

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 2011 г. № _____

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»
_____ Н.Схолль-Энгбертс
_____ 2011 г.

КОПИЯ ВЕРНА
ГЕН. ДИРЕКТОР
Е.Н.СХОЛЛЬ-ЭНГБЕРТС



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения концентрации
общего и прямого билирубина в сыворотке крови
унифицированным методом Ендрассика-Грофа.

(Билирубин-Витал)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор Билирубин-Витал предназначен для количественного определения концентрации общего и прямого билирубина в сыворотке крови в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 140 определений общего и 140 определений прямого билирубина при расходе 0,2 мл рабочего реагента на один анализ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Определение общего и прямого билирубина основано на реакции диазотирования билирубина диазотированной сульфаниловой кислотой при участии кофеинового реагента (общий билирубин) и в отсутствии кофеинового реагента (прямой билирубин). В результате реакции образуется окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 535 (500-560) нм.

СОСТАВ НАБОРА

В состав набора входят:

- реагент 1: кофеиновый реагент, содержащий кофеин, 52 ммоль/л; натрия бензоат, 104 ммоль/л; натрия ацетат, 184 ммоль/л, готов к использованию – 1 флакон (200 мл);
- реагент 2: раствор сульфаниловой кислоты, содержащий сульфаниловую кислоту, 29 ммоль/л; соляную кислоту, 170 ммоль/л – 1 флакон (55 мл);
- реагент 3: раствор натрия нитрита, 72 ммоль/л – 1 флакон (2,0 мл);
- реагент 4: физиологический раствор, содержащий натрия хлорид, 154 ммоль/л, готов к использованию – 1 флакон (250 мл);
- калибратор: калибровочный образец билирубина, лиофилизированный, содержащий (после растворения) билирубин, 171 мкмоль/л; бычий сывороточный альбумин, 60 г/л; дитиотрейтол, 1 ммоль/л – 1 флакон.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейная область определения концентрации билирубина – в диапазоне от 8 до 400 мкмоль/л, отклонение от «линейности» – не более 8 %.

Чувствительность определения – не более 5 мкмоль/л.

Коэффициент вариации результатов определений – не более 8 %.

Окраска стабильна в течение времени не более 8 часов.

Качество набора может проверяться по отечественным или зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом. Калибратор в наборе восходит к стандартным материалам NIST.

Нормальные величины концентрации билирубина в сыворотке крови человека: 8,5-20,5 мкмоль/л – для общего билирубина, 2,2 – 5,1 мкмоль/л – для прямого билирубина.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемодизированная сыворотка крови.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Реагент 2 содержит соляную кислоту. При работе с набором следует не допускать попадания реагента 2 на кожу и слизистые; при попадании следует промыть пораженное место большим количеством проточной воды.

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

При работе с сывороткой крови необходимо надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы 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:

- Спектрофотометр, длина волны 535 нм, программируемый фотометр, биохимический анализатор открытого типа или фотоэлектроколориметр, длина волны 500-560 нм, кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- секундомер;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменяемыми наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 и 1,0 мл;
- колбы стеклянные вместимостью 50 и 100 мл;
- пробирки стеклянные вместимостью 3-5 мл;
- перчатки резиновые хирургические;
- вода дистиллированная.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Приготовление рабочего реагента

Смешать в колбе стеклянной реагент 2 и реагент 3 в соотношении 100:2,5 (например, 10 мл реагента 2 и 0,25 мл реагента 3).

Полученный рабочий реагент можно хранить в плотно закрытой посуде в темноте при комнатной температуре (+18-25°C) не более 2 дней или при температуре +2-8°C не более 10 дней. Замороженный рабочий реагент можно хранить при температуре минус 15-25°C не более 30 дней. Повторное замораживание не допускается.

Приготовление калибратора

Во флакон с лиофилизированным калибратором внести 1,0 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать до полного растворения. Концентрация билирубина в калибраторе составляет 171 мкмоль/л.

Приготовленный раствор калибратора можно хранить в темном месте при температуре +2-8°C не более 5 дней или при температуре минус 15-25°C не более 4 мес. Повторное замораживание не допускается.

Построение калибровочного графика

В шесть пробирок вместимостью 3-5 мл внести разведенный калибратор, реагент 4, реагент 1 и рабочий реагент в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1.

№ пробирок	Разведенный калибратор, мл	Реагент 4, мл	Реагент 1, мл	Рабочий реагент, мл	Концентрация билирубина, мкмоль/л
1	0,01	0,39	1,4	0,2	8,55
2	0,02	0,38	1,4	0,2	17,1
3	0,04	0,36	1,4	0,2	34,2
4	0,06	0,34	1,4	0,2	51,3
5	0,08	0,32	1,4	0,2	68,4
6	0,10	0,30	1,4	0,2	85,5

Содержимое пробирок тщательно перемешать и инкубировать при комнатной температуре в течение 20 мин.

Измерить оптическую плотность проб при длине волны 535 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против дистиллированной воды.

Построить калибровочный график, откладывая на оси ординат значения оптической плотности для каждой пробы, а на оси абсцисс – соответствующие им значения концентрации билирубина.

Примечание. При проведении анализа на биохимических анализаторах открытого типа калибровка проводится согласно Инструкции по эксплуатации, соответствующей модели прибора.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2

Отмерить, мл	Общий билирубин	Прямой билирубин	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка крови	0,20	0,20	0,2
Реагент 1	1,4	---	---
Реагент 4	0,20	1,6	1,8
Рабочий реагент	0,20	0,2	---

Пробы тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре: общий билирубин – в течение 20 мин, прямой билирубин – в течение 5 мин (точно!). Измерить оптическую плотность опытных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 535 (500-560) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Окраска проб для определения общего билирубина устойчива в течение 8 часов.

Концентрацию билирубина в анализируемых пробах сыворотки крови (в мкмоль/л) определить по калибровочному графику.

Примечание. При проведении анализа прямого билирубина на программируемых фотометрах или биохимических анализаторах открытого типа определение проводится по фактору (указывается в приложении к паспорту на набор для определенной модели прибора).

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при комнатной температуре (+18-25°C) в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности.

Срок годности набора – 18 месяцев.

Рабочий реагент можно хранить в темном месте в плотно закрытой посуде при комнатной температуре не более 2 дней или при температуре +2-8°C не более 10 дней. Замороженный рабочий реагент можно хранить при температуре минус 15-25°C не более 30 дней. Повторное замораживание не допускается.

Калибратор после приготовления можно хранить при температуре +2-8°C в темном месте не более 5 дней или при температуре минус 15-25°C не более 4 мес. Повторное замораживание не допускается.

Реагент 1 и реагент 4 можно хранить при комнатной температуре в плотно закрытой посуде в течение всего срока годности набора.

Реагент 2 и реагент 3 после вскрытия флаконов можно хранить в темном месте в плотно закрытой посуде при комнатной температуре в течение всего срока годности набора.

Для отбора и добавления анализируемых проб и компонентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования.

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

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ОАО "Витал Девелопмент Корпорэйшн" по адресу:

194 156, Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д. 27.

Тел/факс: (812) 326-61-98.

и на кафедру КЛД ГОУ ДПО «РМАПО Росздрава» по адресу:

116 000, Москва, 2-й Боткинский пр, д. 5.

Тел.: (495) 945-82-22.

Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики с курсом молекулярной медицины,
директор НЦ «Институт лабораторной медицины»
ГОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова Росздрава,
Главный специалист-эксперт
по клин. лаб. диагностике Росздравнадзора
по С-ЗФО, д. м. п., профессор



В.Л.Эмануэль