

BILIRUBIN DIRECT

Cat. No.	Pack Name	Packaging (Content)
BLT00009	BIL D 200	R1: 4 x 50 ml, R2: 1 x 6 ml



INTENDED USE

Diagnostic reagent for quantitative *in vitro* determination of Bilirubin Direct in human serum and plasma.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Bilirubin is a breakdown product of haemoglobin. Bilirubin formed in the reticulo endothelial system is transported bound by albumin to the liver. This bilirubin is water insoluble and is known as indirect or unconjugated bilirubin. In the liver, bilirubin is conjugated to glucuronic acid to form direct bilirubin. Conjugated bilirubin is excreted via the biliary system into the intestine. Here it is metabolised by bacteria to urobilinogen and stercobilinogen.

TOTAL BILIRUBIN = INDIRECT BILIRUBIN + DIRECT BILIRUBIN

Total Bilirubin is elevated in obstructive conditions of the bile duct, hepatitis, cirrhosis, in haemolytic disorders and several inherited enzyme deficiencies.

Indirect Bilirubin is elevated by pre-hepatic causes such as haemolytic disorders or liver diseases resulting in impaired entry transport or conjugation within the liver. Monitoring of indirect bilirubin in neonates is of special importance as it is the indirect (or free) bilirubin bound to albumin that is able to cross the blood brain barrier more easily increasing the danger of cerebral damage.

PRINCIPLE

Modified method of Pearlman & Lee in which a surfactant is used as a solubilizer. Bilirubin glucuronate reacts directly with sulphodiazonium salt and forms coloured derivative azobilirubin. The colour intensity of formed azobilirubin measured at 540 - 550 nm is proportional to direct bilirubin concentration in the sample.

REAGENT COMPOSITION

R1	
Sulphanilic Acid	14.61 mmol/l
HCl	117.6 mmol/l
R2	
Sodium Nitrite	145 mmol/l

REAGENT PREPARATION

Reagents are liquid, ready to use.

Test	Volume of working Reagent	Add	
		Reagent 1	Reagent 2
Bilirubin Direct	10 ml	10 ml	0.1 ml
	25 ml	25 ml	0.25 ml
	50 ml	50 ml	0.5 ml
	100 ml	100 ml	1.0 ml

WORKING REAGENT STABILITY

The working reagent is stable for 7 days at 2–8°C, when protected from contamination and light. It is recommended to prepare fresh working solution before assay is performed.

STABILITY AND STORAGE

The unopened reagents are stable till the expiry date stated on the bottle and kit label when stored at 2–8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Use unheamolytic serum or plasma (heparin, EDTA).

It is recommended to follow NCCLS procedures (or similar standardized conditions).

Stability:
 2 days at 15–25°C
 7 days at 2–8°C
 3 months at -20°C
 In case of immediate freezing.

Freeze only once!

Discard contaminated specimens.

CALIBRATION

Calibration with the factor (see ASSAY PARAMETERS table) or with calibrator XL MULTICAL, Cat. No. XSYS0034 is recommended.

QUALITY CONTROL

For quality control ERBA NORM, Cat. No. BLT00080 and ERBA PATH, Cat. No. BLT00081 are recommended.

UNIT CONVERSION

mg/dl x 16.95 = µmol/l

EXPECTED VALUES³

Adults and infants: 0 – 0.2 mg/dl

It is recommended that each laboratory verify this range or derives reference interval for the population it serves.

PERFORMANCE DATA

Data contained within this section is representative of performance on ERBA XL systems. Data obtained in your laboratory may differ from these values.

Limit of quantification: 0.18 mg/dl

Linearity: 23 mg/dl

Measuring range: 0.18 – 23 mg/dl

Intra-assay precision Within run (n=20)	Mean (mg/dl)	SD (mg/dl)	CV (%)
Sample 1	9.18	0.23	2.45
Sample 2	15.12	0.32	2.10

Inter-assay precision Run to run (n=20)	Mean (mg/dl)	SD (mg/dl)	CV (%)
Sample 1	2.54	0.10	3.78
Sample 2	0.78	0.03	3.37

COMPARISON

A comparison between XL-Systems Bilirubin Direct (y) and a commercially available test (x) using 40 samples gave following results:

y = 1.029 x + 0.037 mg/dl

r = 1.000

INTERFERENCES

Following substances do not interfere:
 haemoglobin up to 10 g/l, triglycerides up to 1000 mg/dl.

WARNING AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use. To be handled by entitled and professionally educated person. Reagents are not classified as dangerous.

Reagent 1 contains a small amount of sulphanilic acid and may cause an allergic skin reaction.

Reagent 2 contains <0.1% sodium azide which is toxic and dangerous to the environment.

WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

ASSAY PROCEDURE

Wavelength: 546/630 (670) nm

Cuvette: 1 cm

	Reagent blank	Standard (Cal.)	Sample
Working reagent	0.500 ml	0.500 ml	0.500 ml
Sample	-	-	0.025 ml
Standard (Cal.)	-	0.025 ml	-
Distilled water	0.025 ml	-	-

Mix and incubate 5 min. at 37 °C. Measure absorbance of the sample A_{sam} and standard A_{st} against reagent blank.

CALCULATION

$$1. \text{ Direct Bilirubin (mg/dl)} = \frac{\Delta A_{\text{sam}}}{\Delta A_{\text{st}}} \times C_{\text{cal}} \quad C_{\text{cal}} = \text{calibrator concentration}$$

2. Using factor:

Direct Bilirubin (mg/dl) = f x ΔA

f = factor (see ASSAY PARAMETERS table)

Applications for automatic analysers are available on request.

ASSAY PARAMETERS FOR PHOTOMETERS

Mode	End Point
Wavelength 1 (nm)	546
Wavelength 2 (nm)	630 (670)
Sample Volume (µl)	25/50
Working Reagent Volume (µl)	500/1000
Incubation time (min.)	5
Incubation temp. (°C)	37
Normal Low	0
Normal High	0.2
Linearity Low	0
Linearity High	20
Factor	17 (14)*
Blank with	Reagent
Absorbance limit (max.)	0.2
Units	mg/dl

* 17 at 546 / 630, 14 at 546 / 670

БИЛИРУБИН прямой

Кат. №	Название на упаковке	Фасовка
BLT00009	БИЛ ПР 200	R1: 4 x 50 мл, R2: 1 x 6 мл



Применение

Набор реагентов предназначен только для *in vitro* диагностики прямого билирубина в сыворотке и плазме человека.

Клиническое значение

Билирубин – продукт распада гемоглобина. Билирубин плохо растворим в воде, поэтому в свободном виде не присутствует в плазме крови. Для транспортирования в крови от селезенки к печени он образует комплекс с альбумином и называется конъюгированный (непрямой) билирубин. В печени происходит конъюгация билирубина с глюкуроновой кислотой, образуется прямой (конъюгированный) билирубин, который дальше экскретируется в желчные протоки.

Прямой билирубин повышается при закупорке внутри и внепеченочных желчных протоков, повреждениях печеночных клеток (особенно на поздних стадиях заболевания), холестазах.

Мониторинг непрямого билирубина очень важен в неонатологии, т.к. это может приводить к повреждениям мозга. Неконъюгированный билирубин можно рассчитать, как разницу между общим и прямым билирубином.

Общий билирубин = Непрямой билирубин + Прямой билирубин

Принцип реакции

Модифицированный диазометод Pearلمان & Lee, в котором поверхностно-активное вещество используется в качестве солюбилизатора.

Билирубина глюкуронат реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой в кислой среде. В результате реакции образуется продукт красного цвета, с максимумом поглощения при 540 - 550 нм. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации прямого билирубина.

Состав реагентов

R 1

Сульфаниловая кислота 14,61 ммоль/л
HCl 117,6 ммоль/л

R 2

Нитрит натрия 145 ммоль/л

Приготовление рабочих реагентов

Реагенты жидкие, готовые к использованию. Хранить в защищенном от света месте.

Проведение анализа

Тест	Объем рабочего реагента	Добавить	
		Реагент 1	Реагент 2
Билирубин прямой	10 мл	10 мл	0,1 мл
	25 мл	25 мл	0,25 мл
	50 мл	50 мл	0,5 мл
	100 мл	100 мл	1,0 мл

Хранение и стабильность рабочих реагентов

Не вскрытые Реагенты 1, 2 стабильны до достижения указанного срока годности, если хранятся при 2–8°C, в защищенном от света месте.

Рабочий Реагент Билирубин Прямой стабилен 7 дней, если хранятся при 2–8°C, в защищенном от света месте.

Образцы

Негемолизированная сыворотка, гепаринизированная или ЭДТА плазма. Исследование проводить в соответствии с протоколом NCCLS (или аналогов).

Стабильность:

2 дня при 15–25 °C
7 дней при 2–8 °C
3 месяца при -20 °C

Замораживать только один раз!

Не использовать загрязненные образцы.

Калибровка

Мы рекомендуем для калибровки использовать фактор или XL МУЛЬТИКАЛ, Кат. № XSYS0034.

Контроль качества

Для проведения контроля качества рекомендуются контрольные сыворотки: ЭРБА НОРМА, Кат. No. BLT00080, ЭРБА ПАТОЛОГИЯ, Кат. No. BLT00081.

Коэффициент пересчета

(мг/дл) x 16,95 = мкмоль/л

Нормальные величины ³

Билирубин прямой
Дети и Взрослые: 0 – 0,2 мг/дл (0 – 3,39 мкмоль/л)

Приведенные диапазоны величин следует рассматривать как ориентировочные. Каждой лаборатории необходимо определять свои диапазоны.

Значения величин

Значения нормальных величин были получены на автоматических анализаторах серии ERBA XL. Результаты могут отличаться, если определение проводили на другом типе анализатора.

Рабочие характеристики

Чувствительность: 0,18 мг/дл (3,05 мкмоль/л)

Линейность: до 23 мг/дл (390 мкмоль/л)

Диапазон измерений: 0,18 - 23 мг/дл (3,05 - 390 мкмоль/л)

Воспроизводимость

Внутрисерийная	N	Среднеарифметическое значение (мг/дл)	SD (мг/дл)	CV (%)
Образец 1	20	9,18	0,23	2,45
Образец 2	20	15,12	0,32	2,10

Межсерийная	N	Среднеарифметическое значение (мг/дл)	SD (мг/дл)	CV (%)
Образец 1	20	2,54	0,10	3,78
Образец 2	20	0,78	0,03	3,37

Сравнение методов

Сравнение было проведено на 40 образцах с использованием реагентов серии БЛТ: Билирубин прямой(у) и имеющихся в продаже реагентов с коммерчески доступной методикой (х).

Результаты: $y = 1,029x + 0,037$ (мг/дл) $r = 1,000$

Специфичность/Влияющие вещества

Гемоглобин до 10 г/л, Триглицериды до 1000 мг/дл не влияют на результаты исследования.

Меры предосторожности

Только для *in vitro* диагностики специально обученным персоналом. Реагенты набора не классифицируются как опасные.

Реагент 1 содержит небольшое количество сульфаниловой кислоты и может вызвать аллергическую реакцию на коже.

Реагент 2 содержит <0,1% азида натрия, который является токсичным и опасным для окружающей среды.

Утилизация использованных материалов

В соответствии с существующими в каждой стране правилами для данного вида материала.

Проведение анализа

Длина волны: 546/630 (670) нм

Оптический путь: 1 см

Температура: 37 °C

Измерение: против реагента сравнения (бланк)

Пипетирование	Бланк	Стандарт/Калибратор	Образец
Реагент	500 мкл	500 мкл	500 мкл
Дистил. вода	25 мкл	--	--
Стандарт/Калибратор	--	25 мкл	--
Образец	--	--	25 мкл

Инкубировать 5 мин при 37°C. Измерить поглощение калибратора и образца при 546 /630 нм против бланка по реагенту.

Стандарт/Калибратор - не входит в состав набора

Расчет по калибратору

$$\text{Билирубин прямой (мг/дл)} = \frac{\Delta A_{\text{обр.}}}{\Delta A_{\text{кал.}}} \times \text{конц. Кал. (мг/дл)}$$

Расчет по фактору:

Билирубин прямой (мг/дл) = $\Delta A \times 17(14)$ (Фактор)*

Протоколы для использования на автоматических анализаторах могут быть получены по запросу.

Параметры для работы на анализаторе

Метод	Конечная точка
Длина волны 1 (нм)	546
Длина волны 2 (нм)	630(670)
Объем образца (мкл)	25/50
Объем реагент (мкл)	500/1000
Время инкубации (мин)	5
Температура инкубации (°C)	37
Нижний предел нормы (мг/дл)	0
Верхний предел нормы (мг/дл)	0,2
Нижний предел линейности (мг/дл)	0
Верхний предел линейности (мг/дл)	20
Концентрация стандарта (мг/дл)	17(14)*
Бланк по	Реагенту
Начальное поглощение реагента (Макс.)	0,2
Единицы	мг/дл


*17 при 546/630


*14 при 546/670


REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

1. Pearlman, P.C. & Lee, R.T. Clin. Chem. (1974), 20: 447.
2. Henry, R. J. (Ed), Clinical Chemistry: Principles and Techniques (2nd Ed.) Harper and Row (1974). P. 1042.
3. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E.; 5th edition, WB Saunders Comp., 2012.


SYMBOLS USED ON LABELS / СИМВОЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ НА ЭТИКЕТКАХ


 REF Catalogue Number
Каталожный №


 Manufacturer
Производитель


 See Instruction for Use
Смотреть инструкцию
при использовании


 LOT Lot Number
Серия


 CE CE Mark - Device comply with
the Directive 98/79/EC
Знак CE - соответствие
Директиве 98/79/EC

 Storage Temperature
Соблюдать температуру хранения


 Expiry Date
Срок годности

 IVD In Vitro Diagnostics
Для in vitro диагностики

 CONT Content / Содержание

 Национальный знак
соответствия для Украины
Ukrainian quality mark

QUALITY SYSTEM CERTIFIED
ISO 9001 ISO 13485

 Erba Lachema s.r.o., Karásek 1d, 621 00 Brno, CZ
e-mail: diagnostics@erbalachema.com, www.erbamannheim.com