

ТУ У 20.5-24607793-025:2019

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ТА/АБО ПРЯМОГО БІЛІРУБІНУ У СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ КРОВІ

ПРИЗНАЧЕННЯ

IVD

Набір призначений для визначення концентрацій загального та/або прямого білірубину у сироватці або плазмі крові людини в клініко-діагностичних та біохімічних лабораторіях, науково - дослідницькій практиці.

Набір розрахований (з урахуванням холостих та калібрувальних проб) на відповідну кількість визначень білірубину (Див. *Примітку 2*).

Код за НК 024:2023 - 53229 (загальний)

Код за НК 024:2023 - 53233 (прямий)

REF	мікро	напівмікро	макро	REF	мікро	напівмікро	макро
<u>HP005.07</u>	<u>200</u>	<u>100</u>	<u>50</u>	<u>HP005.10</u>	<u>200</u>	<u>100</u>	<u>50</u>
<u>HP005.08</u>	<u>500</u>	<u>250</u>	<u>125</u>	<u>HP005.11</u>	<u>500</u>	<u>250</u>	<u>125</u>
<u>HP005.09</u>	<u>600</u>	<u>300</u>	<u>150</u>	<u>HP005.12</u>	<u>600</u>	<u>300</u>	<u>150</u>

Код за НК 024:2023 - 63410 (прямий та загальний)

<u>HP005.04</u>	<u>200+200</u>	<u>100+100</u>	<u>50+50</u>
<u>HP005.05</u>	<u>500+500</u>	<u>250+250</u>	<u>125+125</u>
<u>HP005.06</u>	<u>600+600</u>	<u>300+300</u>	<u>150+150</u>

Діапазон визначаємих концентрацій - від 0,1 мг/л до 200 мг/л (від 1,5 мкмоль/л до 342 мкмоль/л).

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 5 %.

Чутливість⁸ на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 0,6 мкмоль/л (555 нм).

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

ПРИНЦИП МЕТОДУ

В присутності диметилсульфоксиду (ДМСО) діазотована сульфанілова кислота утворює з непрямым та зв'язаним (прямим) білірубіном азобілірубін рожево-фіолетового кольору. Інтенсивність забарвлення дослідного розчину прямопропорційна концентрації загального білірубину у пробі. У відсутності ДМСО до реакції вступає лише прямий білірубін. По різниці між загальним та прямим білірубіном визначають концентрацію непрямого (вільного) білірубину.

Інтенсивність забарвлення, яка вимірюється при довжині хвилі 555 (± 10) nm, прямо пропорційна концентрації білірубину^{1,2}.

СКЛАД НАБОРУ

- Сульфаніловий реактив
 - сульфанілова кислота (30,0 ± 1,5) ммоль/л
 - HP005.04, HP005.10 - 3 флакони по (100 ± 2) мл;
 - HP005.05, HP005.11 - 6 флаконів по (125 ± 2) мл;
 - HP005.06, HP005.12 - 1 флакон з (900 ± 20) мл;
- ДМСО реактив
 - сульфанілова кислота (30,0 ± 1,5) ммоль/л
 - HP005.04, HP005.07 - 3 флакони по (100 ± 2) мл;
 - HP005.05, HP005.08 - 6 флаконів по (125 ± 2) мл;
 - HP005.06, HP005.09 - 1 флакон з (900 ± 20) мл;
 - ДМСО - (7,00 ± 0,35) моль/л
- Розчин нітриту натрію
 - нітрит натрію (29 ± 1) ммоль/л
 - HP005.04 - 1 флакон з (21,0 ± 0,5) мл;
 - HP005.07, HP005.10 - 1 флакон з (11,0 ± 0,5) мл;
 - HP005.05 - 1 флакон з (51 ± 1) мл;
 - HP005.08, HP005.11 - 1 флакон з (26,0 ± 0,5) мл;
 - HP005.06 - 1 флакон з (62 ± 2) мл;
 - HP005.09, HP005.12 - 1 флакон з (31 ± 1) мл.

ЗРАЗОК

Сироватка, плазма крові.

Гемоліз неприпустимий. Зразки стабільні при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С протягом 5 годин або до 30 діб при температурі мінус 20 °С. Уникати повторного заморожування та відтаювання зразка. Уникати попадання світла. Сироватки, з концентрацією білірубину більше 200 мг/л, розводять фізіологічним розчином. Результат визначення множать на показник розведення.

При визначенні білірубину у немовлят для проведення аналізу сироватку розводять фізіологічним розчином в співвідношенні 1:4 (наприклад: 0,01 мл сироватки та 0,04 мл фізіологічного розчину).

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **555 нм** в діапазоні (0-1) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм. (**Можливо використання автоматичного аналізатора. Інструкція для автоматичного аналізатора висилається за замовленням споживача.**)
2. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
3. Піпетки місткістю 0,1, 1,0 та 5,0 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

Всі розчини готові до застосування і придатні до терміну, вказаного на упаковці, при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С за умови запобігання від улучення світла.

Негайно закривати флакони після закінчення роботи, щоб уникнути випаровування реактиву або його контамінації.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводять у відповідності зі схемою, наведеною у таблиці 1.

Таблиця 1

Відміряти у пробірці, мл	Макро аналіз				Напівмікро аналіз				Мікро аналіз			
	Загальний білірубін		Прямий білірубін		Загальний білірубін		Прямий білірубін		Загальний білірубін		Прямий білірубін	
	Дослід. проба	Холоста проба	Дослід. проба	Холоста проба	Дослід. проба	Холоста проба	Дослід. проба	Холоста проба	Дослід. проба	Холоста проба	Дослід. проба	Холоста проба
ДМСО реактив	3,0	3,0	-	-	1,50	1,50	-	-	0,750	0,750	-	-
Сульфаніловий реактив	-	-	3,0	3,0	-	-	1,50	1,50	-	-	0,750	0,750
Аналізуємий зразок	0,2	0,2	0,2	0,2	0,10	0,10	0,10	0,10	0,050	0,050	0,050	0,050
Ретельно перемішати, внести												
Фізіологічний розчин	-	0,1	-	0,1	-	0,05	-	0,05	-	0,025	-	0,025
Розчин нітриту натрію	0,1	-	0,1	-	0,05	-	0,05	-	0,025	-	0,025	-
Ретельно перемішати. Для визначення прямого білірубину або загального білірубину фотометрування слід проводити рівно через 5 хв після додавання Розчину нітриту натрію (при температурі від плюс 18 °С до плюс 25 °С). Вимірювання оптичної щільності дослідних проб проводять проти відповідної холостої проби . Фотометрування – див. розділ «Обладнання».												

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Розрахунок концентрації **прямого** або **загального** білірубину проводять за формулою (1):

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times C_{\text{кал.}}, \text{ де} \quad (1)$$

- $C_{\text{кал.}}$ – відповідна концентрація **прямого** або **загального** білірубину в відповідному калібрувальному розчині (наприклад: **“Калібратор білірубину В” (REF НК005.03.03) з набору “Калібратори білірубину” (REF НК005.03))**, мкмоль/л;
- $E_{\text{досл.}}$ - оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;
- $E_{\text{кал.}}$ - оптична щільність відповідної калібрувальної проби, од. опт. щільності;
- C – концентрація **прямого** або **загального** білірубину в дослідній пробі, мкмоль/л.

Розрахунок концентрації загального білірубіну також можливо проводити за калібрувальним графіком. **Калібрувальні розчини** для нього готують, використовуючи набір реактивів “Білірубін калібратор” (**REF НК005.02**).

Проаналізуйте калібрувальні розчини білірубіну за схемою проведення аналізу **загального білірубіну**.

Для визначення концентрації **непрямого** білірубіну з величини показника **загального** білірубіну віднімають величину показника **прямого** білірубіну.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції та процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки зі значеннями концентрації, визначеними даним методом. Наприклад: Diacon N, Diacon P (Австрія), TruLab N, TruLab P (Німеччина), ”ФілоНорм” або „ФілоПат” (Україна).

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ

загальний білірубін, мкмоль/л ⁶

Вік	Недоношені	Доношені
Кров з пуповини	< 34	< 34
0-1 доба	< 137	24 - 149
1-2 доба	< 205	58 - 197
3-5 доба	< 274	26 - 205
> 5 діб - 60 років	5 - 21	
60- 90 років	3 - 19	
> 90 років	3 - 15	

непрямий білірубін ⁷ - 6,3 - 15,4 мкмоль/л

прямий білірубін ⁷ - 2,2 - 5,13 мкмоль/л

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (*Належної Лабораторної Практики*) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Білірубін є продуктом розпаду темної частини гема, що вивільняється із старіючих або пошкоджених еритроцитів, які руйнуються в ретикулоендотеліальній системі. Потім білірубін транспортується в печінку з альбуміном. Усередині гепатоцитів білірубін зв'язується з глюкуроновою кислотою і екскретує в жовч.

Існують спадкові і набуті захворювання, при яких порушується синтез, зв'язування, метаболізм і екскреція білірубіну, які призводять до гіпербілірубінемії ^{3,4}.

Гіпербілірубінемія незв'язаного білірубіну спостерігається у новонароджених (фізіологічна жовтуха), при підвищеному руйнуванні еритроцитів (гемолітична анемія, обширні гематоми), при неефективному еритропоезі і при деяких рідкісних генетичних захворюваннях (синдром Жільбера, Синдром Кріглера-Найяра).

Гіпербілірубінемія зв'язаного білірубіну викликана зниженою екскрецією жовчі при ураженні печінки (гепатит, цироз) або внутрішньопечінкового або позапечінкового холестазу.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Гемоліз впливає на хід визначення (гемоглобін до 10 г/л не заважає визначенню). Ліпемія (тригліцериди > 50 мг/л) заважає визначенню.

На хід визначення можуть впливати деякі ліки і речовини ^{4,5}.

ПРИМІТКИ

1. Перед визначенням білірубіну обстежувана людина не повинна приймати ліки та харчі, які викликають штучне забарвлення сироватки (морква, апельсин), а також вітамін «С».
2. **Розраховано на загальний об'єм реакційної суміші: 3,3 мл (макро-), 1,65 мл (напівмікро-), 0,825 мл (мікро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:**
ДМСО реактив (Сульфаніловий реактив) : Аналізуємий зразок : Розчин нітриту натрію =
= 30 : 2 : 1

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Розчини включають соляну кислоту (їдка речовина), сульфанілову кислоту (подразнююча речовина).

УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1. Pearlman FC and Lee RTY. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents. Clin Chem 1974; 20: 447-453.
2. Zoppi F, Peracino A, Fenili D, Marcovina S and Ramella C. Metodo per la determinazione della bilirubina totale e coniugata. Uso di un tensioattivo cationico come agente solubilizzante. Giorn It Chim Cl 1976; 1: 343-359
3. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994.
4. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory test, 3th ed. AACC Press, 1997.
5. Yound DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
6. Энциклопедия клинических лабораторных тестов, под редакцией Н.У. Тица, стр. 84 - 86, «Лабинформ», Москва, 1997.
7. Нормальні показники лабораторних досліджень. під ред. Є.Л. Гофмана, Львів, 1998, с.40.
8. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).



ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,
Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32
Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34
Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54
E-mail: felicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>