

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО И ПРЯМОГО БИЛИРУБИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (КАТ.№ В-10902)

Утверждена приказом Росздравнадзора от 26.02.2008 г. № 1014-Пр/08
РУ № ФСР 2008/02104 от 26.02.2008 г.

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для фотометрического количественного определения содержания общего и прямого билирубина в сыворотке крови методом Йендрашика-Грофа в клинико-диагностических лабораториях и научно-исследовательской практике. Набор рассчитан на определение общего и прямого билирубина в 150 образцах при конечном объеме реакционной смеси 2 мл.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Прямой (конъюгированный с глюкуроновой кислотой) билирубин непосредственно реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой, а несвязанный – в присутствии кофеинового реактива с образованием окрашенного азобилирубина. Интенсивность окраски раствора пропорциональна содержанию билирубина.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1. Кофеиновый реактив, концентрат 50 мл
Реагент 2. Сульфаниловая кислота, концентрат 10 мл
Реагент 3. Нитрит натрия 13 мл
Реагент 4. Физиологический раствор хлорида натрия (0,9%), концентрат 50 мл
Калибратор билирубина, лиофилизат 2 мл
Точное значение концентрации билирубина указано на этикетке флакона с калибратором.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность – не более 2 мкмоль/л.
Линейность – от 3 до 310 мкмоль/л с отклонением не более 10%.
Коэффициент вариации – не более 10%.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Свежая сыворотка крови, свободная от гемолиза, липемии, прозрачная.
Общий билирубин в сыворотке крови стабилен в плотно закрытых сосудах при 18-25°C в течение 2 дней, прямой – в течение 1 дня, при 2-8°C общий и прямой билирубин стабильны в течение 7 дней [1].

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

Спектрофотометр, фотоэлектроколориметр или полуавтоматические анализаторы открытого типа различных изготовителей, дозаторы, позволяющие отбирать объемы 0,2-2,0 мл, секундомер, штатив, пробирки вместимостью 10-20 мл, дистиллированная вода.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

1. Приготовление кофеинового реактива
Концентрат кофеинового реактива (реагент 1) развести дистиллированной водой до 250 мл. Реактив стабилен при 18-25°C в течение месяца.

2. Приготовление физиологического раствора
Концентрат физиологического раствора (реагент 4) развести дистиллированной водой до 250 мл. Раствор стабилен при 18-25°C в течение месяца.

3. Приготовление рабочего раствора сульфаниловой кислоты

Концентрат сульфаниловой кислоты (реагент 2) развести дистиллированной водой до 50 мл. Рабочий раствор сульфаниловой кислоты стабилен при 18-25°C в течение всего срока годности набора (18 месяцев).

4. Приготовление диазореагента

Смешать необходимые количества рабочего раствора сульфаниловой кислоты и раствора нитрита натрия (реагент 3) в соотношении 4:1. Диазореагент необходимо использовать в течение 3 часов.

5. Приготовление калибратора

Во флакон с калибратором добавить точно 2,00 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном перемешивании. Раствор калибратора билирубина неустойчив, его необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре 2-8°C в течение 1 суток, в замороженном состоянии – в течение 3 недель.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Длина волны 540 (520-560) нм.
Кювета с длиной оптического пути 10 мм.
Температура проведения реакции 18-25°C.
Приготовить пробы в соответствии со схемой определения (объемы компонентов могут быть пропорционально изменены).

Схема определения

Раствор	Общий билирубин	Прямой билирубин	Холостая проба	Калибровочная проба	Холостая проба для калибратора
Образец, мл	0,2	0,2	0,2	–	–
Калибратор, мл	–	–	–	0,2	0,2
Кофеиновый реактив, мл	1,6	–	–	1,6	–
Физ.раствор, мл	–	1,6	1,8	–	1,8
Диазореагент, мл	0,2	0,2	–	0,2	–

*Содержимое пробирок осторожно перемешать и инкубировать при комнатной температуре. Измерить оптическую плотность опытной пробы ($E_{обр.}$) и калибровочной пробы ($E_{кал.}$) против соответствующей холостой пробы: при определении прямого билирубина **точно** через 5 мин. после добавления диазореагента; при определении общего билирубина – через 20 мин. после добавления диазореагента.*

При определении общего билирубина окраска стабильна в течение 1 часа.

КлиниТест-Бил

Метод Йендрашика-Грофа

РАСЧЁТ

Содержание билирубина C в анализируемой пробе рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_{\text{обр.}} \cdot C_{\text{кал.}}}{E_{\text{кал.}}} \text{ мкмоль/л,}$$

где $C_{\text{кал.}}$ – концентрация билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

ПАРАМЕТРЫ ДЛЯ БИОХИМИЧЕСКИХ АНАЛИЗАТОРОВ

Тип анализатора	Полуавтомат
Метод измерения	Конечная точка
Длина волны, нм	540 (520-560)
Измерение против	Холостой пробы
Температура реакции	18-25°C
Единица измерения	мкмоль/л
Число знаков после запятой	2
Концентрация стандарта, мкмоль/л	*
Соотношение реагент/проба	9:1
Время реакции, сек	–
Верхний предел абсорбции реагента против воды, E	2,0
Нижний предел абсорбции реагента против воды, E	0
Границы линейности, мкмоль/л	3-310
Максимум нормы, мкмоль/л	20,5**
Минимум нормы, мкмоль/л	7,5**

*Точное значение концентрации билирубина указано на этикетке флакона с калибратором.

**Приведены нормальные значения содержания общего билирубина в сыворотке крови.

В случае возникновения каких-либо трудностей можно запросить адаптированную инструкцию по работе с набором «КлиниТест-Бил» на вашем анализаторе.

ПРИМЕЧАНИЕ

При содержании билирубина в исследуемом образце больше 310 мкмоль/л образец необходимо разбавить дистиллированной водой в 2 раза. Анализ повторить, величину рассчитанной концентрации умножить на 2.

НОРМАЛЬНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Прямой билирубин 1,6-6,2 мкмоль/л
Общий билирубин 7,5-20,5 мкмоль/л

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнять диапазон нормальных величин.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Во избежание возможного инфицирования при работе с образцами крови необходимо надевать одноразовые резиновые перчатки.

В состав набора входит едкое вещество – соляная кислота и вредное вещество – нитрит натрия. При попадании их на слизистую или на кожу смыть большим количеством проточной воды.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (18 месяцев). Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8°C в течение всего срока годности набора.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Контроль качества может быть проведён по контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап. Под ред. В.В. Меньшикова, М., 1999, "Лабинформ", с. 151.