

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

09 листопада 2012 р.

І.Б. Демченко

Код за НК 024:2019 – **53460**

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами

30 жовтня 2012 р.

І.П. Семенів

ТУ У 24.4-24607793-020-2003

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ТРИГЛІЦЕРИДІВ У СИРОВАТЦІ І ПЛАЗМІ КРОВІ ЕНЗИМАТИЧНИМ КОЛОРИМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

ПРИЗНАЧЕННЯ

IVD

Набір застосовується для визначення концентрації тригліцеридів у сироватці крові і плазмі людини в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований (з урахуванням холостих та калібрувальних проб) на відповідну кількість визначень концентрації тригліцеридів (Див. *Примітку 4*).

REF	мікро	напівмікро	макро	REF	мікро	напівмікро	макро
<u>HP022.02</u>	50	25	12	<u>HP022.04</u>	500	250	125
<u>HP022.03</u>	100	50	25				

Діапазон визначаємих концентрацій - від 0,1 ммоль/л до 11,4 ммоль/л.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 5 %.

Чутливість¹³ на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 0,01 ммоль/л (505 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 МЕТОДУ¹⁾

Тригліцериди — ліпаза —> гліцерин + жирні кислоти;

Гліцерин + АТФ — гліцерокіназа —> гліцерил-3-фосфат + АДФ;

гліцерил-3-фосфат + O₂ — гліцерофосфатоксидаза —> діоксиацетон фосфат + 2H₂O;

H₂O₂ + 4-амінофеназон + 4-хлорфенол — пероксидаза —> хінонімін + 4 H₂O.

Концентрацію хіноніміну визначають фотометрично при довжині хвилі **505 нм**, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації тригліцеридів в дослідному зразку^{1,2,3}.

СКЛАД НАБОРУ

1. Розчин ферментів рН 7,5

- PIPES – 40 ммоль/л;
- 4-хлорфенол – 5 ммоль/л;
- MgSO₄ – 1 ммоль/л;
- 4-амінофеназон – 0,5 ммоль/л.
- Ліпаза - 1500 МОд/Л;
- Гліцерокіназа – 200 МОд/Л;
- Гліцерофосфатоксидаза – 1000 МОд/Л;
- Пероксидаза – 250 МОд/Л.

HP022.02 – 1 флакон з (50 ± 2) мл;

HP022.03 – 2 флакони по (50 ± 2) мл;

HP022.04 – 5 флаконів по (100 ± 2) мл;

2. Калібрувальний розчин

(відповідає концентрації
(2,26 ± 0,10) ммоль/л тригліцеридів)

HP022.02, HP022.03 – 1 ампула з (1,0 ± 0,1) мл;

HP022.04 – 5 ампул по (1,0 ± 0,1) мл;

ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ

Сироватка, плазма.

Сироватка, ЕДТО- або гепаринізована плазма крові після 12 годинного голодування. Гемоліз неприпустимий. 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 **505 (490-550) нм** в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм (**Можливо використання автоматичного аналізатора. Інструкція для автоматичного аналізатора висилається за замовленням споживача**).

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 1, 0.1 та 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РЕАКТИВІВ

1. **Розчин ферментів** готовий до роботи. Після використання реактиву для аналізу НЕГАЙНО закрийте флакон, щоб уникнути випарювання або контамінації реактиву. **Розчин світлочутливий.** Максимальна екстинція **Розчину ферментів** проти води при довжині хвилі 505 нм не повинна перевищувати 0,4.

УВАГА! Постійно пам'ятайте про те, що поверхня шкіри людини містить велику кількість тригліцеридів. Щоб уникнути отримання завищених результатів та псування реактиву, використовуйте на всіх стадіях преаналітичної підготовки проб і самого аналізу гумові рукавички.

2. **Калібрувальний розчин** - готовий до роботи. Після розкриття реактив зберігають у холодильнику. При зберіганні в герметичній ємності розчин стійкий.
3. **Реактиви 1 та 2** стабільні до закінчення гарантійного терміну придатності (при дотриманні умов зберігання, зазначених на упаковці).

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводять згідно зі схемою, даною в таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірку, мл	Дослідна проба			Калібрувальна проба			Холоста проба		
	Макро	Напів-мікро	Мікро	Макро	Напів-мікро	Мікро	Макро	Напів-мікро	Мікро
Аналізуємий матеріал	0,04	0,02	0,01	-	-	-	-	-	-
Дистильована вода	-	-	-	-	-	-	0,04	0,02	0,01
Калібрувальний розчин	-	-	-	0,04	0,02	0,01	-	-	-
Розчин ферментів	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00	4,00	2,00	1,00

Розчин у пробірці ретельно перемішують і витримують у термостаті при плюс 37 °С протягом **10 хв** або інкубують **15 хв** при температурі від плюс 20 °С до плюс 25 °С. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{дос}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{кал}}$) **проти холостої проби**. Остаточне забарвлення стабільне протягом **30 хв** після закінчення інкубації за умови запобігання від улучення прямого сонячного світла. Фотометрування - див. розділ «Обладнання»

РОЗРАХУНОК

Здійснюють згідно формули (1):

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 2,26 \text{ ммоль/л, де} \quad (1)$$

C - концентрація тригліцеридів в пробі, ммоль/л;

$E_{\text{дос}}$ - оптична щільність дослідної проби, од. оптичної щільності;

$E_{\text{кал}}$ - оптична щільність калібрувальної проби, од. оптичної щільності;

2,26 - концентрація тригліцеридів в калібрувальному розчині, ммоль/л.

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В організмі людини тригліцериди містяться у вигляді ефірів гліцерину і жирних кислот.

В організм людини тригліцериди надходять з їжею, а також синтезуються в печінці і в інших тканинах. Вони транспортуються в плазмі ліпопротеїнами і виділяються в жирових тканинах, в м'язах та ін. Основною функцією тригліцеридів є забезпечення клітин енергією.

Первинне підвищення рівня тригліцеридів:

Гіперліпопротеїнемії I, II, III, IV и V типів, викликані родинною або спорадичною ендегенною гіпертригліцеридемією; родинний дефіцит ліпопротеїналіпази; дефіцит кофактора ліпопротеїналіпази (АПО-С II); родинна дис-β-ліпопротеїнемія; родинна комбінована гіперліпідомія, ерозійні або плоскі ксантоми.

До вторинного підвищення ТГ можуть вести наступні первинні хвороби або стани: ожиріння; порушення толерантності до глюкози; ерозійні або плоскоклітинні ксантоми; захворювання печінки і

жовчовивідної системи (вірусний гепатит, алкоголізм, алкогольний цироз, білярний цироз, позапечінкова обтурація жовчних шляхів); захворювання підшлункової залози (гострий і хронічний панкреатит); захворювання нирок (нефротичний синдром, хронічна ниркова недостатність); захворювання серцево-судинної системи (гіпертонічна хвороба, гострий інфаркт міокарду, хронічна ІБС, тромбоз судин мозку); ендокринні захворювання (гіпотиреоз, цукровий діабет ожиріння, порушення толерантності до глюкози); подагра, вагітність, глікогенози I, III і VI типів; велика таласемія, синдром Дауна; респіраторний дистрес-синдром; синдром Вернера, невротична анорексія; ідіопатична гіперкальцемія; гостра переважаюча порфірія, стрес.

Гіпотригліцеридемія викликається наступними факторами: Гіполіпопротеїнемія і абеталіпопротеїнемія; хронічні обструктивні захворювання легенів; інфаркт мозку, гіпертиреоз, гіперпаратиреоз; лактозурія, недостатність харчування; синдром мальабсорбції, лімфангієктазія кишечника, ураження паренхіми печінки (термінальна стадія)^{9,10}.

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

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Білірубін до 855 мкмоль/л (0,5 г/л), глюкоза до 55,5 ммоль/л (10 г/л) и аскорбінова кислота до 0,6 ммоль/л (0,1 г/л) не впливають на результат визначення.

На хід визначення також можуть впливати деякі ліки і речовини¹¹:

(наприклад: ацетамінофен, N-ацетилцістеїн (NAC), метамізол приводять к одержанню фальшиво занижених результатів), аскорбінова кислота, вільний гліцерин, б-блокатори, катехоламіни, холестірамін, кортикостероїди, циклоспорин, даназол, діазепам, діуретики, естрогени, етанол, етретинат, інтерферон, ізотретиноїн, ретинол, міконазол (в/в), надмірне вживання висококалорійної їжі, дієта з високим вмістом вуглеводів, аміносаліцилова кислота, аспарагіназа, фенодіноксихолієва кислота (хенодіол), доксазосин, похідні фібринової кислоти (наприклад, клофібрат, гемфіброзил), гепарин, ніацин, омега-3-жирні кислоти (риб'ячий жир), празозин, прогестини, теразолін.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції і процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями, визначеними даним методом. Наприклад: Diason N, Diason P (Австрія), «Ліонорм» (Чехія), «Біоконт С» (Росія), "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.

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ

Нормальні показники - 0,15-1,71 ммоль/л;

Граничні показники - 1,71 -2,29 ммоль/л;

Патологічні показники - понад 2,29 ммоль/л.

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

ПРИМІТКИ

1. Положення пацієнта до і під час збору крові впливає на концентрацію деяких параметрів в крові, включаючи тригліцериди, оскільки обсяг плазми знижується на 12% при зміні положення тіла від лежачого до стоячого.

2. Рівень ТГ в плазмі декілька нижче, ніж в сироватці.

3. Майже всі клінічні лабораторії для визначення ТГ застосовують ферментативні методи. Для точного визначення ТГ, особливо в зразках з високими концентраціями ТГ, в холостій пробі враховується вміст вільного гліцерину. У нормі рівень гліцерину приблизно еквівалентний рівню ТГ 0,11 ммоль/л. При деяких патологічних станах рівень гліцерину підвищений. У пробах, що стояли тривалий час при кімнатній температурі, кількість гліцерину може бути підвищена через гідроліз ТГ. У цих випадках холості проби на гліцерин дають завищені результати, що приводить до заниження дійсного рівня ТГ. Ферментні методи, що виконуються **без холостих проб на гліцерин**, дають **завищення результатів ТГ** на 0,11-0,23 ммоль/л.

4. Розраховано при витраті розчину реагенту 1,0 мл (мікро-), 2,0 мл (напівмікро-), 4,0 мл (макро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:

Розчин ферментів : Аналізуємий розчин = 100 : 1

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Розчин ферментів включає 4-хлорфенол (отруйна речовина). Калібрувальний розчин включає азид натрію (отруйна речовина).

ПАРАМЕТРИ ПРОГРАМУВАННЯ

Найменування набору реактивів	<i>Тригліцериди Ф</i>
Тип аналізатора (напівавтомат/автомат)	будь-який
Метод виміру	КТ
Зміна оптичної щільності	Збільшується
Довжина хвилі, нм	505
Вимір проти	Холостої проби
Температура реакції, °С	37
Чинник	-
Концентрація стандарту	2,26
Співвідношення реагент/проба (мкл/мкл)	1000 : 10
Кількість вимірів, не менше	1
Час передінкубації, с	-
Час реакції, с	600
Одиниці виміру	ммоль/л
Верхня межа абсорбції контрольної проби, А	0,4
Нижня межа абсорбції контрольної проби, А	0,00
Максимально допустиме $\Delta E/xv$, А	-
Межі лінійності	0,1-11,4
Максимум норми	1,71
Мінімум норми	0,15
Підтвердження лінійності (так/ні)	ні

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. Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19(5): 476-482.
2. Fossati P et al. Clin Chem 1982; 28(10): 2077-2080.
3. Kaplan A et al. Tryglicerides. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St louis. Toronto. Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1206.
4. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Test, 4th ed AACC Press, 1995.
5. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Test, 4th ed AACC, 2001.
6. Burtis A et al . Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC, 1999.
7. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC, 1995.
8. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994.
9. Энциклопедия клинических лабораторных тестов (под ред. Н.У.Тица). «Лабинформ», Москва,1997, стр. 459-460.
10. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994
11. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
12. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
13. 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

