

A szérumbilirubin koncentrációjának meghatározására szolgáló reagenskészlet.
Diazo-szulfanilsavas módszer.

A meghatározás elve

A szulfanilsav nátrium-nitrittel diazotált szulfanilsavat képez. Dimetilszulfoxid jelenlétében a diazotált szulfanilsav az összes bilirubinnal reagál és azobilirubint képez. Dimetil-szulfoxid hiányában csak a direkt bilirubinnal képződik komplex. Az 555 nm-en mért abszorbancia arányos a bilirubin koncentrációjával.

Referencia-értéktartomány

Szérumbilirubin	<5,0 μmol/l (<3mg/l)
total bilirubin	3-17 μmol/l (0,2-1 mg/dl)

Minden laboratóriumnak ajánlott a saját normál tartományát meghatározni.

Reagens

A) Totál Bilirubin

1. Reagens (RT1)	
szulfanilsav	3,2 mmol/l
sósav	165 mmol/l
dimetil-szulfoxid	7 mol/l

2. Reagens (R2)	
nátrium-nitrit	8,6 mmol/l

B) Direkt Bilirubin

1. Reagens (RD1)	
szulfanilsav	3,2 mmol/l
sósav	165 mmol/l

2. Reagens (R2)	
nátrium-nitrit	8,6 mmol/l

Minta

Hemolizismentes szérumbilirubin. Stabilitás: 7 nap 2-8°C-on.

A minta fénytől védve tartandó! A bilirubin a kontrollban és a mintában is gyorsan bomlik. A kontrollok használata során a gyártók előírásait mindig tartsák be!

A reagens újszülött bilirubin koncentrációjának meghatározására nem alkalmas.

Reagens stabilitása

Fénytől védve és 2-8 °C-on tárolva

Total:

felbontás nélkül:	a címkén jelzett ideig
felbontás után:	30 napig használhatók.
kalibrációs gyakoriság:	3 nap
onboard stabilitás:	3-10 nap

Direkt:

felbontás nélkül:	a címkén jelzett ideig,
felbontás után:	30 napig használhatók.
kalibrációs gyakoriság:	1 nap
onboard stabilitás:	1-3 nap

A stabilitások kizárólag új rendszerflakon használata esetén érvényesek!

A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE

A reagens felhasználásra kész.

A munkareagens elkészítése

A: Totál bilirubin

Az RT1 és R2 keverési aránya: 125 ml/25ml

B: Direkt bilirubin

Az RD1 és R2 keverési aránya: 125 ml/25ml

A munkareagens csak egyreagensként használható!

A munkareagens stabilitása

Amennyiben a munkareagens 546 nm-en mért abszorbanciája meghaladja 0,02-t a reagens nem használható.

A mérési eljárás

Elsődleges hullámhossz:	555 nm (540-560 nm)
Másodlagos hullámhossz:	600 nm
Hőmérséklet:	37 °C
Fényút:	1 cm
Mérési mód:	végpontos
Mérés:	reagens vakkal szemben

Bemérés

Totál és direkt bilirubin:

	minta	kalibrátor
munkareagens	1,0 ml	1,0 ml
minta	75μl	-
kalibrátor	-	75μl

Keverjük össze és pontosan 3 perces inkubáció után olvassuk le az abszorbanciaértéket.

Kalibráció: (37°C, diazo-szulfanilsavas módszer)

S1:Desztillált víz

S2:Randox Calibration Serum Level I

S3:Randox Calibration Serum Level II

Ajánlott új kalibrációt végezni:

- új gyártási számú készlet felbontásakor,
- ahogy ezt a laboratórium belső minőségügyi rendszere előírja.

Az eredmény kiszámítása

$$\frac{A_{Minta}}{A_{Kalibrátor}} \times C_{Kalibrátor} = C_{Minta}$$

A = abszorbancia, C = koncentráció

Belső minőségellenőrzés

A minőségellenőrzés ajánlott minden laboratóriumnak. Két különböző szintű (egy normál és egy emelkedett) kontrollt javasolunk. A kontrollok mért értékeinek a gyártó által meghatározott tartományba kell esniük. Ha a tartományon kívül esnek az értékek, ajánlott korrigálni a méréseket. Ajánlott kontrollok: Diagnosticum DunaCont N (Katalógusszám: Dcon-N) és DunaCont P (Katalógusszám: Dcon-P)

A REAGENS TELJESÍTMÉNY-JELLEMZŐI

A méréseket Olympus 600-as automatán végeztük (37°C). Átváltás: [μmol/l]=17,1×[mg/dl]

Linearitás

A total módszer 3,5 - 340 μmol/l (0,2 - 20 mg/dl) lineáris. A direkt módszer 1 - 100 μmol/l (0,06 - 58,8 mg/l) között lineáris.

Kimutatósi határ Direkt: 0,07 μmol/l (0,004 mg/dl) Total: 0,31 mmol/l (0,018 mg/dl)

Érzékenység

Minden laboratórium számára ajánlott meghatározni saját érzékenységi határt, mivel ezt az alkalmazott spektrofotométer érzékenysége is befolyásolja. A kézi mérés körülményei között 540 nm-en mért 0,001 abszorbanciaváltozás megegyezik 1,42 μmol/l (0,08 mg/dl) totál bilirubin illetve 0,575 μmol/l (0,034 mg/dl) direkt bilirubin koncentrációval.

Direkt bilirubin

Precizitás	Reprodukálhatóság		
	n=20	Átlag konc. (μmol/l)	SD
1 minta	13,84	0,282	2,04
2 minta	37,76	1,053	2,79

Korreláció

Reagensünket összehasonlítottuk más gyártó bilirubin direkt reagensével.

A korrelációs regresszió adatai a következők:

korrelációs koefficiens: r = 0,9957, lineáris regresszió: y (μmol/l) = 1,05x - 0,52 (x= más gyártó reagens, y= saját reagens)

Totál bilirubin

Precizitás	Reprodukálhatóság		
	n=20	Átlag konc. (μmol/l)	SD
1 minta	18,9	0,756	4,00
2 minta	82,32	2,902	3,53

Korreláció

Reagensünket összehasonlítottuk más gyártó bilirubin totál reagensével.

A korrelációs regresszió adatai a következők:

korrelációs koefficiens: r = 0,9998, lineáris regresszió: y (μmol/l) = 0,988x - 0,978 (x= más gyártó reagens, y= saját reagens)

Szelektivitás

Lipid 4 g/l-ig, glükóz 10 g/l-ig (55,5 mmol/l) aszkorbinsav 0,5 g/l-ig (2,84 mmol/l) nem befolyásolja a mérést.










Megjegyzés

A bilirubin a kontrollban és a mintában is gyorsan bomlik. A kontrollok használata során a gyártók előírásait mindig tartsák be!

Ne használja a reagenst a csomagolása címkéjén feltüntetett lejárati dátum eltelté után. A készítményeket, tesztoldatokat és reagenseket csak az itt leírt teszthez szabad felhasználni.

Csak in vitro diagnosztikai használatra alkalmas!

A címkéken a következő szimbólumok lehetnek

	In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz		Gyártási szám
	Gyártó		Kódszám
	CE-jelölés		Tárolási irány
	Tárolási hőmérséklet		Biológiai veszély
	Lejárati idő (év/hónap)		

Irodalom

Hijmans Van den Bergh A. A., Muller P.: *Biochem*, 77; 90, (1916).

Walters M. L., Gerarde R. W.: *Microchem*, 15; 231 (1970).

Szabó A.: *Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek (2010) (ISBN 978-963-9879-75-1)*

Verzió: 27-DL-2017-12

Felülvizsgálat dátuma: 2017-01

Cat. No.: 42741, 712743
Size: 2x150 ml
(1x125 ml + 1x125 ml + 1x50 ml)

Reagent kit for the quantitative determination of total and direct bilirubin in serum. Diazo-sulfanilic acid method.

Principle

Sulfanilic acid reacts with sodium nitrite to form diazotized sulfanilic acid. In the presence of dimethylsulfoxide, total bilirubin reacts with diazotized sulfanilic acid to form azobilirubin. In the absence of dimethylsulfoxide, only the direct bilirubin reacts to give azobilirubin.

Reference value

Serum: direct bilirubin <5 µmol/l (<0,3mg/dl)
Adult total bilirubin 3-17µmol/l (0,2-1,0mg/dl)
Children, >1 month 3,4-17 µmol/l (0,2-1,0 mg/dl)

It is recommended that each laboratory should assign its own normal range.

Reagents

- A) Total Bilirubin
1. Reagent (RT1)
Sulfanilic acid 3.2 mmol/l
Hydrochloric acid 165mmol/l
Dimethylsulfoxide 7 mol/l
2. Reagent (R2)
Sodium nitrite 8.6 mmol/l
B) Direct Bilirubin
1. Reagent (RD1)
Sulfanilic acid 3.2 mmol/l
Hydrochloric acid 165mmol/l
2. Reagent (R2)
Sodium nitrite 8.6 mmol/l

Sample

Serum free of haemolysis. Stability: 7 days at 2-8°C.

Bilirubin is light sensitive and it is recommended that serum be stored in the dark.

The bilirubin decomposes fast in the serum and controls.

The reagent is not suitable for bilirubin determination of infants.

Stability

Avoid direct exposure to light!

Total

without opening: till the expiry date indicated on the label
after opening: 30 days
calibration frequency: 3 days
onboard stability: 3-10 days

Direct

without opening: till the expiry date indicated on the label
after opening: 30 days
calibration frequency: 1 days
onboard stability: 1-3 days

Stability data are valid only when using new system bottle!

PROCEDURE

All reagents are ready for use.

Preparation of working reagent

A: Total bilirubin

Mixing ratio of RT1 and R2: 125 ml/25ml

B: Direct bilirubin

Mixing ratio of RD1 and R2: 125 ml/25ml

Reagents can only be applied with previous mixing!

Stability of the working reagent

If the absorbance of working reagent is higher than 0.02 at 546 nm the reagent can not be used.

Assay Conditions

Wavelength: 555 nm (540-560 nm)
Secondary wavelength: 600 nm
Temperature: 37 °C
Cuvette: 1 cm light path
Method: end point
Read against: reagent blank

Pipette into cuvette

Total and direct bilirubin:

	Sample	Calibrator
Working reagent	1.0 ml	1.0 ml
Sample	75µl	-
Calibrator	-	75µl

Mix and read the optical density (A) after exactly 3 minutes incubation.

Calibration: (37°C, Diazo with Sulfanilic Acid)

S1: Distilled water
S2: Diagnosticum DunaCal Cat. No.: Deac or Randox Calibration Serum Level I or II or Roche C.F.A.S. (Calibrator for automated system)
Calibration is recommended:

- after reagent lot change,
- as required following quality control procedures.

Calculation using calibration

$$\frac{A_{Sample}}{A_{Calibrator}} \times C_{Calibrator} = C_{Sample}$$

A = optical density; C = concentration

Quality control

A quality control program is recommended for all clinical laboratories. The analysis of control material in both the normal and abnormal ranges with each assay is recommended for monitoring the performance of the procedure. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits. Recommended controls: Diagnosticum DunaCont N (Cat. No.: Dcon-N) and DunaCont P (Cat. No.: Dcon-P)

PERFORMANCE DATA

The following data were obtained using the Olympus 600 analyzer (37°C). Conversion factor: [µmol/l]=17,1×[mg/dl]

Linearity

The total test is linear between 3,5 - 340 µmol/l (0,2 - 20,0 mg/dl). The direct test is linear between 1 - 100 µmol/l (0,06 - 5,88 mg/dl)

Limit of detection Direct: 0,07 µmol/l (0,004 mg/dl). Total: 0,31 mmol/l (0,018 mg/dl)

Sensitivity

It is recommended that each laboratory establishes its own range of sensitivity as this is limited by the sensitivity of the spectrophotometer used. Under manual conditions however, a change of 0.001 Abs is equivalent to 0.575 µmol/l (0,034 mg/dl) direct Bilirubin and 1.42 µmol/l (0,08 mg/dl) total Bilirubin concentration at 540 nm.

Direct bilirubin

Precision	Reproducibility			
	n=20	Average concentration (µmol/l)	SD	CV%
sample I		13.8	0.282	2.04
sample II		37.8	1.053	2.79

Correlation

Comparative studies were done to compare our reagent with another commercial direct Bilirubin assay.

The results from these studies are detailed below.

Correlation coefficient: r=0.9957 Linear regression: y (µmol/l)= 1.05x-0.52 (x= other commercial reagent, y= own reagent).

Total bilirubin

Precision	Reproducibility			
	n=20	Average concentration (µmol/l)	SD	CV%
sample I		18.9	0.756	4.00
sample II		82.3	2.902	3.53

Correlation

Comparative studies were done to compare our reagent with another commercial total Bilirubin assay.

The results from these studies are detailed below.

Correlation coefficient: r=0.9998 Linear regression: y (µmol/l)= 0.988x-0.978 (x= other commercial reagent, y= own reagent).

Specificity










Lipid 400 mg/dl, glucose 55.5 mmol/l (1000mg/dl) and ascorbic acid 2.84 mmol/l (50 mg/dl) don't interfere with the assay at the given levels.

Note

Do not use reagents after the expiry date stated on each reagent container label. Do not use products, test solutions and reagents described above for any purpose other than described herein.

For in vitro diagnostic use only!

The following symbols can be used on the labels

	In vitro diagnostic device		Batch code
	Manufacturer		Catalogue number
	CE-marking		This way up
	Temperature limitations		Biological risk
	Use by (year/month)		

Bibliography

Hijmans Van den Bergh A. A., Muller P.: *Biochem*, 77; 90, (1916).
Walters M. L., Gerarde R. W.: *Microchem.*, 15; 231 (1970)
Szabó A.: *Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek (2010) (ISBN 978-963-9879-75-1)*

Version: 27-DL-2017-12

Date of revision: 2017-01