

Инструкция по применению
«Набора реагентов для определения билирубина
в крови по Йендрашику»
(«Билирубин-диазо»)

Торговая форма и состав набора

Кат №	1. Диазореактив I-75 см ³ :	
1.082.0.05	- сульфаниловая кислота	0,375 г
	- соляная кислота (конц.)	1,125 см ³
	- вода дистиллированная	до 75 см ³
	2. Диазореактив II:	
	- нитрит натрия	0,100 г
	3. Кофеиновый реактив:	
	- кофеин	2,5 г
	- бензоат натрия	3,75 г
	- ацетат натрия	6,25 г
	4. Концентрат физиологического раствора (22,5%)- 10 см ³ :	
	- натрий хлористый	2,25 г
	- вода дистиллированная	до 10 см ³

Принцип метода

В основу метода положена реакция взаимодействия диазотированной сульфаниловой кислоты со связанным билирубином сыворотки. По интенсивности образующейся окраски судят о концентрации билирубина, вступающего в прямую реакцию. При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива, несвязанный билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние, благодаря чему он также вызывает окрашивание раствора со смесью диазореактивов. По интенсивности этой окраски фотометрически определяют концентрацию общего билирубина. По разнице между общим и связанным билирубином находят содержание несвязанного билирубина.

Образцы

Сыворотка крови, свободная от гемолиза, липемии.

Приготовление растворов

Диазореактив I: поставляется в готовом к использованию виде. Раствор устойчив.

Диазореактив II: во флакон с диазореактивом II внести 20 см³ дистиллированной воды и перемешать до полного растворения соли. Раствор нестойкий, хранится 2-3 недели в темном прохладном месте. Признак непригодности – появление желтого оттенка.

Кофеиновый реактив: содержимое флакона растворить в горячей (70-80° С) дистиллированной воде, охладить, перенести в мерную колбу вместимостью 250 см³ и довести до метки дистиллированной водой. Отфильтровать раствор через бумажный фильтр. Раствор годен 3-4 недели при условии хранения 5-15° С.

Концентрат физиологического раствора (22,5%): для приготовления физиологического раствора содержимое флакона (10 см³) перенести в мерную колбу вместимостью 250 см³ и довести до метки дистиллированной водой.

Проведение анализа

Длина волны: 500-560 нм (зеленый светофильтр), кювета 1 см.

Перед работой смешивают 10 см³ диазореактива I и 0,3 см³ диазореактива II и получают диазосмесь.

Соотношение компонентов в реакционной смеси

Раствор	Общий билирубин, см ³	Связанный билирубин, см ³	Контрольная проба, см ³
Сыворотка	0,50	0,50	0,50
Кофеиновый реактив	1,75	-	1,75
Физраствор	-	1,75	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	-

При определении общего билирубина пробу для развития окраски оставляют стоять 20 мин. При дальнейшем стоянии пробы окраска не изменяется. Для исследования связанного билирубина колориметрирование осуществляется спустя 5-10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии пробы в реакцию вступает свободный билирубин. Контрольную пробу на мутность сыворотки ставят для каждой опытной пробы.

Расчет

Расчет проводят по градуировочному графику. Находят содержание общего и связанного билирубина в мкмоль/дм³. Для определения уровня несвязанного (свободного) билирубина из цифры общего его содержания вычитают показатель связанного билирубина (прямого).

Нормальные значения

Общий билирубин	8,55 – 20,52 мкмоль/дм ³
Связанный билирубин	2,1 – 5,1 мкмоль/дм ³
Свободный билирубин	6,45 – 15,42 мкмоль/дм ³

Примечания

• При работе на спектрофотометре «Солар» либо микроколориметре используют микровариант. Для этого объемы всех реактивов и сыворотки крови уменьшают в 2,5 раза. Аналогичным способом строят калибровочный график.

• В случае помутнения рекомендуется после развития окраски (перед колориметрированием) добавить в пробы по 3 капли 30% NaOH. Цвет раствора при этом изменяется на зеленый и необходимо использовать красный светофильтр (длина волны 625 – 750 нм).

• Содержание билирубина (в мкмоль/дм³) находят по калибровочному графику, построенному по калибровочным растворам билирубина. Можно использовать калибровочный раствор билирубина (билирубин-стандарт) различных зарубежных производителей, разрешенный МЗ РБ к применению на территории Республики Беларусь и который поставляется отдельно.

Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться при температуре 15-25°С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности (12 месяцев от даты производства) в темном месте.

Предохранять от света и загрязнений!



Инструкция по применению
«Набора реагентов для определения общего билирубина»
(«Билирубина-ДФД»)

Торговая форма и состав набора

Кат	№	1. Реагент 1 – 300 см ³
1.082.0.06		2. Реагент 2 – 75 см ³

Принцип метода

Непрямой билирубин высвобождается при помощи детергента. Общий билирубин реагирует с 3,5-дихлорфенил-диазолин-тетрафторборатом (ДФД) с образованием соответствующего азобилирубина. Абсорбция этого окрашенного соединения при 546 нм прямо пропорциональна концентрации в исследуемом образце общего билирубина.

Подготовка и стабильность реагентов

Реагенты готовы к использованию. Реагенты в невскрытых флаконах сохраняются при 2-8 °С до указанного срока годности. После открытия, реагенты сохраняются на борту анализаторов при 2-12 °С в течение 30 суток. Реагент 2 хранить в защищенном от света месте.

Исследуемый материал

Сыворотка или гепаринизированная плазма.

Избегать гемолиза!

Пробу хранить в защищенном от света месте!

Стабильность: Билирубин в сыворотке или плазме в защищенном от света месте стабилен в течение 3 суток при 2-8°С, либо вплоть до 3 месяцев при – 20°С.

Методика анализа

Длина волны: 546 нм (520 – 560 нм)

Длина оптического пути: 1 см

Температура: 25°С или 37°С

Измерение проводят относительно бланка реагента.

Схема пипетирования*.

В кюветы пипетировать		
	Холостая проба	Опытная проба
Проба или калибратор	----	20 мкдм ³
Дистиллированная вода	20 мкдм ³	---
Реагент 1	1000 мкдм ³	1000 мкдм ³
Основательно перемешать и 5 минут инкубировать при 37°С или 10 минут при 25°С		
Измерить абсорбцию A1		
Реагент 2	250 мкдм ³	250 мкдм ³
Перемешать, инкубировать 5 мин при 37°С или 10 минут при 25°С.		
Измерить поглощение A2. $\Delta A = A2 - A1$		

* При использовании микрокувет объемы можно уменьшить

Расчет

$\Delta A_{546} = \Delta A$ опытной пробы/ калибратор - ΔA холостой пробы

Конц. общего билирубина (мг/ддм³) = ΔA пробы * Фактор

Фактор 546 нм = 91,6

Фактор 546 нм = Скалибратор / ΔA калибратор

Концентрация общего билирубина (мкмоль/дм³) =
концентрация общего билирубина (мг/ддм³) x 17,1

Характеристика

Линейность до 30 мг/ддм³.

При более высокой концентрации общего билирубина исследуемую пробу необходимо разбавить: к 1 см³ пробы прибавить 4 см³ физиологического раствора хлористого натрия (0,9%) и повторить определение, результат умножить на 5.

Нормальные значения

Общий билирубин	мкмоль/дм ³	мг/ддм ³
• 24 часа до :	150	До 8,7
• После 2 суток :	22 - 193	1,3-11,3
• После 3 суток :	12 – 217	0,7-12,7
• 4 – 6 сутки :	2 – 216	0,1-12,6
• Дети	3 -17	0,2-1,0
• Регистрация МИ в Росздравнадзоре		0,1-1,2

www.nevacert.ru | info@nevacert.ru

Примечание

1. Билирубин является светочувствительным, поэтому пробы должны находиться в темноте.

2. Воздействие света на пробу может ложно снизить концентрацию в ней билирубина. При исследовании гемолизированных проб в них будет наблюдаться ложно сниженные концентрации билирубина поскольку гемоглобин тормозит диазо-реакцию.

3. Тест может быть выполнен и с добавлением 50 мкдм³ пробы или калибратора, но это приведёт к снижению линейности реагента до 2: мг/ддм³.

Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться при температуре 2-8°С в упаковке производителя-изготовителя в течение всего срока годности (12 месяцев от даты производства) в темном месте.

Предохранять от света и загрязнений!



Handwritten signature in blue ink: "Ильин Т.А."