БИЛИРУБИН ПРЯМОЙ и ОБЩИЙ (bilirubin direct and total) 1001041

Метод Ендрассика-Грофа для количественного определения прямого и общего билирубина в сыворотке.

IVD (для диагностики in vitro) Хранить при 2–8°C.

Код: 1001041 R1 1x60 мл, R2 1x10мл, R3 1x150 мл

ПРИНЦИП МЕТОДА

Билирубин превращается в окрашенный азобилирубин в реакции с диазотизированной сульфаниловой кислотой (ДСК) и измеряется фотометрически. В сыворотке присутствуют две фракции билирубина: билирубин-глюкоронид и свободный билирубин, слабо связанный с альбумином, только первый напрямую реагирует в водном растворе (прямой билирубин), тогда как свободный билирубин требует для реакции растворения с кофеином (непрямой билирубин). При определении непрямого билирубина прямой также определяется, результат соответствует общему билирубину. Интенсивность окраски на длине волны 540 нм прямо пропорциональна концентрации билирубина в пробе[1,2,3].

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Билирубин – это продукт разложения гемоглобина, растворим в воде. Он транспортируется из селезенки в печень и выводится с желчью. Гипербилирубинемия – это повышение концентрации билирубина в плазме. Причины гипербилирубинемии:

- общий билирубин: повышение гемолиза, генетические заболевания, желтуха новорожденных, неэффективный эритропоэз и лекарства.
- прямой билирубин: гепатохолестаз, генетические заболевания, повреждение гепатоцитов[1,6,7].

Клинический диагноз не должен ставиться по результатам одиночного теста; он должен быть основан на совокупности клинических и других лабораторных данных.

РЕАГЕНТЫ

Реагент 1 (R1) Общий билирубин	Сульфаниловая кислота Соляная кислота (HCl)	30 ммоль/л 400 ммоль/л
Реагент 2 (R2)	Нитрит натрия	50 ммоль/л
Реагент 3 (R3)	Кофеин	100 ммоль/л
Дополнительно	(не входит в набор) Калибратор билирубина	Кат.№ 1002250

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

R1/ RT: Коррозирующее вещество (C): R35: Может быть причиной тяжелых ожогов.
S26: В случае попадания в глаза немедленно промойте большим количеством воды и обратитесь за медицинской помощью.

ПОДГОТОВКА

Все реактивы готовы к использованию.

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАКТИВОВ

Все компоненты набора стабильны вплоть до указанной на упаковке даты (Expiration Date) в плотно закрытых флаконах при 2-8°C. Избегать прямого солнечного света и контаминации при использовании. Не используйте реагенты после окончания срока хранения.

Признаки порчи реагентов:

- наличие частиц и мутности;
- развитие окраски в реагенте 2.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

- Спектрофотометр или биохимический анализатор с фильтром 540 нм.
- Соответствующие кюветы с длиной оптического пути 1,0 см.
- Обычное лабораторное оборудование.

ПРОБЫ

Сыворотка или плазма, без гемолиза[1]. Хранить в защищенном от света месте до начала определения. Стабильность в пробе до 3 месяцев при –18.. –20°C, до 4 дней при 2-8°C и 1 день при 15-25°C.

ПРОЦЕДУРА

1. Условия теста:
   Длина волны: 540 нм
   Оптический путь: 1 см
   Температура: 15-25°C
   Измерение: против бланка по каждой пробе.
   Метод: по конечной точке по фактору (299,25) или по стандарту (...), время инкубации точно 5 мин (15-25°C)
2. Установите прибор на ноль по дистиллированной воде.
3. Отдозируйте в кюветы:

	Общий билирубин	Прямой билирубин	Бланк
Реагент 1	200 мкл	200 мкл	200 мкл
Реагент 2	1 капля (40мкл)	1 капля (40мкл)	–
Физраствор	–	2,000 мл	2,000 мл
Реагент 3	2,000 мл	–	–
Проба	200 мкл	200 мкл	200 мкл

4. Перемешать, инкубировать точно 5 мин при комнатной температуре (15-25°C).
5. Измерить оптическую плотность каждой пробы против собственного бланка при 540 нм (A).

ВЫЧИСЛЕНИЕ

С калибратором:

$$\text{С общего билирубина (мкмоль/л)} = \text{С калибратора} \times \frac{\text{А пробы} - \text{А бланка пробы}}{\text{А калибратора} - \text{А бланка калибратора}}$$

По фактору:

Общий билирубин (мкмоль/л) = (А пробы – А бланка пробы) x 299,25

Коэффициент пересчета: мг/дл x 17.1 = мкмоль/л.

Для всех методик по конечной точке по фактору необходимо определять коэффициент (фактор) для конкретного прибора по стандарту (калибратору), так как возможно различие в фильтрах, длине оптического пути и т.д.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Рекомендуется использовать контроли с каждой серией проб. Для контроля могут быть использованы нормальные и патологические контрольные сыворотки SPINTROL (кат.№ 1002120 и 1002210). Если результаты контроля вне определенного диапазона, проверьте прибор, реагенты и калибратор.

Каждая лаборатория должна определять собственную систему ведения контроля качества и действий для коррекции при выходе контроля за приемлемые границы.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ1

Общий билирубин: до **18,81 мкмоль/л** (до 1,10 мг/дл)

Прямой билирубин: до **4,27 мкмоль/л** (до 0,25 мг/дл)

Эти значения даны для ориентировочных целей, каждая лаборатория должна определять собственный референсный диапазон.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТА

Диапазон измерения: от *уровня определения* в 1,71 мкмоль/л (0,1 мг/дл) до *предела линейности* в 342 мкмоль/л (20 мг/дл). Если получаемые результаты выходят за предел линейности, разведите пробы в два раза физраствором (NaCl 9 г/л) и умножьте результат на 2.

Воспроизводимость:

Прямой билирубин:	Внутри серии тестов (n=20)		Между сериями тестов (n=20)	
Среднее (мкмоль/л)	0,78	2,28	0,80	2,18
SD	0,01	0,01	0,01	0,03
CV %	1,28	0,65	1,63	1,53

Общий билирубин:	Внутри серии тестов (n=20)		Между сериями тестов (n=20)	
Среднее (мкмоль/л)	1,16	4,21	1,15	4,27
SD	0,02	0,04	0,02	0,13
CV %	2,03	1,06	1,91	3,10

Чувствительность: Общий билирубин:1 мг/дл = 0,079 A; Прямой билирубин: 1 мг/дл = 0,087 A.

Правильность: результаты, полученные с помощью этого теста (y) при сравнении с другими, полученными с использованием коммерческих реагентов (x) с похожими характеристиками, не давали систематических различий.

Результаты обследования 50 пациентов были следующими:

Прямой билирубин: (r) 0,99. Уравнение регрессии: y=0,9923x + 0,0048.

Общий билирубин: (r) 0,99. Уравнение регрессии: y=0,9832x + 0,0224.

Результаты характеристик теста зависят от используемого анализатора.

ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

Гемолиз вызывает повышение уровня билирубина[1,2,3]. Список лекарств и других веществ, влияющих на определение билирубина, представлен в работах Young и др.[4,5].

ПРИМЕЧАНИЯ

1. При определении билирубина у новорожденных, для пробы дозируйте 50 мкл сыворотки. Умножьте результат на 4.
2. **У SPINREACT есть адаптации инструкций для многих автоматических анализаторов. Инструкции для них доступны по запросу**.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241, 436 and 650.
2. Malloy H T et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem 1937; 112 (2): 481-491.
3. Jendrassik L et al. Biochemische Zeitschrift Band 1938; 297:80-89.

4. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
5. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
6. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
7. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.