném analyzátoru. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny neparametrickou metodou podle Passinga a Babloka<sup>8</sup> a metodou diferenčního grafu. Pro vyhodnocení byl použit program<sup>6</sup>. Na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$  je směrnice regresního vztahu signifikantně významná od 1,00 – proporcionalní složka chyby je +3,1 %; úsek na ose y je nesignifikantní, přímka prochází počátkem. Bias vypočtený z regresní rovnice je při aktivitě 100  $\mu\text{kat/l}$  2,5 % a pro nižší aktivity se zmenšuje.



### **Srovnání stanovení Cholinesterázy Dialab Standard metod 94 a Cholinesterázy 360**

- A.** Passing-Bablokova regrese. Regresní rovnice  $y = 1,031 \cdot x - 0,579$ ,  $r = 0,9998$ . Intervaly spolehlivosti koeficientů jsou v tabulce.
- B.** Diferenční graf. Průměrná diference 2,28  $\mu\text{kat/l}$  ( $p < 0,001$ , párový t-test), medián diferencí 2,4  $\mu\text{kat/l}$  je rovněž signifikantní (Wilcoxonův párový test,  $p < 0,001$ ).



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

## Srovnání metody stanovení Cholinesteráza 360 SKALAB a Cholinesteráza DIALAB

Passingova-Bablokova regrese	n	Směrnice (95% CI)	Intercept (95% CI)	r *
	50	1,031	- 0,579	0,9998
		(1,017 do 1,039)	(- 1,36 do 0,60)	

\* pořadový korelační koeficient

\*\* NS nesignifikantní

Celková povolená analytická chyba (TEa vypočtená z biologické variability) pro aktivitu cholinesterázy<sup>9</sup> 7,4 % je přísná, pro bias blížící se nule vyžaduje reprodukovatelnost okolo 1,5 % pro metriku sigma = 5.

## LITERATURA

1. Racek J et al.: *Klinická biochemie*, Galen, Praha, 82 - 83, 1999, ISBN 80-7262-023-1.
2. DGKCH, Proposal of Standard Methods for the determination of enzyme catalytic concentrations in serum and plasma at 37<sup>0</sup>C. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 30,163 (1992).
3. Jabor A., Zámečník M.: *Preanalytická fáze 2005, Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. ČLS JEP a SEKK, Praha 2005, s. 84. ISBN 80-239-5198-X.
4. Thomas L. (ed.): *Clinical laboratory diagnostics: use and assesment of clinical laboratory results*. (English). TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 1998, s. 66, ISBN 3-9805215-4-0.
5. National Comitée for Clinical Chemistry Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Device; Aprovede Guidline. NCCLS document EP5-A, 1997.
6. Linnet K: *A Program for Statistical Analysis in Clinical Biochemistry*. Version 4.2.0. Denmark, 1997-2001.
7. Young DS, Pestaner LC, Gibberman V. Effects of drugs on clinical laboratory tests. *Clin Chem* 1975;21(5):1D-432D.
8. Passing H, Bablok W.: *A New Biometrical Procedures for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods*. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983;21:709-720.





SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy  
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399  
fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

9. Ricos C, Alvarez V, Cava F et.al. Current databases on biologic variation:pros, cons and progress. Scand J Clin Lab Incest 1999;59:491-500.

**Datum poslední revize: 7. 5. 2015**

Výrobce:



**SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy**  
Tel.: +420 461 531 163  
Mobil: +420 777 176 107, +420 777 324 399  
Fax: +420 461 530 619  
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz



Návod k použití

CHOLINESTERÁZA 360  
kód 706



Strana 9/9