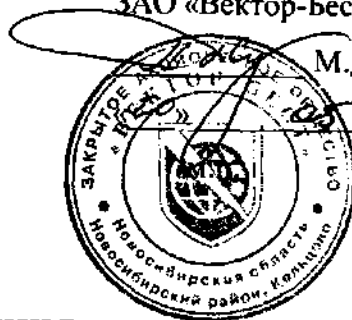


УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 200_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»
М.Д. Хусаинов
_____ 2009г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения
конъюгированного билирубина в сыворотке крови
(БИЛИРУБИН КОНЪЮГИРОВАННЫЙ-НОВО-А)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов БИЛИРУБИН КОНЪЮГИРОВАННЫЙ-НОВО-А предназначен для количественного определения содержания конъюгированного билирубина в сыворотке крови человека колориметрическим методом с диазотированной сульфаниловой кислотой в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

1.2. Набор рассчитан, в зависимости от варианта комплектации, на проведение 100 (вариант 1), 250 (вариант 2) или 500 (вариант 3) определений конъюгированного билирубина при расходе 1,0 мл реагента 1 на одно определение, включая контрольные пробы.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на том, что при взаимодействии билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой в кислой среде образуется азобилирубин красного цвета. интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации конъюгированного билирубина в анализируемой пробе и измеряется фотометрически при длине волны 546 (520-560) нм.

2.2. Состав набора

Набор может поставляться в трех вариантах комплектации (варианты 1, 2 и 3).

В состав набора входят:

– реагент 1: натрий хлористый, 9 г/л; с ЭДТА, 1,5 ммоль/л; готовый к использованию

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: нач. отдела, к.б.н.
Л.В. Гаевой и старшим научным сотрудником Л.М. Прасоловой.

– 1 флакон (100 мл) (вариант 1), 1 флакон (250 мл) (вариант 2) или 2 флакона (по 250 мл) (вариант 3);

– реагент 2: раствор, содержащий сульфаниловую кислоту, 29 ммоль/л; соляную кислоту, 170 ммоль/л – 1 флакон (30 мл) (вариант 1), 1 флакон (75 мл) (вариант 2) или 2 флакона (по 75 мл) (вариант 3);

– реагент 3: раствор натрия азотистокислого, 25 ммоль/л – 1 флакон (3,0 мл) (вариант 1), 1 флакон (7,5 мл) (вариант 2) или 2 флакона (по 7,5 мл) (вариант 3);

– калибратор: раствор конъюгированного билирубина с концентрацией в диапазоне 40-60 мкмоль/л, лиофилизированный – 1 флакон (вариант 1), 2 флакона (вариант 2) или 4 флакона (вариант 3).

Точное значение концентрации билирубина указано на флаконе с калибратором и в аналитическом паспорте.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Линейность. Линейная область определения концентрации конъюгированного билирубина – в диапазоне от 3,4 до 171 мкмоль/л. Отклонение от «линейности» – не более 7%.

3.2. Чувствительность определения – не более 3,0 мкмоль/л.

3.3. Коэффициент вариации результатов определений – не более 7%.

3.4. Нормальные величины концентрации конъюгированного билирубина:

– не более 5,1 мкмоль/л.

3.5. Рекомендуется в каждой лаборатории при использовании набора уточнить диапазон нормальных величин концентрации конъюгированного билирубина у исследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Реагент 2 содержит сульфаниловую кислоту. Следует избегать попадания реагента на кожу и слизистые. В случае попадания его на кожу и слизистые необходимо промыть поражённые участки большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором необходимо соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые

перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр (длина волны 546 нм) или фотоэлектроколориметр (длина волны 520-560 нм), кювета с длиной оптического пути 10 мм; автоматический биохимический анализатор;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 100, 250 и 1000 мкл;
- пробирки стеклянные вместимостью 5,0-10 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- секундомер;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови человека.

Сыворотку необходимо защищать от воздействия света. Образцы сыворотки крови можно хранить при комнатной температуре (+18-25 °C) не более 4 ч, при температуре +2-8 °C не более 1 сут или при температуре минус 20 °C и ниже не более 2 нед. Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление диазореагента.

Перед использованием диазореагент готовить путем смешивания реагента 2 и реагента 3 в соотношении 10:1.

Хранить диазореагент следует в закрытом виде при температуре + 2-8 °C не более 7 сут.

7.2. Приготовление калибратора.

К содержимому каждого флакона с калибратором добавить 1,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном перемешивании.

Растворенный калибровочный образец конъюгированного билирубина неустойчив, его необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре +2-8 °C не более 2 сут или при температуре минус 20 °C и ниже не более 2 нед.

7.3. Проведение анализа на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре.

Реагенты и калибратор перед проведением анализа выдержать при комнатной температуре (+18-25 °С) в течение времени не менее 30 мин.

Компоненты реакционной смеси отобрать в количествах, указанных в таблице.

Таблица

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Опытная проба	Калибровочная проба
Реагент 1	1000	1000	1000
Сыворотка крови	–	100	–
Калибратор	–	–	100
Вода дистиллированная	100	–	–
Перемешать, выдержать в течение 5 мин при комнатной температуре и измерить оптическую плотность опытной (E_{1on}) и калибровочной ($E_{1к}$) проб против контрольной (холостой) пробы.			
Диазореагент	250	250	250

Перемешать, выдержать точно в течение 10 мин при комнатной температуре и измерить оптическую плотность опытной (E_{2on}) и калибровочной ($E_{2к}$) проб против контрольной (холостой) пробы. Окраска растворов неустойчива, поэтому измерение оптической плотности проводится точно в указанное время.

7.3.1. Рассчитать концентрацию конъюгированного билирубина (C , мкмоль/л) в сыворотке крови по формуле:

$$C = \frac{E_{2on} - 0,81 \times E_{1on}}{E_{2к} - 0,81 \times E_{1к}} \times C_k,$$

где: E_{1on} и E_{2on} – оптические плотности первого и второго измерения опытной пробы, ед. опт. плотн.;

$E_{1к}$ и $E_{2к}$ – оптические плотности первого и второго измерения калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

C_k – концентрация конъюгированного билирубина в калибраторе, мкмоль/л;

0,81 – коэффициент коррекции, учитывающий разбавление проб диазореагентом.

7.4. Проведение анализа на автоматическом биохимическом анализаторе.

Определение концентрации конъюгированного билирубина провести на аналитическом биохимическом анализаторе, используя основные параметры:

Длина волны в диапазоне	520-560 нм
Измерение против	воды дистиллированной

Метод измерения	конечная точка
Единица измерения	мкмоль/л
Число знаков после запятой	2
Изменение оптической плотности	возрастает
Температура	+37 °С
Соотношение образец : реагент 1 : диазореагент	1 : 10 : 2,5
Время инкубации (считывания)	300 с
Верхний предел абсорбции контрольной пробы против воды	по факту
Предел максимальной абсорбции	2,00 А
Калибратор	~ 50 мкмоль/л
Линейность	до 171 мкмоль/л

7.4.1. Внести реагент 1 и диазореагент, приготовленный в п. 7.1, в картриджи биохимического анализатора и поместить в реагентную карусель. Внести калибратор, образец (опытную пробу), дистиллированную воду в соответствующие картриджи и поместить в карусель для образцов.

7.4.2. Измерить концентрацию конъюгированного билирубина в пробах на автоматическом биохимическом анализаторе.

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов БИЛИРУБИН КОНЪЮГИРОВАННЫЙ-НОВО-А должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (1 год). Допускается хранение наборов при температуре до +25 °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

8.2. Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 6 мес.

8.3. Диазореагент можно хранить в закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 7 сут.

8.4. Калибратор после растворения необходимо хранить в защищенном от света месте при температуре +2-8 °С не более 2 сут или при температуре минус 20 °С и ниже не более 2 нед.

8.5. Для проведения анализа следует использовать негемолизированную сыворотку крови.

8.6. Образцы сыворотки крови можно хранить в темном месте при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 4 ч, при температуре +2-8 °С не более 1 сут или при температуре минус 20 °С и ниже не более 2 нед.

Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

8.7. Качество набора может проверяться по отечественным и зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

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

По вопросам, касающимся качества набора **БИЛИРУБИН КОНЬЮГИРОВАННЫЙ-НОВО-А**, следует обращаться в ЗАО «Вектор-Бест» по адресу:

630559, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Кольцово, а/я 121,
тел. (383) 227-67-64, 227-75-50, тел./факс (383) 336-73-46

и в Лабораторный Центр в ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора по адресу:

117246, Москва, Научный проезд, д. 14А, тел. (495) 120-60-95; 120-60-96.

Старший научный сотрудник
ЗАО «Вектор-Бест»

Л.М. Прасолова

Проректор ГОУ ВПО НГМУ Росздрава
по лечебной работе, д.м.н., профессор

м.п.

П. Потеряева

