



Інструкція з використання набору реагентів для визначення кількості загального і прямого білірубину в сироватці або плазмі крові БІЛІРУБІН по Йєндрашіку СпЛ

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Принцип методу

Діазотована сульфанілова кислота в присутності кофеїну утворює з прямим і непрямим білірубіном азобілірубін рожево-фіолетового кольору. Інтенсивність кольору пропорційна концентрації загального білірубину у зразку. У відсутності кофеїнового реактива в реакцію вступає тільки прямий білірубін. Концентрацію непрямого білірубину можна визначити за різницею між загальним та прямим білірубіном.

Клінічне значення

Білірубін представляє собою продукт розпаду гемоглобіну, який транспортується від селезінки до печінки та екскретується в жовчні протоки. Гіпербілірубінемія є результатом збільшення концентрації білірубину у плазмі.

Причини гіпербілірубінемії: Загальний білірубін. Збільшення гемолізу, генетичні порушення, неонатальна жовтяниця, неефективний еритропоез та лікарські препарати.

Прямий білірубін. Холестаз печінки, генетичні та гепатоклітинні порушення.

Клінічний діагноз не повинен базуватися на одному показникові, необхідно враховувати клінічні та інші лабораторні дані.

Склад набору

1. **Реагент 1.** Сульфанілова кислота - 30 ммоль/л, соляна кислота - 400 ммоль/л.
2. **Реагент 2.** Нітрит натрію - 50 ммоль/л.
3. **Реагент 3.** Кофеїн - 100 ммоль/л.
4. **Білірубін Калібратор** - точне значення вказано на етикетці флакона.
5. Інструкція з використання.
6. Паспорт.

Аналітичні характеристики

1. Лінійність вимірювального діапазону: 3.4-340 мкмоль/л.

Відхилення від лінійності не перевищує 5%. Якщо отримані результати були більше, ніж межі лінійності, розведіть зразки 1:1 (в два рази) NaCl 9 г/л та помножьте результат на два.

2. Чутливість не менш 3.4 мкмоль/л.

3. Коефіцієнт варіації результатів визначень – не більш 5%.

Матеріал для дослідження

Сироватка або плазма крові. Досліджувані сироватки або плазми повинні бути ретельно відокремлені від формених елементів крові не пізніше, ніж через 1 годину після взяття крові. Уникайте використання мутних, ліпідних та гемолітичних зразків.

Перелік необхідного устаткування

- Спектрофотометричне або колориметричне обладнання з довжиною хвилі 540 нм.
- Відповідні кювети з товщиною оптичного шару 1 см.
- Загальне лабораторне обладнання.

Підготовка реагентів

Перед використанням набір витримати при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

Діазосуміш (ДС): необхідно готувати безпосередньо перед роботою. Змішати **P1** та **P2** у співвідношенні 100:3.

Увага! Наявність незначного жовтого забарвлення в Діазосуміші не впливає на результати досліджень.

P3 готовий до використання.

Білірубін Калібратор: Флакони запечатані при низькому тиску, розкривати акуратно, щоб уникнути розпилення порошку ліофілізату. Додати до флакону 2 мл дистильованої води температурою 20-25°C. Закрити флакон кришкою, витримати при кімнатній температурі впродовж 30 хвилин. в захищеному від світла місці. Перемішати, обертаючи флакон кілька разів, уникаючи утворення піни.

Проведення аналізу

1. Умови вимірювання:

довжина хвилі 540 нм
 кювета з товщиною оптичного шару 1 см
 температура 15-25°C

2. Налаштувати прилад на нуль відносно дистильованої води.

3. Наповнення кювети: компоненти реакційної суміші відібрати та вносити в об'ємах, вказаних у таблиці.

	Білірубін загальний	Білірубін прямий	Холостий зразок (загальний + прямий)
Дослідний зразок/Калібратор, мл	0.5	0.5	0.5
P3 , мл	1.75	-	-
NaCl 9 г/л, мл	-	1.75	2.0
ДС, мл	0.25	0.25	-

Визначенні прямого білірубину:

інкубувати протягом 5 хв. при кімнатній температурі 15-25° С.

Необхідно провести вимірювання точно через 5 хв. після внесення діазосуміші, так як при тривалому стоянні в реакцію вступає непрямий білірубін.

Визначенні загального білірубину:

інкубувати протягом 20 хв. при кімнатній температурі 15-25° С. Провести вимірювання.

Прим. Об'єми реагенту, стандарту та зразку можуть бути пропорційно змінені відповідно до робочого об'єму кювети використовуваного аналізатора.

4. Виміряти оптичну щільність (E) дослідного зразка та калібратора проти відповідної холостої проби.

Примітки:

1. Для визначення білірубину у новонароджених розведіть зразок в чотори рази фізіологічним розчином (1:3). Результат помножити на 4.

Розрахунок результатів

Визначення загального білірубину.

Для приготування калібрувальних розчинів зробіть розведення Білірубін Калібратору, як вказано в таблиці.

№ пробірки	Білірубін Калібратор, мл	0.9% розчин натрію хлориду, мл	Концентрація білірубін калібратору, мкмоль /л
1	0.1	0.9	0.1 x a
2	0.2	0.8	0.2 x a
3	0.3	0.7	0.3 x a
4	0.4	0.6	0.4 x a
5	0.5	0.5	0.5 x a

a- концентрація білірубину, яка вказана на етикетці флакону.

Визначте концентрацію загального білірубину в дослідних зразках за допомогою:

1. Калібрувальна крива. Побудуйте калібрувальну криву, визначте концентрацію загального білірубину в дослідних зразках.

2. Фактор перерахунку. Обчисліть фактор перерахунку для кожного розведення Білірубін Калібратору та визначте середнє значення фактору:

$$F = \frac{C_{\text{кал}}}{E_{\text{кал}}}$$

Розрахуйте концентрацію загального білірубіну в досліджуваній пробі:

$$C_{\text{досл}} = E_{\text{досл}} \times F$$

де: F – фактор перерахунку

$C_{\text{кал}}$ - концентрація Білірубін Калібратор, мкмоль/л.

$E_{\text{кал}}$ - оптична щільність Білірубін Калібратор, оптичних одиниць.

$C_{\text{досл}}$ - концентрація досліджуваного зразка, мкмоль/л.

$E_{\text{досл}}$ - оптична щільність досліджуваного зразка, оптичних одиниць.

Визначення прямого білірубіну.

При визначенні прямого білірубіна рекомендується використовувати «Калібратор CFAS» (Іспанія).

Увага! Калібрувальний графік та фактор перерахунку перевіряють після зміни кожного реактиву, але не рідше одного разу на 3 місяці.

Референтні величини

Грунтуючись на результатах досліджень, проведених лабораторіями, рекомендуємо користуватися нормами, приведеними нижче. Разом з тим, відповідно до правил GLP (Гарної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити для себе параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

Нормальний рівень білірубіну в сироватці або плазмі крові становить:

Білірубін загальний до 18.81 мкмоль/л = 11 мг/л

Білірубін прямий до 4.27 мкмоль/л = 2.5 мг/л

Перехід в додаткові одиниці: мг/л x 1.71 = мкмоль/л.

Контроль якості

Контроль якості рекомендується здійснювати, використовуючи наступний контрольний матеріал: «СпЛ Контроль НОРМА», «СпЛ Контроль ПАТОЛОГІЯ» («Лабораторія Гранум», Україна); «SPINTROL N, P» (Іспанія), «ERBA NORM, PATH» (Чехія), «Serodos», «Human» (Германія). Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте апаратуру, реактиви та можливі технічні проблеми. Кожна лабораторія повинна встановити свої власні схеми контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

Зберігання та стабільність

Усі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці, якщо зберігати його щільно закритим при 2-8°C, в захищеному від світла місці та запобігати забруднення під час його використання.

Не використовувати реактиви після закінчення терміну придатності (12 міс.).

Заходи безпеки

P1 їдка речовина. Уникайте вдихання, контакту зі шкірою, очами або слизовою оболонкою. Якщо це сталося, негайно промийте їх великою кількістю води, проконсультуйтеся з лікарем.

Ознаки погіршення реагентів

- Присутність часток і помутніння.

- В **P2** розвивається колір.