

Reagenz zur quantitativen In-vitro-Bestimmung von Gesamt-Bilirubin im Serum / Plasma

Best. Nr. Bil 142
Inhalt: 40 Tests

Methode
 DPD-Methode¹⁾

Probenmaterial
 Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma
 Kein Blut einsetzen.
 Probe vor Lichteinwirkung schützen.
 Abnahme bei starker Lichteinwirkung: bis zu 30%/Std.
 Hämolyse (Hb > 0,5 g/dL) stört.
 Stabilität des Bilirubins im Serum unter Lichtausschluss:
 bei +2°C bis +6°C: 16 Stunden
 bei +15°C bis +25°C: 8 Stunden

Reagenz
 Inhalt / Konzentrationen:
 1. Startreagenz (Kappen in der PE-Flasche)
 2,5-Dichlorbenzoldiazonium-tetrafluorborat
 2. Detergenz (vorportioniert in Rundküvetten)
 Triton X-100 5%; HCl 100 mmol/L

Sicherheitshinweis
 Das Detergenz enthält 5 % Triton X-100 und 0,36 % Salzsäure und ist gemäß EG-Verordnung als gefährliches Gemisch eingestuft:
 H318: Verursacht schwere Augenschäden
 Sicherheitshinweise auf der Verpackung beachten.
 Ein Sicherheitsdatenblatt wird auf Anforderung zur Verfügung gestellt.²⁾
 H410: Sehr giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung
 H290: Kann gegenüber Metallen korrosiv sein

Lagerung und Haltbarkeit
 Die Reagenzien sind bei +2°C bis +8°C bis zu dem auf der Packung angegebenen Verfalldatum haltbar.
 Schraubkappen erst unmittelbar vor der Messung aus dem Behälter entnehmen.

Messbedingungen
 Messgeräte: Diaglobal Photometer
 Messwellenlänge: 546nm
 Temperatur: Raumtemperatur

Messbereiche
 BIL: 0,5 - 25 mg/dL (8,50 - 428 µmol/L)
 BIL N: 2,30 - 50 mg/dL (39,0 - 850 µmol/L)
 Bei höheren Konzentrationen Probe 1+4 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnen, Ergebnis x 5
 Bei Neugeborenen ist keine Verdünnungsgrenze zu berücksichtigen.

Hinweise
 Bei diesem Küvettentest werden Proben-Leerwert und Analyse nacheinander in einer Küvette angesetzt und gemessen.

Der Arbeitsgang für Neugeborene ist nur zu empfehlen, wenn Bilirubinwerte über 5,0 mg/dL erwartet werden.

Arbeitsanleitung
 A. Bestimmung bei Erwachsenen

In Rundküvette pipettieren:	
	Analyse
Probe	100 µL
Gut mischen.	

- Test <BIL> anwählen.
- Küvette mit Analyse in das Photometer einsetzen und E(0) messen (Nullpunkteinstellung).
- Kappe aus der PE-Flasche aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen aus der Kappe lösen.
- Taste [ON/ENTER] drücken.
- Küvette wieder in das Photometer einsetzen.
- Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Messergebnis im Display angezeigt.

B. Bestimmung bei Neugeborenen

In Rundküvetten pipettieren:	
	Analyse
Probe	20 µL
Gut mischen.	

- Test <BIL N> anwählen.
- Küvette mit Analyse in das Photometer einsetzen und E(0) messen (Nullpunkteinstellung).
- Kappe aus der PE-Flasche aufschrauben und Startreagenz durch mehrmaliges Kippen aus der Kappe lösen.
- Taste [ON/ENTER] drücken.
- Küvette wieder in das Photometer einsetzen.
- Nach Ablauf der Reaktionszeit wird das Messergebnis im Display angezeigt.

Qualitätssicherung
 Für die Qualitätssicherung empfehlen wir die Universal Kontrollseren der Firma Roche, www.roche.de: PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
 Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
 Ref: Roche / Hitachi analyzers, Method: Gen.3 serum, plasma

Referenzwerte³⁾
 Gesamt-Bilirubin im Serum / Plasma

	mg/dL	µmol/L
Erwachsene ²⁾	bis 1,1	18,8
Neugeborene ⁴⁾	24 Std.	bis 7,0
	48 Std.	bis 10,3
	3. Tag	bis 12,7
	4. Tag	bis 13,3

Zusammenfassung^{3,4)}
 Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Hämoglobins und wird im Plasma als Albumin-Komplex (indirektes, unkonjugiertes Bilirubin) oder als kovalent an Albumin gebundenes bzw. mit Glucuronsäure verestertes (direktes, konjugiertes) Bilirubin transportiert. Die verschiedenen Bilirubinfraktionen werden im vorliegenden Test als Summenparameter (Gesamt-Bilirubin) bestimmt.

Indikationen / Diagnostische Bedeutung :
 - Diagnose, Differentialdiagnose und Verlaufsbeurteilung des Ikterus

Die Bestimmung des Gesamt-Bilirubins gehört zum Basisprogramm von Neugeborenen-Untersuchungen.

Eine direkte Bestimmung (Direktphotometrie) des Bilirubin-Gehaltes aufgrund der Gelbfärbung des Plasmas ist nur bei Neugeborenen möglich, da bereits nach wenigen Lebenstagen die Konzentration der Serum-Carotine zunimmt und falsch erhöhte Bilirubinwerte vortäuscht. In der Erwachsenen-Diagnostik haben sich die auf der Kupplung von Bilirubin mit einem diazotierten aromatischen Amin beruhenden Azomethoden, die auch zur Bestimmung des Neugeborenen-Bilirubins geeignet sind, behauptet. Neben der recht aufwendigen Methode von Jendrassik-Grof⁵⁾ hat vor allem die neuere DPD-Methode Bedeutung erlangt.¹⁾ Diese Methode liegt dem Diaglobal-Test zugrunde.

Messprinzip
 Bilirubin wird in Gegenwart eines Detergenzes mit 2,5-Dichlorbenzoldiazoniumsalz zu einem roten Azofarbstoff umgesetzt.



Die Intensität des gebildeten Farbstoffes ist der Bilirubin-Konzentration im Serum / Plasma proportional und wird photometrisch gemessen.

Achtung ! Wichtiger Hinweis:

Das ist die neue Packungsbeilage für alle Diaglobal Photometer ab Version V 5.12

Das Probenvolumen für Neugeborene wurde von 10 µL auf 20 µL geändert. Dadurch ergibt sich eine Änderung des im Photometer ab V 5.12 gespeicherten Faktors. Wir empfehlen Ihnen ein Software-Update für Ihr Gerät. Falls Ihr Gerät noch nicht die neue Version V 5.12 hat. Bitte setzen Sie sich mit uns in Verbindung.

Leistungsmerkmale
Spezifität / Interferenzen^{3,6)}
 Hämoglobin (>0,25 g/L) täuscht zu niedrige Werte vor. Keine Beeinflussung durch Lipämie bis 1400 mg/dL. Keine Störung durch Ascorbinsäure in physiologischen Konzentrationen (falsch erniedrigte Werte ab 300 mg/L).

Unpräzision
 Die Reproduzierbarkeit wurde mit Human- und Kontrollproben überprüft.

In der Serie [n = 20]	Mittelwert [mg/dL]	Standard-Abweichung [mg/dL]	VK [%]
Probe 1 Probe 2	1,02 4,80	0,04 0,09	4,1 1,8
Von Tag zu Tag [n = 20]	Mittelwert [mg/dL]	Standard-Abweichung [mg/dL]	VK [%]
Probe 1 Probe 2	1,03 4,82	0,04 0,09	4,3 2,0

Analytische Sensitivität
 Untere Nachweisgrenze: 0,5 mg/dL (8,6 µmol/L)

Methodenvergleich
 Ein Vergleich des Diaglobal-Tests BIL 142 (y) mit einem anderen kommerziell erhältlichen Test (x) ergab nach dem Verfahren von Passing/Bablok⁷⁾ die Korrelation:
 $y = 0,952x + 0,026$
 $r = 0,993$
 n = 45
 Konzentrationsbereich: 0,5 - 40 mg/dL

Hinweise zur Entsorgung
 Abfallschlüsselnummer 180106:
 Küvetten mit Reagenz nicht ins Wasser oder die Kanalisation gelangen lassen.
 Entsorgung gemäß den behördlichen Vorschriften.
 Nichtkontaminierte und restentleerte Verpackungen können einer Wiederverwertung zugeführt werden.

Order No. BIL 142
Content: 40 tests

Method
 DPD- Method¹⁾

Sample material
 Serum, heparinized or EDTA plasma.
 No use of blood.
 Protect sample from action of light.
 Diminution at intense action of light: up to 30% / hour.
 Haemolysis (Hb > 0.5 g/dL) would interfere.
 Stability of bilirubin in serum under exclusion of light:
 at +2°C to +6°C: 16 hours
 at +15°C to +25°C: 8 hours

Reagents
 Content / concentrations:
 1. Starter reagent (caps in PE-bottle)
 2.5-Dichlorobenzene diazonium tetrafluoroborat
 2. Detergent (pre-portioned in round cuvettes)
 Triton X-100 5%; HCl 100 mmol/L

Safety information
 The detergent contains 5 % Triton X-100 and 0.36% hydrochloric acid and is categorized as a dangerous preparation according to EC Directives:
 H318: Causes serious eye damage
 Observe the safety advice on the packaging.
 A safety data sheet is available on request.²⁾
 H410: Very toxic to aquatic life with long lasting effects
 H290: May be corrosive to metals

Storage and shelf life
 The test reagents have to be kept at a temperature between +2°C and +8°C until the expiry date indicated on the packaging. Please take the screw caps out of the container just before the analysis and close the container immediately.

Measurement conditions
 Measurement devices: Diaglobal Photometer

Meas. wavelength: 546nm
 Temperature: Room temperature

Measurement ranges
 BIL: 0,5 - 25 mg/dL (8,50 - 428 µmol/L)
 BIL N: 2,30 - 50 mg/dL (39,0 - 850 µmol/L)
 In case of exceeding these values, dilute the sample 1+4 with physiological saline solution. Multiply the result by 5. No dilution limit has to be considered with newborn.

Tips
 When taking this cuvette testing, the sample's blank value and analysis are set into a cuvette and measured one after another.

The procedure for newborn (10 µL sample) is recommended only if one expects bilirubin counts of more than 5.0 mg/dL.

Working instructions
 A. Determination / adults

Pipette in single test cuvettes BIL 142:	
	Analysis
Sample	100 µL
Mix thoroughly.	

- Select the <BIL> test.
- Insert analysis cuvette (blank value).
- After the signal tone, remove cuvette
- Screw the orange cap onto the cuvette, dissolve the starting reagent powder contained in the cap by inverting several times.
- Press [ON/ENTER].
- Insert analysis cuvette again and wait for result.

B. Determination / newborn

Pipette in single test cuvettes BIL 142:	
	Analysis
Sample	20 µL
Mix thoroughly.	

- Select the <BIL N> test.
- Insert analysis cuvette and measure the photometer's zero point A(0).
- Screw caps from the PE bottle onto the cuvettes and dissolve the caps' content by inverting several times, mix thoroughly. Hereby the sample has to be streamed out of the capillary completely.
- Press [ON/ENTER].
- Insert analysis cuvette again and wait for result.

Quality assurance
 For quality assurance we recommend universal control sera from company Roche, www.roche.de:
 PreciControl ClinChem Multi 1 / Multi 2 (4 x 5 mL)
 Order-No.: 05 947 626 190 / 05 947 774 190
 Ref.: Roche / Hitachi analyzers, Method: Gen.3 serum, plasma

Reference values³⁾
 Total Bilirubin in serum / plasma

	mg/dL	µmol/L
Adults ²⁾	up to 1.1	18.8
Newborn ⁴⁾	24 hours	up to 7.0
	48 hours	up to 10.3
	3rd day	up to 12.7
	4th day	up to 13.3

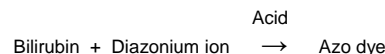
Summary^{3,4)}
 Bilirubin is a degradation product of the haemoglobin. It is carried in the plasma as albumin complex (indirect, unconjugated bilirubin) or as covalent bilirubin which is bound to albumin or rather esterified with glucuronic acid (direct, conjugated). The existent test determines the different bilirubin fractions as total parameters (bilirubin as a whole).

Indications / diagnostic significance:
 - diagnosis, differential diagnosis, and progression evaluation of the icterus

The determination of bilirubin as a whole is counted among the basis programme of the examination of newborn.

A direct measurement (direct photometry) of the bilirubin concentration is possible only with newborn because of the plasma's yellow stain. Already a few days after birth, the concentration of the serum carotenes rises and consequently falsifies bilirubin counts which are erroneously too high. The azo methods, which are based on a coupling of bilirubin and a diazotized aromatic amine, have prevailed in the adult diagnosis. They are also qualified for the measurement of the bilirubin of newborn. Besides the quite complex method of Jendrassik-Grof⁵⁾, the newer DPD method has most notably become important.¹⁾ This method forms the basis of the Diaglobal test.

Measurement principle
 In the presence of a detergent with 2.5- dichlorobenzene diazonium salt, bilirubin becomes converted into a red azo dye.



The intensity of the emerged dye is proportional to the bilirubin concentration in serum / plasma and is measured photometrically.

Attention ! Important Note:
This is the new packing insert for all Diaglobal photometers valid from version V 5.12

The neonatal sample volume has been changed from 10 µL to 20 µL. This results in a change of the factor stored in the photometer as of V 5.12.

We recommend a software update for your device if it does not have the new version V 5.12 yet.

Please contact us.

Performance parameters
Specificity / interferences^{3,6)}
 Haemoglobin (>0.25 g/L) falsifies too low values. No influence through lipaemia up to 1400 mg/dL. No interference due to ascorbic acid in physiological concentrations (erroneously too low values from 300 mg/L).

Inaccuracy
 The reproducibility was checked using human and control samples.

In series [n = 20]	Average [mg/dL]	Standard deviation [mg/dL]	VK [%]
Sample 1 Sample 2	1.02 4.80	0.04 0.09	4.1 1.8
From day to day [n = 20]	Average [mg/dL]	Standard deviation [mg/dL]	VK [%]
Sample 1 Sample 2	1.03 4.82	0.04 0.09	4.3 2.0

Analytic sensitiveness
 Lower detection limit: 0.5 mg/dL (8.6 µmol/L)

Comparison of methods
 A comparison of the Diaglobal test BIL 142 (y) and a commercially available test (x) resulted in the following correlation according to the Passing/Bablok⁷⁾ process:
 $y = 0.952x + 0.026$
 $r = 0.993$

n = 45
 Concentration range: 0.5 - 40 mg/dL

Information on disposal
 Waste code number 180106:
 Vials with reagent are considered hazardous waste. Do not allow reagent to reach surface water or sewage system. Dispose of in accordance with official regulations. Non-contaminated and completely empty packaging can be recycled.