

«СОГЛАСОВАНО»
Главный врач ФГБУЗ ЦКБ РАН,
д.м.н., профессор
Никитин А.Э.
11/12 2017 г.

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
Акционерного общества
«ДИАКОС-ДС»
Смирнов А.В.
2017 г.

ИНСТРУКЦИЯ

**по применению набора реагентов для определения концентрации холестерина
липопротеинов высокой плотности методом прямого иммуноингибирования
в сыворотке и плазме крови
(ХОЛЕСТЕРИН ЛПВП (прямой иммуно) ДиаС)**

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор ХОЛЕСТЕРИН ЛПВП (прямой иммуно) ДиаС предназначен для количественного определения концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) в сыворотке плазме крови человека методом прямого иммуноингибирования в клинико-диагностических лабораториях.

Набор реагентов (ХОЛЕСТЕРИН ЛПВП (прямой иммуно) ДиаС) должен использоваться квалифицированным персоналом в области клинической лабораторной диагностики.

Набор выпускается в трех видах фасовки и рассчитан на проведение 417, 566 и 1700 определений при расходе 240 мкл Реагента 1 на один анализ.

Количество определений зависит от объема фасовки и используемого биохимического анализатора.

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ [1, 2]

Холестерин — это компонент клеточных мембран, а также предшественник стероидных гормонов и желчных кислот, синтезируемый клетками и получаемый с пищей. Холестерин транспортируется в плазме с помощью липопротеинов, а именно комплексов липидов и липопротеинов. Существует четыре класса липопротеинов: липопротеины высокой плотности (ЛПВП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и аполипопротеины. ЛПНП принимают участие в транспорте холестерина к периферийным клеткам, тогда как ЛПВП отвечают за извлечение холестерина из клеток. Четыре разных класса липопротеинов проявляют явно выраженную взаимосвязь с коронарным атеросклерозом. ЛПНП-холестерин вносит вклад в формирование атеросклеротических бляшек внутри интимы артерии и связан с развитием ишемической болезни сердца (ИБС) и сопутствующей ей смертностью. Повышенная концентрация ЛПНП-холестерина указывает на высокий риск даже в том случае, когда общий холестерин находится в пределах нормы. ЛПВП-холестерин обладает защитным действием, препятствующим формированию бляшек и развитию ИБС. На самом деле низкие значения ЛПВП-холестерина представляют собой независимый фактор риска. Определение лишь уровня общего холестерина используется в целях скрининга, тогда как для более точной оценки риска необходимо кроме этого измерять ЛПВП- и ЛПНП-холестерин.

МЕТОД

Метод прямого иммуоингибирования.

ПРИНЦИП МЕТОДА [3]

В основе определения холестерина ЛПВП методом прямого иммуоингибирования лежит гомогенный метод измерения ЛПВП-холестерина без стадий центрифугирования. Антитела против липопротеинов человека используются для того, чтобы связать липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикроны в комплексы антиген-антитело (Аг-Ат), в то время как ЛПВП-холестерин селективно определяется ферментативным измерением холестерина.

ЛПНП, ЛПОНП, хиломикроны $\xrightarrow{\text{Антитела к } \beta\text{-липопротеиnam человека}}$ Комплексы Аг-Ат + ЛПВП

ЛПВП-холестерин + $O_2 + H_2O \xrightarrow{ХО+ХЭ}$ Холест-4-ен-3-он + Жирная кислота + H_2O_2

$H_2O_2 + F\text{-}DAOS + 4\text{-Аминоантипирин} \xrightarrow{ПОД}$ Комплекс синего цвета + H_2O .

Изменение поглощения при 600/700 нм (бихроматическое измерение) пропорционально концентрации холестерина ЛПВП в пробе.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1: буферно-ферментный раствор (рН 7,0), содержащий буфер Гуда, 25 ммоль/л; 4-аминоантипирин, 0,75 ммоль/л; пероксидазу (ПОД), 2,0 кЕ/л; аскорбатоксидазу, 2,25 кЕ/л; антитела к человеческим липопротеинам; азид натрия, 0,95 г/л – 5 флаконов (по 20 мл), 2 флакона по 68 мл) или 6 флаконов (по 68 мл).

Реагент 2: буферно-ферментный раствор (рН 7,0), содержащий буфер Гуда, 30 ммоль/л; холестеринэстеразу (ХЭ), 4,0 кЕ/л; холестериноксидазу (ХО), 20 кЕ/л; F-DAOS [N-этил-N-(2-гидрокси-3-сульфопропил)-3,5-диметокси-4-фторанилин натриевую соль], 0,8 ммоль/л; азид натрия, 0,95 г/л – 1 флакон (25 мл), 2 флакона (по 17 мл) или 6 флаконов (по 17 мл).

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Линейность в диапазоне от 0,03 до 4,7 ммоль/л (1,0–180 мг/дл).
- Отклонение от линейности не превышает 5%.
- Чувствительность – не более 0,03 ммоль/л (1,0 мг/дл).
- Коэффициент вариации – не более 5%.

Если концентрация ЛПВП-холестерина в образце превышает верхнюю границу диапазона, анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором (0,9% NaCl) в соотношении 1:2 и полученный результат умножить на 3.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для калибровки фотометрических систем рекомендуем использовать калибратор холестерина ЛПВП/ЛПНП (TruCal HDL/LDL) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия).

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов рекомендуем проводить измерения контрольных сывороток «Липиды» (TruLab L Level 1 и TruLab L Level 2) производства DiaSys Diagnostic Systems GmbH (Германия).

Возможно использование других контрольных материалов, аттестованных данным методом и не уступающих по своим свойствам рекомендуемому.

Калибровку рекомендуем проводить в следующих случаях: при нестабильности результатов контроля качества, в случае выхода значений контроля качества за пределы установленных диапазонов для используемого лота контрольного материала, при использовании нового набора.

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

В сыворотке/плазме крови человека концентрация ЛПВП-холестерина в норме составляет 0,9 ммоль/л (35 мг/дл) [6].

Эпидемиологические исследования показали, что низкие концентрации ЛПВП-холестерина 0,9 ммоль/л (39 мг/дл) у мужчин и <1,0 ммоль/л (43 мг/дл) у женщин, особенно в сочетании с триглицеридами (при измерении натощак) >2 ммоль/л (180 мг/дл), указывают на высокий риск ишемической болезни сердца [2].

Рекомендуем в каждой лаборатории уточнять диапазон значений нормальных величин дляследуемого контингента людей.

ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови. Гепаринизированная плазма.

стабильность в сыворотке/плазме [4]:	2 дня	при 15 – 25°C
	7 дней	при 2 – 8°C
	3 месяца	при –20°C

Разные образцы хранению не подлежат!

Замораживать образцы можно не более одного раза!

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а (Приказ Минздрава РФ от 06.06.2012 4н).

При работе с набором соблюдайте осторожность и не допускайте его попадания внутрь, а также на кожу и слизистые оболочки. При попадании немедленно промойте пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании выпейте 0,5 л теплой воды и вызовите рвоту.

Меры предосторожности – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения» (Москва, 1981 г.).

При работе с набором надевайте одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. разбрызгивание крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

биохимический анализатор, поддерживающий длину волны 600/700 нм, кюветы термостатированные при температуре 37°C с длиной оптического пути 10 мм; пипетки полуавтоматические одноканальные с переменным объемом со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости до 5000 мкл (ошибка не более 3%); физиологический раствор (0,9% NaCl);

вода очищенная;
перчатки резиновые хирургические;
калибратор холестерина ЛПВП/ЛПНП (TruCal HDL/LDL) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия).

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Реагенты 1 и 2 готовы к использованию.
Лиюфилизированный калибратор TruCal HDL/LDL производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия) готовят согласно прилагаемой к каждому лоту инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Адаптации к автоматизированным системам запрашивайте дополнительно.

Длина волны, нм 600/700 (бихроматическое измерение)
Длина опт. пути, см 1
Температура, °C 37
Измерение против холостой пробы

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблице.

Отмерить, мкл*	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Калибратор TruCal HDL/LDL	—	2,4	—
Разбавитель	—	—	2,4
Реагент 1	240	240	240
Пробы тщательно перемешать, инкубировать 5 мин, измерить оптическую плотность (A1), затем добавить:			
Реагент 2	60	60	60
Пробы тщательно перемешать, инкубировать 5 мин, измерить оптическую плотность (A2).			

$$\Delta A = (A2 - A1) \text{ образца/калибратора}$$

Примечания:

* Количество реагентов и анализируемых образцов в зависимости от типа используемого химического анализатора и от объема используемой кюветы может быть пропорционально изменено (соотношение образец: реагент 1: реагент 2 = 1:100:25).
**Случайные изменения окраски не влияют на точность измерения, пока оптическая плотность рабочего реагента (4 части Реагента 1 + 1 часть Реагента 2) меньше 0,03 ед. опт. плотн. при 600-700 нм.

РАСЧЕТЫ

По калибратору:

$$\text{ЛПВП-холестерин [ммоль/л]} = \frac{\Delta A_{\text{образца}}}{\Delta A_{\text{калибратора}}} \times \text{Концентрация калибратора [ммоль/л]}.$$

Фактор конверсии:

$$\text{ЛПВП-холестерин [ммоль/л]} = \text{ЛПВП-холестерин [мг/дл]} \times 0,02586.$$

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Аскорбиновая кислота до 500 мкг/мл, билирубин до 684 мкмоль/л, гемоглобин до 5,0 г/л, гипертония до 13,5 ммоль/л триглицеридов не влияют на точность анализа [5]. Дополнительных веществ (АЛФ), устраняющих липемичность сыворотки, не требуется.

N-ацетилцистеин и лечение с применением ацетаминофена и метамизола приводят к ложному занижению результатов анализа. Образцы пациентов с гаммопатией могут давать ложный результат [7].

ТРАНСПОРТИРОВАНИЕ, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до 25°C не более 5 суток. Замораживание компонентов набора не допускается.

Транспортирование должно производиться с использованием крытого грузового авто, авиа, водного транспорта, в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 5 суток.

Срок годности набора – 18 месяцев.

При соблюдении условий хранения все компоненты набора стабильны в течение всего срока годности.

После вскрытия флаконов реагенты стабильны до конца месяца, указанного в сроке годности, при хранении при температуре 2-8°C, в защищенном от света месте, при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Стабильность реагентов набора на борту автоматического биохимического анализатора 4 недели при 2-8°C. Стабильность калибровки при таком использовании набора не менее 2 недель.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор реагентов (ХОЛЕСТЕРИН ЛПВП (прямой иммуно) ДиаС) не содержит взрывоопасных веществ, представляющих угрозу окружающей среде и здоровью медицинского персонала.

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

Набор реагентов **ХОЛЕСТЕРИН ЛПВП (прямой иммуно) ДиаС** предназначен для применения в клинико-диагностических лабораториях. При работе с набором соблюдайте требования ГОСТ Р 52905-2007 «Лаборатории медицинские. Требования безопасности».

Утилизацию или уничтожение Набора реагентов, неиспользованных реактивов, дезинфекцию следует проводить в соответствии с СанПин 2.1.7.2790-10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» для Класа «Б» медицинских отходов и МУ-287-113 «Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения».

ГАРАНТИЙНЫЕ ОБЯЗАТЕЛЬСТВА

АО «ДИАКОН-ДС» гарантирует качество, эффективность и безопасность медицинского изделия, отсутствие недопустимого риска причинения вреда жизни, здоровью человека и окружающей среде при использовании набора реагентов по назначению в условиях, предусмотренных данной инструкцией по применению.

Гарантийные обязательства АО «ДИАКОН-ДС» распространяются с даты изготовления и на период срока годности медицинского изделия, при условии надлежащего транспортирования,

хранения и эксплуатации. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора **ХОЛЕСТЕРИН ЛПВП (прямой иммуно)наС**, следует обращаться в АО «ДИАКОН-ДС» по адресу: 142290, г. Пушкино, Московской обл., п. Грузовая 1а; тел. (495) 980-63-38, т/факс (495) 980-66-79.

ЛИТЕРАТУРА

Rifai N., Bachorik P.S., Albers J.J. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis C.A., Ashwood E.R., editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 809-861.

Recommendation of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention. Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Eur. Heart J. 1998; 19: 1434-1503.

Nauck M., Maerz W., Wieland H. New immunoseparation-based homogeneous assay for HDL-cholesterol compared with three homogeneous and two heterogeneous methods for HDL-cholesterol. Clin. Chem. 1998; 44: 1443-1451.

Guder W.G., Zawta B. et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001; p. 22-3.

Young D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 5th ed. Volume 1 and 2. Washington, DC: The American Association for Clinical Chemistry Press, 2000.

Schaefer E.J., McNamara J. Overview of the diagnosis and treatment of lipid disorders. In: Rifai N., Warnick G.R., Dominiczak M.H., eds. Handbook of lipoprotein testing. Washington: The American Association for Clinical Chemistry Press; 1997. p. 25-48.

Bakker A.J., Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin. Chem. Lab. Med. 2007; 45(9): 1240-1243.

Начальник Отдела Исследований и Разработок
АО «ДИАКОН-ДС»



к.б.н. О.Ю. Гудкова



Прошито, пронумеровано и
скреплено печатью 6
Генеральный директор
АО «ДИАКОН-ДС»

А.В. Смирнов