

A szérum totál bilirubin koncentrációjának meghatározására szolgáló reagenskészlet.  
**Diazo-szulfanilsavas módszer.**

### A meghatározás elve

A szulfanilsav nátrium-nitrattal diazotált szulfanilsavat képez. Dimetil-szulfoxid 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

Felnőtt	3-17,0 µmol/l (0,17-1,0 mg/dl)
Újszülött, 24 óra	<150 µmol/l (<8,8 mg/dl)
2. nap	22-193 µmol/l (1,3-11,3 mg/dl)
3. nap	12-217 µmol/l (0,7-12,7 mg/dl)
4-6. nap	1,7-216 µmol/l (0,1-12,6 mg/dl)
Gyerekek, >1 hónap	3,4-17 µmol/l (0,2-1,0 mg/dl)

Minden laboratóriumnak ajánlott a saját normál tartományát meghatározni.

### Reagens

1. Reagens (RT1)	
szulfanilsav	3,2 mmol/l
sósav	165 mmol/l
dimetil-szulfoxid	7,0 mol/l
2. Reagens (R2)	
nátrium-nitrit	8,6 mmol/l

### Minta

Hemolizismentes szérum.

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! Stabilitás: 7 nap 2-8°C-on.

A reagens újszülött bilirubin koncentrációjának meghatározására nem alkalmas.

### Reagens stabilitása

Fénytől védve és 2-8 °C-on tárolva

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

A stabilitások kizárólag új rendszerflakon használata esetén érvényesek!

### A VIZSGÁLAT KIVITELEZÉSE

A reagens felhasználásra készek.

### A munkareagens elkészítése

Az RT1 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

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

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

### Az eredmény kiszámítása

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

A = abszorbancia  
 C = koncentráció

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

S1: Desztillált víz  
 S2: Diagnosticum DunaCal katalógusszám: Dcal vagy  
 Randox Calibration Serum Level I  
 Randox Calibration Serum Level II  
 Roche C.F.A.S. (Calibrator for automated system)

Ajánlott új kalibrációt végezni:

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

### Belső minőségellenőrzés

A minőségellenőrzés ajánlott minden laboratóriumnak. Két különböző szintű (egy normál és egy emelkedett) kontrollt javasunk. 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 TELJESÍTMÉNYJELLEMZŐI

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

### Linearitás

A módszer 3,5 - 340 µmol/l (0,2 - 20 mg/dl) lineáris.

**Kimutatási határ** 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) bilirubin koncentrációval.

### Precizitás

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

n=20	Ismételhetőség		
	Átlag konc. (µmol/l)	SD	CV %
1 minta	14,02	0,14	0,99
2 minta	91,9	0,80	0,88

### Korreláció

Reagensünket összehasonlítottuk más gyártó totál bilirubin reagensével.

A korrelációs regresszió adatai a következők:

korrelációs koefficiens:  $r = 0,9998$ ,

lineáris regresszió:  $y (\mu\text{mol/l}) = 0,988x - 0,97858$

(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

Ne használja a reagenst a csomagolása címkéjén feltüntetett lejárati dátum eltelte 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: 37-DL-2016-12

Felülvizsgálat dátuma: 2016-12

**Reagent kit for the quantitative determination of total 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. The absorbance measured at 555nm is proportional to the bilirubin concentration.

**Reference value**

Adult	3-17,0 µmol/l (0,17-1,0 mg/dl)
Neonates, 24h	<150 µmol/l (<8,8 mg/dl)
2 <sup>nd</sup> day	22-193 µmol/l (1,3-11,3 mg/dl)
3 <sup>rd</sup> day	12-217 µmol/l (0,7-12,7 mg/dl)
4-6 <sup>th</sup> day	1,7-216 µmol/l (0,1-12,6 mg/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

**Sample**

Serum free of haemolysis.  
 Bilirubin in serum is light sensitive and it is recommended that serum be stored in the dark. The bilirubin decomposes fast in the serum and controls. Stability: 7 days at 2-8°C.  
 The reagent is not suitable for bilirubin determination of infants.

**Stability**

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

Stability data are valid only when using new system bottle!

**PROCEDURE**

All reagents are ready for use. **Avoid direct exposure to light!**

**Preparation of working reagent**

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

**Reagents can only be applied with previous mixing!**

**Stability of working reagent**

If 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
Measure:	end point.

**Pipette into cuvette**

	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: Dist. water  
 S2: Diagnosticum DunaCal Cat. No.: Dcal or Randox Calibration Serum Level I or II or Roche C.F.A.S. (Calibrator for automated system)

**Calibration frequency**

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)

**PERFORMANCES DATA**

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

**Linearity**

The test is linear between 3,5 - 340 µmol/l (0,2 - 20,0 mg/dl).

**Limit of detection** 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 1.42 µmol/l (0,08 mg/dl) Bilirubin concentration at 540 nm.

**Precision**

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

n=20	Repeatability		
	Average concentration (µmol/l)	SD	CV%
sample I	14.02	0.14	0.99
sample II	91.9	0.80	0.88

**Correlation**

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

The results from these studies are detailed below.

Correlation coefficient: r=0.9998

Linear regression: y (µmol/l)= 0.988x-0.979

(x= other commercial reagent, y= own reagent).

**Specificity**










Lipid 400 mg/dl, glucose 55.5 mmol/l (1000 mg/dl) and ascorbic acid 2.84 mmol/l (50 mg/dl) don't interfere with the assay up to 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. I., Gerarde R. W.: *Microchem.*, 15; 231 (1970).  
 Szabó A.: *Klinikai laboratóriumi vizsgálatok és paraméterek (2010) (ISBN 978-963-9879-75-1)*

Version: 37-DL-2016-12

Date of revision: 2016-12