



DAC-SpectroMed s.r.l.

MD-2012, Moldova, г. Кишинев, ул. Армянская, 47, кв. 64
Тел.: +37322/574900, 574922/23; факс: +37322/574920

Email: office@dacspectromed.com
www.dacspectromed.com

PT MD 11-15796482-001:2003

Bili - DAC - CF

ПРЯМОЙ И ОБЩИЙ БИЛИРУБИН

МЕТОД ЙНДРАШКА И ГРОФА КОФЕИНОВОЙ РЕАГЕНТ

Только для диагностики «in vitro»

Хранить при 2-8°C

Код 3008B500 500 ml

ПРИНЦИП МЕТОДА

Билирубин в образце реагирует с диазотированной сульфаниловой кислотой с образованием диазобилирубина, формируя окрашенный комплекс. Интенсивность окраски, измеренной при длине волны 500-560 или 595 (±10) nm, пропорциональна концентрации билирубина. Содержащийся в сыворотке (плазме) крови билирубин принято условно разделять на две фракции: прямой (связанный, водорастворимый) и непрямой (свободный, водонерастворимый). Определение прямого билирубина проводится в водной среде, а для определения общего (прямой + непрямой) билирубина в качестве растворителей используется кофеиновый реактив.

СОСТАВ НАБОРА

Reagent 1	2x5,0 g (2x200 ml)	
Кофеин		25,75 mmol/l
Натрия бензоат		52 mmol/l
Натрия ацетат		92 mmol/l
Reagent 2	0,4 g	
Кислота сульфаниловая		
Reagent 3	6 ml	
Кислота соляная		2,45 mol/l
Reagent 4	12,5 mg	
Натрия нитрит		
Reagent 5	9,0 g	
Натрия гидроксид		

ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ

Реагенты при 2-8°C стабильны до срока, указанного на этикетке. Кофеиновый реактив, Диазореактив I и Диазореактив II при 2-8°C стабильны 3 месяца. Рабочий Reagent 5 стабилен 3 месяца при 15-30°C в полиэтиленовом сосуде.

ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сыворотка (плазма). Билирубин в сыворотке (плазме) стабилен 3 часа при 15-30°C, 1 сутки при 2-8°C в темноте.

ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Анализатор, спектрофотометр или фотометр с фильтром 520-560 nm или 595 (±10) nm. Термостат 60°C. Дозаторы на 100 µl, 250 µl, 500 µl и 1,75 ml. Таймер. Набор стандартов билирубина.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖИВАНИЯ

Набор предназначен только для диагностики in vitro. Образцы должны рассматриваться как потенциально опасные и обрабатываться как инфекционные.

При использовании набора следует соблюдать правила безопасности при работе с едкими и ядовитыми веществами.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РЕАГЕНТОВ

Кофеиновый реактив: содержимое 1 флакона с Reagent 1 количественно перенести в колбу с 150 ml дистиллированной воды, растворить при нагревании до 50-60°C и тщательно перемешать. После охлаждения довести объем дистиллированной водой до 200 ml.

Диазореактив I: содержимое флакона с Reagent 2 количественно перенести в колбу с 60 ml дистиллированной воды и растворить при нагревании. Добавить содержимое флакона с Reagent 3, тщательно перемешать. После полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения раствора объем довести дистиллированной водой до 80 ml, тщательно перемешать.

Диазореактив II: содержимое флакона с Reagent 4 растворить в 2,5 ml дистиллированной воды.

Диазосмесь: готовить непосредственно перед работой, смешав 10 ml Диазореактива I и 0,3 ml Диазореактива II, либо любые другие объемы исходя из соотношения 100:3 v/v.

Рабочий Reagent 5: содержимое флакона с Reagent 5 растворить в 30 ml дистиллированной воды.

ХОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

1. Поместите в маркированные пробирки:

Образец	Прямой билирубин		Общий билирубин	
	Контроль	Образец	Контроль	Образец
	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Кофеиновый реактив	-	-	1,75 ml	1,75 ml
Физраствор	2,0 ml	1,75 ml	0,25 ml	-
Диазосмесь	-	0,25 ml	-	0,25 ml
Инкубируйте при 16-25°C	5-10 мин	5-10 мин	20 мин	20 мин
Рабочий Reagent 5	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

2. Учтите Абсорбцию Образца (Ao) и Контроля (Ак) при длине волны 595(±10) nm против дистиллированной воды. Окраска стабильна не менее 1 часа.

ВЫЧИСЛЕНИЯ

Для расчета концентраций прямого и общего билирубина в образце вычислите разницу между абсорбциями Образца (Ao) и Контроля (Ак) для прямого (ПБ) и общего (ОБ) билирубина. Используя эти значения, по калибровочному графику, построенному по стандартам общего билирубина, определите значения концентраций общего и прямого билирубина.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ВЕЛИЧИНЫ

Взрослые³:

Общий: До 1,1 mg/dl = до 18,8 µmol/l
Прямой: До 0,25 mg/dl = до 4,3 µmol/l

Новорожденные³:

Возраст	Недоношенные	Доношенные
До 24 ч	1,0-8,0 mg/dl = 17-137 µmol/l	2,0-6,0 mg/dl = 34-103 µmol/l
До 48 ч	6,0-12,0 mg/dl = 103-205 µmol/l	6,0-10 mg/dl = 103-171 µmol/l
3-5 дней	10-14 mg/dl = 171-239 µmol/l	4,0-8,0 mg/dl = 68-137 µmol/l

Приведенные референтные величины ориентировочны.

Рекомендуется в каждой лаборатории установить собственные референтные величины.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для контроля хода реакции и процедуры измерения рекомендуется использовать нормальные и патологические контрольные сыворотки (Sera N-DAC Код 2055S5 и Sera P-DAC Код 2057S5).

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Предел чувствительности: 0,03 mg/dl = 0,51 µmol/l.

Предел линейности: 9,92 mg/dl = 170 µmol/l. При более высокой концентрации разведите образец дистиллированной водой в соотношении 1/2 и повторите измерение.

Коэффициент вариации – не более 7 %.

Влияние: гемоглобин (10 g/l) не влияет на результат, липемия (триглицериды > 5 mg/dl) влияют на результат. Другие лекарственные препараты и субстанции могут влиять на результат⁴.

Данные метрологические характеристики были получены на анализаторе. Результаты могут варьировать в зависимости от используемого оборудования или процедуры определения.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Билирубин является продуктом распада темной части гема, высвобождающегося из стареющих или поврежденных эритроцитов, которые разрушаются в ретикулоэндотелиальной системе. Затем билирубин транспортируется в печень с альбумином. Внутри гепатоцитов билирубин связывается с глюкуроновой кислотой и экскретируется в желчь. Существуют наследственные и приобретенные заболевания, при которых нарушается синтез, связывание, метаболизм и экскреция билирубина приводя к гипербилирубинемии^{3,5}. Гипербилирубинемия несвязанного билирубина наблюдается у новорожденных при повышенном разрушении эритроцитов (гемолитическая анемия, обширные гематомы), при неффективном эритропоэзе и при некоторых редких генетических заболеваниях. Гипербилирубинемия связанного билирубина вызвана пониженной экскрецией желчи при поражении печени или внутрпеченочного или внепеченочного холестаза.

ПРИМЕЧАНИЕ

Калибровка водным стандартом может вызвать отклонение, в таких случаях рекомендуется проводить калибровку с использованием стандарта на основе сыворотки (Multi St-DAC Код 2051M5).



DAC-SpectroMed s.r.l.

MD-2012, Moldova, or. Chişinău, str. Armenească 47, ap. 64
Tel.: +37322/574900, 574922/23; fax: +37322/574920

Email: office@dacspectromed.com
www.dacspectromed.com

PT MD 11-15796482-001:2003

Bili - DAC - CF

БИЛИРУБИНА ТОТАЛА ŞI ДИРЕКТĂ
JENDRASSKI ŞI GROF REAGENT CU COFEINĂ.

Numai pentru diagnosticare «in vitro»

A se păstra la 2-8°C

Cod 3008B500 500 ml

ПРИНЦИП УЛ МЕТОДЕИ

Bilirubina din probă reacţionează cu acidul sulfanilic diazotat formind un compo colorat-diazobilirubină. Intensitatea culorii, măsurată la 500-560 sau 595(±10) nm, este proporţională concentraţiei de bilirubină. Bilirubina din ser (plasmă) este devizată convenţional în două fracţi: directă (conjugată, solubilă în apă) şi indirectă (neconjugată, insolubilă în apă). Bilirubina directă se determină în mediu apos, iar pentru bilirubina totală (directă + indirectă) în calitate de dizolvant se va utiliza reagentul cu cofeină.

COMPONENŢA SETULUI

Reagent 1	2x5,0 g (2x200 ml)	
Кофеинă		25,75 mmol/l
Benzoat de sodiu		52 mmol/l
Acetat de sodiu		92 mmol/l
Reagent 2	0,4 g	
Acid sulfonilic		
Reagent 3	6 ml	
Acid clorhidric		2,45 mol/l
Reagent 4	12,5 mg	
Nitrit de sodiu		
Reagent 5	9,0 g	
Dihidroxid de sodiu		

ПĂСТРАREA ŞI STABILITATEA REAGENŢILOR

Reagenţii sînt stabili la 2-8°C pînă la data indicată pe etichetă Reagentul cu cofeină, Diazoreactivul I şi Diazoreactivul II sînt stabili la 2-8°C 3 luni. Reagentul de lucru 5 se va păstra într-un vas de polietilenă, este stabil la 15-30°C 3 luni.

PROBE

Ser (plasmă). Bilirubina în ser (plasmă) este stabilă la 15-30°C 3 ore, la 2-8°C 24 ore. Se va păstra la ituneric.

ECHIPLAMENT ADIŢIONAL

Analizor, spectrofotometru sau fotometru cu filtrul 500-560 nm sau 595(±10) nm. Termostat 60°C. Dozatoare 100 µl, 250 µl, 500 µl şi 1,75 ml. Taimer. Standard de bilirubină.

PRECAUŢII

Setul este destinat numai pentru diagnosticare in vitro. Probele pacienţilor vor fi considerate ca material potenţial contagios şi se vor prelucra analog celor contagioase.

La utilizarea setului se vor respecta regulile de securitate prevăzute pentru lucrul cu substanţe toxice.

PREPARAREA REAGENŢILOR DE LUCRU

Reagentul cu cofeină: conţinutul flaconului cu Reagent 1 se va trece cantitativ într-o retortă cotată care conţine 150 ml apă distilată, se va dizolva la încălzire 50-60°C şi se va amesteca bine. După răcire se va adăuga apă distilată pînă la volumul 200 ml.
Diazoreactiv I: conţinutul flaconului cu Reagent 2 se va trece cantitativ într-o retortă care conţine 60 ml apă distilată, se va dizolva la încălzire. În retortă se va adăuga conţinutul flaconului cu Reagent 3, se va amesteca bine. După dizolvarea completă a acidului sulfanilic şi răcirii soluţiei se va adăuga apă distilată pînă la 80 ml, se va amesteca bine.

Diazoreactiv II: conţinutul flaconului cu Reagent 4 se va dizolva în 2,5 ml apă distilată.

Diazoamestec: se va prepara strict înainte de utilizare, amestecînd 10 ml Diazoreactiv I şi 0,3 ml Diazoreactiv II, sau orice alt volum respectînd raportul 100:3 v/v.

Reagentul de lucru 5: conţinutul flaconului cu Reagent 5 se va dizolva în 30 ml apă distilată.

METODA DE LUCRU

1. Se va pipeta în eprubetele marcate:

Proba	Directă bilirubin		Totală bilirubin	
	Control	Probă	Control	Probă
	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Reagent cu cofeină	-	-	1,75 ml	1,75 ml
Soluţie fiziologică	2,0 ml	1,75 ml	0,25 ml	-
Diazoamestec	-	0,25 ml	-	0,25 ml
Incubare la 16-25°C	5-10 min	5-10 min	20 min	20 min
Reagent de lucru 5	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

2. Se va nota absorbţia Probei (Ap) şi Controlului (Ac) la 595(±10) nm contra apei distilate. Culoarea este stabilă 1 oră.

CALCULE

Pentru determinarea concentraţiei bilirubinei directe şi totale în probă se va calcula diferenţa dintre absorbţiile Probei (Ap) şi Controlului (Ac) pentru bilirubina directă (BD) şi totală (BT).

Utilizînd aceste valori şi curba de calibrare, trasată după standarde de bilirubină totală, se va determina concentraţia bilirubinei totale şi directe.

VALORI DE REFERINŢĂ

Maturi³:

Totală: pînă la 1,1 mg/dl = pînă la 18,8 µmol/l
Directă: pînă la 0,25 mg/dl = pînă la 4,3 µmol/l

Nou-născuţi³:

Vîrstă	Născuţi prematur	Născuţi la termen
Pîna la 24 ore	1,0-8,0 mg/dl = 17-137 µmol/l	2,0-6,0 mg/dl = 34-103 µmol/l
Pînă la 48 ore	6,0-12,0 mg/dl = 103-205 µmol/l	6,0-10 mg/dl = 103-171 µmol/l
3-5 zile	10-14 mg/dl = 171-239 µmol/l	4,0-8,0 mg/dl = 68-137 µmol/l

Aceste valori sînt orientative. Se recomandă stabilirea diapazonului de referinţă în laboratorul dat.

CONTROLUL CALITĂŢII

Pentru controlul mersului reacţiei şi a procedurii de măsurare se recomandă de folosit seruri pentru control nivelul I şi nivelul II (Sera N-DAC cod 2055S5 şi Sera P-DAC cod 2057S5).

CARACTERISTICI METROLOGICE

Limita sensibilităţii: 0,03 mg/dl = 0,51 µmol/l.

Limita linearităţii: 9,92 mg/dl = 170 µmol/l. Pentru valori mai ridicate proba se va dilua cu soluţie fiziologică în raportul 1:2 şi se va repeta măsurarea.

Coeficientul de variaţie: cel mult 7 %.

Interferenţe: hemoglobina (10 g/l) nu influenţează rezultatul, lipemia (trigliceride > 5 mg/dl) influenţează rezultatul.

Se va ţine cont de posibila interferenţă medicamentoasă, cit şi de interferenţa altor substanţe⁴.

Aceste caracteristici metrologice au fost obţinute la utilizarea analizorului (Nota). Rezultatele pot varia în dependenţă de echipamentul utilizat sau procedura de determinare.

CARACTERISTICI DIAGNOSTICE

Bilirubina este produsul scindării porţiunii întindecate a hemului, provine din degradarea eritrocitelor îmbătrinite sau lezate, care se distrug în sistemul reticuloendotelial. Bilirubina este transportată în ficat cu albumina, reacţionează cu acidul glucuronic din interiorul hepatocitelor, şi se excretează în bilă.

Bolile însoţite de dereglarea sintezei, conjugare, metabolism şi excreţia bilirubinei care în fine duc la hiperbilirubinemia^{3,5} pot fi eriditate cit şi dobîndite. Hiperbilirubinemia neconjugată se atestă la nou-născuţi (icter fiziologic), în cazul degradării sporite a eritrocitelor (anemie hemolitică, gematome extinse), eritropoeză cit şi în cazul unor boli genetice (sindrom Gilbert, sintrom Crigler-Najjar). Hiperbilirubinemia conjugată este provocată de excreţia redusă a bilei în caz de afecţiuni ale ficatului (hepatită, ciroză), colestază intra sau extrahepatică.

NOTA

Utilizarea standardului pe bază de apă pentru calibrare poate provoca devieri, în acest caz pentru calibrare se recomandă de utilizat standard pe bază de ser (Multi St-DAC Cod 2051M5).



DAC-SPECTROMED SRL

47, Armeneasca, str., apt. 64, Chisinau MD-2012 Moldova
Tel.: /+37322/ 574900,574922/23; fax: /+37322/ 574920

Email: office@dacspectromed.com www.dacspectromed.com

PT MD 11-15796482-001:2003

Bili - DAC - CF

BILIRUBIN TOTAL AND DIRECT
JENDRASSIK & GROF METHOD Caffeine reagent

For « in vitro » use only

Store at 2-8°C

Cod 3008B500 500 ml

PRINCIPLE

The bilirubin in the sample reacts with diazotized sulfanilic acid with forming of diasobilirubin and colored complex. The intensity of coloration, measured at 500-560 nm or 595 (± 10) nm, is proportional to bilirubin concentration.

The bilirubin contained in serum (plasma) is conventionally divided in two fractions: "direct" (conjugated, water soluble) and "indirect" (uncombined, insoluble). Direct bilirubin determination uses water medium, and total (direct+indirect) uses caffeine reagent as diluent.

CONTENTS AND COMPOSITION

Reagent 1	2x5,0 g (2x200 ml)	
Caffeine		25.75 mmol/l
Sodium benzoate		52 mmol/l
Sodium acetate		92 mmol/l
Reagent 2	0.4 g	
Sulfanilic acid		
Reagent 3	6 ml	
Hydrochloric acid		2.45mol/l
Reagent 4	12.5 mg	
Sodium nitrite		
Reagent 5	9.0 g	
Sodium hydroxide		

STORAGE AND STABILITY OF REAGENTS

Reagents are stable at 2-8°C until the expiry date shown on the label. Caffeine Reagent, Diazoreagent I and Diazoreagent II are stable for 3 months at 2-8°C. Working Reagent 5 is stable for 3 months at 15-30°C in polyethylene bottle.

SAMPLES

Serum (plasma).

Bilirubin in serum (plasma) is stable within 3 hours at 15-30°C, 1 day at 2-8°C in dark place.

ADDITIONAL EQUIPMENT AND REAGENTS

Analyzer, spectrophotometer or photometer with filter 520-560 nm or 595 (± 10) nm. Thermostat 60°C. Timer. Bilirubin Standard. Droppers for 100 μ l, 250 μ l, 500 μ l and 1,75 ml

PRECAUTION

The kit is for in vitro use only.

All specimens must be considered potentially hazardous and handled as infectious. Precautions established for work with caustic and toxic substances should be observed while using the reagents.

REAGENT PREPARATION

Caffeine Reagent: dissolve contents of the bottle with Reagent 1 quantitatively with 150 ml of the distilled water in volumetric flask, dilute with the distilled water warming up to 50-60°C and mix thoroughly. After cooling, bring volume to 200 ml with the distilled water.

Diazoreagent I: dissolve, while heating, the contents of the bottle with Reagent 2 quantitatively with 60 ml of the distilled water in flask. Add the contents of the bottle with Reagent 3 and mix thoroughly. Only after complete dilution of sulphanyllic acid and cooling of the solution, bring the volume to 80 ml with distilled water and mix thoroughly.

Diazoreagent II: dilute contents of Reagent 4 in 2,5 ml of distilled water.

Diazomixture: must be prepared immediately before use. Mix 10 ml of Diazoreagent I with 0,3 ml of Diazoreagent II, or any other volumes based upon ratio 100:3 v/v.

Working Reagent 5: dilute contents of Reagent 5 bottle in 30 ml of distilled water.

PROCEDURE

1. Pipette into labeled test tubes:

Sample, ml	Direct bilirubin		Total bilirubin	
	Blank	Sample	Blank	Sample
0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
Caffeine Reagent, ml	-	-	1,75 ml	1,75 ml
Physiological solution	2,0 ml	1,75 ml	0,25 ml	-
Diazomixture, ml	-	0,25 ml	-	0,25 ml
Incubate at 16-25°C	5-10 min	5-10 min	20 min	20 min
Working Reagent 5	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml

2. Read the absorbance (A_S) of the Sample and Blank (A_B) at 595(± 10) nm against the distilled water.

Coloration is stable for at least 60 minutes.

CALCULATIONS

For the calculation of direct and total bilirubin concentrations in sample, calculate the difference between absorbencies of Sample (A_S) and Blank (A_B) for direct (DB) and total (TB) bilirubin.

Using these values, and calibration curve, plotted under total bilirubin standards, determine values of total and direct bilirubin.

REFERENCE VALUES

Adults²:

Total	Up to 1,1 mg/dl = 18,8 μ mol/l
Direct	Up to 0,25 mg/dl = 4,3 μ mol/l

Newborns³:

Age	Premature	Full-term
Up to 24 h	1,0-8,0 mg/dl = 17-137 μ mol/l	2,0-6,0 mg/dl=34-103 μ mol/l
Up to 48 h	6,0-12 mg/dl=103-205 μ mol/l	6,0-10 mg/dl=103-171 μ mol/l
3-5 days	10-14 mg/dl = 171-239 μ mol/l	4,0-8,0 mg/dl = 68-137 μ mol/l

These values are approximate, it is recommended that each laboratory should establish its own reference values.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use the Control Serum level I and II (Sera N-DAC Cod 2055S5 and Sera P-DAC Cod 2057S5) to verify the performance of the measurement procedure.

METROLOGICAL CHARACTERISTICS

Sensitivity limit:	0.03 mg/dl = 0.51 μ mol/l.
Linearity limit:	9.92 mg/dl = 170 μ mol/l.

For higher values dilute sample 1/2 with saline solution and repeat measurement.

Coefficient of variation not more than 7 %.

Interference:

Hemoglobin (10 g/l) does not interfere. Lipemia (triglycerides > 5 g/l) interferes. Other drugs and substances may interfere⁴.

These metrological characteristics were received using analyzer. Results may vary depending on equipment or procedure used.

DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS

Bilirubin is the product of disintegration of heme moiety of the hemoglobin released from aged or damaged erythrocytes, which are destroyed in the reticuloendothelial cells. Bilirubin then is transported to the liver in association with albumin. Inside the hepatocytes bilirubin is conjugated with glucuronic acid and is excreted into bile. A number of inherited and acquired diseases affect production, uptake, metabolism, and excretion of bilirubin, resulting in hyperbilirubinemia^{3,5}. Unconjugated hyperbilirubinemia is observed in newborns (physiological jaundice), in increased red cell destruction (hemolytic anemia, extensive hematoma), in ineffective erythropoiesis and in some rare genetic diseases. Conjugated hyperbilirubinemia is associated with decreased excretion of bile due to liver diseases or to intrahepatic or extrahepatic cholestasis.

NOTES

Calibration with the factor or with the aqueous standard may cause bias. In these cases, it is recommended to calibrate using a serum based standard (Multi S1-DAC cod 2051M5).

BIBLIOGRAPHY

1. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической биохимии, Минск, «Беларусь», 1982.
2. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под редакцией Меньшикова В.В. М, Медицина, 1987.
3. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994.
4. Yound DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory test, 3th ed. AACC Press, 1997.