

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ 200_ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор

ЗАО «Вектор-Бест»

М.Д. Хусаинов

_____ 200_ г.



ИНСТРУКЦИЯ

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

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов БИЛИРУБИН-НОВО предназначен для количественного определения общего и конъюгированного билирубина в сыворотке крови человека методом Йенд-рашика-Грофа в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

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

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Определение общего и конъюгированного билирубина основано на реакции диазотирования билирубина диазосульфаниловой кислотой в присутствии ускорителя реакции кофеина-бензоата натрия (общий билирубин), и в отсутствии ускорителя (конъюгированный билирубин). В результате реакции образуется соединение розового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации билирубина и измеряется фотометрически при длине волны 546 (520-560) нм.

2.2. Состав набора

Набор может поставляться в двух вариантах комплектации (варианты 1 и 2).

В состав набора входят:

– реагент 1: раствор для определения общего билирубина, содержащий кофеин,

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

0,15 моль/л; натрий бензойнокислый, 0,3 моль/л; натрий уксуснокислый, 0,6 моль/л; сульфаниловую кислоту, 9,0 ммоль/л; соляную кислоту, 0,22 моль/л; трилон Б, 2,4 ммоль/л; готовый к использованию – 2 флакона (по 100 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 250 мл) (вариант 2);

– реагент 2: раствор для определения общего билирубина, содержащий натрий азотистокислый, 140 ммоль/л; готовый к использованию – 1 флакон (5,5 мл) (вариант 1) или 1 флакон (14,0 мл) (вариант 2);

– реагент 3: раствор для определения конъюгированного билирубина, содержащий сульфаниловую кислоту, 6,0 ммоль/л; соляную кислоту, 64 ммоль/л; готовый к использованию – 2 флакона (по 100 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 250 мл) (вариант 2);

– реагент 4: раствор для определения конъюгированного билирубина, содержащий натрий азотистокислый, 9 ммоль/л; готовый к использованию – 1 флакон (5,5 мл) (вариант 1) или 1 флакон (14,0 мл) (вариант 2);

– калибратор: раствор билирубина с концентрацией в диапазоне 20-40 мкмоль/л; лиофилизированный – 1 флакон (вариант 1) или 2 флакона (вариант 2).

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 билирубина – в диапазоне от 3,4 мкмоль/л до 342 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 билирубина в сыворотке крови:

– для общего билирубина – 8,5-20,5 мкмоль/л;

– для конъюгированного билирубина – 2,2–5,1 мкмоль/л.

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

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Реагент 1 и реагент 3 содержат соляную кислоту, реагент 2 и реагент 4 – натрий азотистокислый. Следует избегать попадания реагентов на кожу и слизистые. В случае попадания их 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 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;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 50, 100 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 °С) не более 8 ч, при температуре +2-8 °С – не более 2 сут или при температуре минус 20 °С и ниже – не более 2 нед. Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление калибратора.

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

Растворенный калибровочный образец билирубина неустойчив, его необходимо хранить в защищенном от света месте не более 1 нед при температуре +2-8 °С или при температуре минус 20 °С и ниже – не более 3 нед. Допустимо держать приготовленный раствор калибратора при комнатной температуре в течение рабочего дня.

7.2. Реагенты и калибратор перед проведением анализа выдержать при комнатной температуре в течение времени не менее 30 мин.



Реагент 1 и анализируемые пробы не держать на свету! После использования флакон с реагентом 1 сразу поместить в защищенное от света место.

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

Таблица

Отмерить, мл	Общий билирубин (опытная проба)	Конъюгированный билирубин (опытная проба)	Контрольная (холостая) проба для общего билирубина	Контрольная (холостая) проба для конъюгированного билирубина	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба для калибратора
Реагент 1	1,0	—	1,0	—	1,0	1,0
Реагент 2	0,05	—	—	—	0,05	—
Реагент 3	—	1,0	—	1,0	—	—
Реагент 4	—	0,05	—	—	—	—
Сыворотка крови	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—
Калибратор	—	—	—	—	0,1	0,1

После вскрытия флаконов реагенты можно хранить в плотно закрытом виде при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 3 мес.

7.4. Пробы тщательно перемешать и выдержать при комнатной температуре:

конъюгированный билирубин – 7 мин (точно!);

контрольную (холостую) пробу для конъюгированного билирубина – 7 мин;

общий билирубин, контрольную (холостую) пробу для общего билирубина, калибровочную и контрольную (холостую) пробу для калибратора – 20 мин.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность проб против дистиллированной воды при длине волны 546 (520-560) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм.

Окраска растворов для общего билирубина устойчива в течение 1 ч.

Окраска растворов для конъюгированного билирубина не устойчива, поэтому измерение оптической плотности производится точно через 7 мин.

9. РАСЧЕТЫ

Концентрацию билирубина (С, мкмоль/л) в сыворотке крови рассчитать по формуле:

$$C = \frac{\Delta E}{\Delta E_K} \times C_K,$$

где: ΔE – разность оптических плотностей опытных и контрольной (холостой) пробы для сыворотки, ед. опт. плотн.;

ΔE_K – разность оптических плотностей калибровочной и контрольной (холостой) проб для калибратора, ед. опт. плотн;

C_K – концентрация билирубина в калибраторе, мкмоль/л.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов БИЛИРУБИН-НОВО должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2-8 °С в течение всего срока годности (2 года). Допускается хранение наборов при температуре до +25 °С не более 10 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Реагенты после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при комнатной температуре (+18-25 °С) не более 3 мес. Реагент 1 защищать от воздействия света!

10.3. Калибратор после растворения необходимо хранить в защищенном от света месте не более 1 нед при температуре +2-8 °С или при температуре минус 20 °С и ниже – не более 3 нед. Допустимо держать приготовленный раствор калибратора при комнатной температуре в течение рабочего дня.

10.4. Для проведения анализа использовать негемолизированную сыворотку крови.

10.5. Образцы сыворотки крови можно хранить в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 8 ч, при температуре +2-8 °С – не более 2 сут или при температуре минус 20 °С и ниже – не более 2 нед. Повторное размораживание образцов сыворотки крови не допускается.

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

10.7. Для отбора и добавления анализируемых проб и компонентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками, аттестованные по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования.

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

По вопросам, касающимся качества набора БИЛИРУБИН-НОВО, 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 **Институт стандартизации и контроля лекарственных средств ФГУ «НЦ ЭСМП» Росздравнадзора** по адресу:

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

Старший научный сотрудник
ЗАО «Вектор-Бест»

 Л.М. Прасолова

Директор по производству
ЗАО «Вектор-Бест»

 В.К. Ткачев

