

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

09 листопада 2012 р.

І.Б. Демченко

Код за НК 024:2023 – **53393**

«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 HDL ХОЛЕСТЕРИНУ (ЛІПОПРОТЕЇДИ ВИСОКОЇ ЩІЛЬНОСТІ (ЛПВЩ)) У СИРОВАТЦІ І ПЛАЗМІ КРОВІ

IVD

ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір призначений для визначення концентрації HDL холестерину (ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ)) 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 HDL холестерину (ліпопротеїдів високої щільності (ЛПВЩ)) (Див.

Примітку 4).

REF	мікро	напівмікро	макро	REF	мікро	напівмікро	макро
<u>HP026.03</u>	400	200	130	<u>HP026.11</u>	200	100	66

Діапазон визначаємих концентрацій — від 0,5 ммоль/л до 19,4 ммоль/л.

Коефіцієнт варіації визначення — не більше 5 %.

Зберігання набору — при температурі від плюс 2 °С до плюс 16 °С.

Гарантійний термін придатності набору — 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Хіломікрони, ліпопротеїди дуже низької щільності LDL (ЛПДНЩ) і ліпопротеїди низької щільності (ЛПНЩ) осідають при додаванні до дослідного зразка фосфорновольфрамової кислоти у присутності іонів магнію. Після центрифугування в супернатанті залишаються тільки ліпопротеїди високої щільності HDL (ЛПВЩ). Концентрація холестерину ЛПВЩ визначається ензиматичним колориметричним методом.

Інтенсивність рожево-червоного або бузкового забарвлення реакційного розчину пропорційна концентрації холестерину.

СКЛАД НАБОРУ

1. Осаджуючий реагент

- фосфорновольфрамова кислота
(0,560 ± 0,028) ммоль/л;

HP026.03 - 2 флакони по (100 ± 2) мл;

- хлорид магнію (30,0 ± 1,5) ммоль/л.

HP026.11 - 1 флакон з (100 ± 2) мл;

Для проведення аналізу також необхідний набір для визначення концентрації загального холестерину, наприклад, виробництва ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика» „Холестерин Ф” REF HP026.02, HP026.06-10.

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, що забезпечує вимірювання оптичної щільності при 500 (**500-550**) нм у діапазоні (0-1,0) од. оптичної щільності та довжиною оптичного шляху 5 мм або 10 мм (**Можливо використання автоматичного аналізатора. Інструкція для автоматичного аналізатора висилається за замовленням споживача.**)
2. Автоматична водяна баня або термостат, що підтримують температуру плюс (37 ± 1) °С.
3. Центрифуга для пробірок (від 4000 об/хв до 5000 об/хв).
4. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
5. Піпетки місткістю 1; 2; 5 та 0,05 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ

Свіжа сироватка або К₂ ЕДТО (1 мг/мл) плазма крові. Гемоліз неприпустимий. ЛПНЩ холестерин стабільний при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С 7 днів.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Осаджуючий реагент** готовий до застосування і придатний до терміну, вказаного на упаковці, при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С. Після використання реактиву для аналізу НЕГАЙНО закрийте флакон, щоб уникнути його випарювання або контамінації.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводять у відповідності зі схемою, наведеною в таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти в пробірку, мл	Дослідна проба			Калібрувальна проба			Холоста проба		
	Макро	Напів-мікро	Мікро	Макро	Напів-мікро	Мікро	Макро	Напів-мікро	Мікро
Аналізуємий розчин	0,75	0,50	0,25	-	-	-	-	-	-
Осаджуючий реагент	1,50	1,00	0,50	-	-	-	-	-	-
Перемішати, витримати 10 хв при температурі від плюс 15°С до плюс 25 °С, центрифугувати 20 хв при 4000 об/хв . Прозору надосадову рідину використовувати для визначення концентрації холестерину ЛПВЩ. <u>Ні в якому разі не допускати попадання осаду в реагент для визначення концентрації холестерину!</u>									
Надосадова рідина	0,40	0,20	0,10	-	-	-	-	-	-
Калібрувальний розчин холестерину(REF <u>HP026.02.02</u>)	-	-	-	0,04	0,02	0,01	-	-	-
Дистильована вода	-	-	-	0,40	0,20	0,10	0,40	0,20	0,10
Ензимний реагент (REF <u>HP026.02.01</u>)	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 20 хв або інкубують 30 хв при температурі від плюс 15°С до плюс 25 °С. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{дос}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{кал}}$) проти холостої проби . Остаточне забарвлення (<u>рожево-червоне або бузкове</u>) стабільне протягом 60 хв після закінчення інкубації за умови запобігання від улучення прямого сонячного світла. Фотометрування - див. розділ «Обладнання»									

РОЗРАХУНОК

Ведуть за формулою (1):

$$C = \frac{E_{\text{дос}}}{E_{\text{кал}}} \times 1,551 \text{ ммоль/л,} \quad \text{де} \quad (1)$$

C - концентрація холестерину у дослідній пробі, ммоль/л;

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

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

1,551 – значення концентрації калібратору з урахуванням розведень калібратора з концентрацією $(5,17 \pm 0,10)$ ммоль/л відносно сироватки, ммоль/л.

ПЕРЕРАХУНОК ОДИНИЦЬ

$$\text{мг/100 мл} \times 0,02585 = \text{ммоль/л}$$

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції і процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями, визначеними даним методом. Наприклад: "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.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Ліпемія (тригліцериди до 10 г/л) не впливає на результат визначення. Гемоліз (гемоглобін вище 5 г/л), білірубін вище 100 мг/л.

На хід визначення також можуть впливати деякі ліки і речовини (наприклад: ацетамінофен, N-ацетилцістеїн (NAC), метамізол приводять к одержанню фальшиво занижених результатів)⁴.

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ²

Вік, років	Стать	мг/100 мл 5-95 перцентиль	ммоль/л
Кров з пуповини	Ч:	6-53	0,16-1,37
	Ж:	13-56	0,34-1,45
5-9	Ч:	38-75	0,98-1,94
	Ж:	36-73	0,93-1,89
10-14	Ч:	37-74	0,96-1,91
	Ж:	37-70	0,96-1,81
15-19	Ч:	30-63	0,78-1,63
	Ж:	35-74	0,91-1,91
20-24	Ч:	30-63	0,78-1,63
	Ж:	33-79	0,85-2,04
25-29	Ч:	31-63	0,8-1,63
	Ж:	37-83	0,96-2,15
30-34	Ч:	28-63	0,72-1,63
	Ж:	36-77	0,93-1,99
35-39	Ч:	29-62	0,75-1,6
	Ж:	34-82	0,88-2,12
40-44	Ч:	27-67	0,7-1,73
	Ж:	34-88	0,88-2,28
45-49	Ч:	30-64	0,78-1,66
	Ж:	34-87	0,88-2,25
50-54	Ч:	28-63	0,72-1,63
	Ж:	37-92	0,96-2,38
55-59	Ч:	28-71	0,72-1,84
	Ж:	37-91	0,96-2,35
60-64	Ч:	30-74	0,78-1,91
	Ж:	38-92	0,98-2,38
65-69	Ч:	30-75	0,78-1,94
	Ж:	35-96	0,91-2,48
>70	Ч:	31-75	0,8-1,94
	Ж:	33-92	0,85-2,38

у сироватці, плазмі крові людини³

	чоловіки	жінки
Норма:	> 1,42 ммоль/л	> 1,68 ммоль/л
Група ризику:	0,9-1,42 ммоль/л	1,16-1,68 ммоль/л
Патологія:	< 0,9 ммоль/л	< 1,16 ммоль/л

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

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- ЛПВЩ відіграють важливу роль в евакуації холестерину з тканин і транспортуванні в печінку для його видалення у вигляді жовчних кислот.
- Понижений вміст ЛПВЩ - холестерину свідчить про захворювання атеросклерозом, який є основною причиною інфаркт міокарду і інсультів.

3. Існує декілька причин, пов'язаних із зниженим рівнем ЛПВЩ: гострі або хронічні захворювання гепатоцитів, внутрішньовенна гіпераліментация, крайній ступінь недоїдання, діабет, хронічна анемія, мієлопроліферативні захворювання, хвороба Tangier, аналфаліпротейнемія, гострі стреси, деякі ліки і куріння, А- α -ліпопротейнемія, недостатність кофактора ліпопротейнілази (Аро С-II), різні форми гіпо- α -ліпопротейнемії (спадкова гіпо- α -ліпопротейнемія, Аро А-I Milano, хвороба риб'ячого ока, сімейна недостатність лецитин-холестерин ацилтрансферази, спадкова недостатність Аро А-I/C-III), різні форми гіпертригліцеридемії. Деякі захворювання супроводжуються вторинним зниженням рівня ЛПВЩ-холестерина: декомпенсований цукровий діабет, раннє ураження коронарних артерій, гепатоцелюлярні захворювання, холестази, нефротичний синдром, ХПН.
4. ↑. Спадкова гіпер- α -ліпопротейнемія. Деякі захворювання супроводжуються вторинним підйомом рівня ЛВЩ-холестерина: первинний біліарний цироз печінки, хронічний гепатит, алкоголізм, інші хронічні інтоксикації.

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

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Осаджуючий реагент включає фосфорновольфрамову кислоту - їдку речовину.

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.

ПРИМІТКИ

1. Визначенню заважають: фториди, оксалати, цитрати.
2. Надосадова рідина після центрифугування повинна бути прозорою. Якщо ні, то пробу варто розвести фізіологічним розчином (розчин хлориду натрію 150 ммоль/л) в співвідношенні 1 : 1 і аналіз провести повторно. Отриманий результат помножити на розведення (2).
3. Калібрування водним стандартом може викликати відхилення, пов'язане з розчинником, особливо при роботі на деяких типах аналізаторів. У таких випадках рекомендується проводити калібрування з використанням стандарту на основі сироватки.
4. **Розраховано при витраті розчину реагенту 0,5 мл (мікро-), 1,0 мл (напівмікро-), 1,5 мл (макро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до об'єму надосадової рідини (необхідної для аналізу), виходячи з постійного співвідношення:**

Осаджуючий реагент : Аналізуємий розчин = 2 : 1

ЛІТЕРАТУРА

1. Assmann G., Internist, 1979, vol. 20, p.499.
2. Энциклопедия клинических лабораторных тестов, под редакцией Н.У. Тица, перевод с англ. под редакцией В.В. Меньшикова, стр. 504-505, «Лабинформ», Москва, 1997.
3. US National Cholesterol Education Program Expert Panel. Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. Arch Intern Med 1988; 148:36-39.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests 4th ed. AACC Press, 1995.



ТОВ НВП «Філіцит-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

E-mail: felicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>