





ASSEL S.r.l.
Via E. Barsanti 13/A – 00012 Guidonia (Rm)
Tel.: +39 0774 357492
Fax: +39 0774 372179
e-mail: info@asselitaly.eu



BILIRUBINA TOTALE
Metodo colorimetrico senza DMSO

000271   Prodotto conforme alla direttiva 98/79 CE
Rev. 6 del 21/10/11

REF	ASR01034/1	4x100 + 1x25 ml
	ASR01034/2	2x100 + 1x25 ml
	ASKIT0402	6x45 + 6x2 ml

• Principio di reazione

La bilirubina totale, in ambiente acido, reagisce con acido solfanilico diazotato formando un azocomposto colorato (azobilirubina) in rosso la cui intensità di colore risulta direttamente proporzionale alla quantità di bilirubina presente nel siero.

Mentre la bilirubina diretta, cioè coniugata con acido glucuronico è idrosolubile e reagisce direttamente, la bilirubina totale si ottiene mediante la presenza di solubilizzante che scinde il legame con l'albumina.

La bilirubina indiretta può essere calcolata per differenza tra la bilirubina totale e bilirubina diretta.

• Campione

Siero fresco non emolizzato.

I campioni dovranno essere analizzati entro due ore dal prelievo se conservati a temperatura ambiente al buio. La Bilirubina Totale nel siero è stabile 12 ore in frigo a 2 – 8°C e tre mesi in congelatore a – 20 °C se a riparo dalla luce. Luce diretta può causare un decremento della Bilirubina Totale fino al 50% in un'ora.

Agitare e portare i campioni a temperatura ambiente prima dell'uso.

• Valori di riferimento

SIERO	0.2 – 1.2 mg/dl (3.42 – 20.52 µmol/l)
-------	---------------------------------------

I valori sopra riportati devono considerarsi indicativi, in quanto si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire l'intervallo di riferimento in relazione alla propria area geografica.

• Composizione della confezione ed eventuale classificazione di pericolo

REATTIVO (A)	
Acido Solfanilico	< 1 %
Acido Cloridrico 23%	< 5 %
Solubilizzante	< 1 %
REATTIVO (B)	
Sodio Nitrito	< 1 %

Il kit non contiene sostanze o preparati classificati pericolosi in base alla legislazione attualmente vigente.

Il Reattivo A contiene Acido Solfanilico che può provocare una reazione allergica.

• Stabilità e conservazione dei reattivi

Conservare alle temperature indicate in etichetta.

Stabile fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

Dopo l'apertura e il prelievo del reattivo, si consiglia di richiudere immediatamente il flacone, al fine di evitare contaminazione batterica luce diretta ed evaporazione.

• Preparazione e Stabilità del reattivo di lavoro

Reattivi liquidi, da portare a temperatura ambiente prima dell'uso.

I reattivi si presentano limpidi e incolore.

Procedura monoreattivo:

Aggiungere 0.5 ml di Reattivo (B) a 15 ml di Reattivo (A).

Stabile almeno 4 giorni a T.A. in bottiglia scura.

Procedura bireattivo:

Reattivi liquidi pronti all'uso.

• Precauzioni e avvertenze

Ogni qualvolta si manipolano agenti infettanti, reagenti chimici, reagenti di origine umana od animale, sangue o altri liquidi biologici, è consigliabile seguire le più comuni raccomandazioni e prendere tutte le necessarie precauzioni igieniche come l'utilizzazione di guanti monouso.

• Smaltimento

Applicare le norme di cui al D.Leg.vo 22/97 e successive modificazioni (Rifiuti Speciali e Speciali Pericolosi con relativo codice CER).

• Metodica operativa

Lunghezza d'onda	546nm (520-560)
Cammino ottico	1 cm
Temperatura	+20/30/37°C
Lettura	Contro bianco reagente
Reazione	End Point
Rapporto Campione / Reattivo	1/15 (Monoreattivo)

Procedura monoreattivo (Pipettare nelle provette):

Allestire due serie di provette, una per la misura dell'estinzioni dei bianchi campione, l'altra per la misura dell'estinzioni dei campioni.

Pipettare nelle provette:	Bianco Reattivo	Campione/ calibratore	Bianco Camp/calib
Reattivo (A + B)	1500 µ	1500 µl	
Reattivo (A)			1500 µl
Campione		100 µl	100 µl
Acqua	100 µl		

Procedura bireattivo

Allestire due serie di provette, una per la misura dell'estinzioni dei bianchi campione, l'altra per la misura dell'estinzioni dei campioni.

Pipettare nelle provette:	Bianco Reattivo	Campione/ calibratore	Bianco Camp/calib
Reattivo (A)	1500 µl	1500 µl	1500 µl
Reattivo (B)	50 µl	50 µl	
Campione		100 µl	100 µl
Acqua	100 µl		50 µl

Agitare, incubare per 5' esatti a T.A. (15 – 25°C) e leggere l'estinzione dei campioni/calibratore e dei bianchi campione/calibratore.

I volumi di reazione possono essere variati proporzionalmente.

La presente metodica descrive l'utilizzo del kit in manuale.

Per l'utilizzo con analizzatori, consultare le applicazioni specifiche.

• Calcolo

CON FATTORE

Bil. Tot. mg/dl = (E) Campione- (E) Bianco Campione x 22 a 546 nm

CON CALIBRATORE

(E) Campione – (E) Bianco Campione

Bil. Tot. mg/dl = ----- x valore Calibratore

(E) Calibratore – (E) Bianco Calibratore

Fattore per passare da mg/dl a µmol/l = 17.1

• Prestazioni

A. PRESTAZIONI DEL METODO

Linearità:

Procedura monoreattivo/ bireattivo 25 mg/dl

Limite misurabile (2DS): 0.06 mg/dl

Sensibilità: 1 mg/dl = 0.0693 a a 546 nm

B. PRECISIONE NELLA SERIE (N=20 replicati)

	Media	C.V.(%)
Controllo basso	M = 0.62 mg/dl	3.38 %
Controllo medio	M = 1.19 mg/dl	2.04 %
Controllo alto	M = 4.90 mg/dl	0.88 %

C. PRECISIONE TRA LE SERIE (N = 20 replicati)

	Media	C.V.(%)
Controllo basso	M = 0.65 mg/dl	4.72 %
Controllo medio	M = 1.18 mg/dl	0.84 %
Controllo alto	M = 4.99 mg/dl	1.82 %

D. CORRELAZIONE TRA METODI

Il confronto tra questo metodo (y) ed uno corrispondente del commercio (x) ha dato i seguenti risultati:

N = 40 r = 0,987 y = 1,05 x + 0,016

E. INTERFERENZE (In accordo raccomandazioni SFBC)

Trascurabili le interferenze fino a:

Emoglobina 500 mg/dl Trigliceridi 1000 mg/dl

Per una completa valutazione delle sostanze interferenti vedi il lavoro di: Young, D.S., et al., Clin.Chem. 21:1D (1975).

• Limiti del metodo

Per concentrazioni superiori a 25 mg/dl, ripetere l'analisi su campione diluito 1:2 con soluzione fisiologica e moltiplicare il risultato per 2.

• Controllo di Qualità

E' necessario eseguire i controlli ad ogni utilizzo del kit e verificare che i valori ottenuti siano inclusi nell'intervallo di riferimento riportato nelle istruzioni d'uso. A tale scopo si consiglia l'utilizzo dei sieri di controllo Cod. ASR02010 (Normale) e Cod. ASR02020 (Patologico).

• Bibliografia

Van Den Bergh, A.A.H., Muller, P., Biochem Z 77:90 (1916).
Vassault, A. et al. Ann. Biol. Clin., 44, 686, (1986).



ASSEL S.r.l.
Via E. Barsanti 13/A – 00012 Guidonia (Rm)
Tel.: +39 0774 357492
Fax: +39 0774 372179
e-mail: info@asselitaly.eu



TOTAL BILIRUBIN
Colorimetric method without Dimethyl sulfoxide (DMSO)
In conformity with Directive 98/79 CE
000271 Rev. 6 of 21/10/11

REF	ASR01034/1	4x100 + 1x25 ml
	ASR01034/2	2x100 + 1x25 ml
	ASKIT0402	6x45 + 6x2 ml

• Principle

Total bilirubin reacts in acid conditions with diazotized sulfanilic acid to form a red coloured azobilirubin. The intensity of the produced colour is directly proportional to the amount of bilirubin present in the sample. Direct bilirubin is glucuronic acid conjugated, water soluble and it reacts directly. Total bilirubin is obtained by the presence of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) an accelerating agent which separates it from albumin. Indirect bilirubin can be calculated by subtracting direct bilirubin from total bilirubin.

• Sample

Not hemolized fresh serum. Samples must be analyzed within two hours from their collection and kept at room temperature and not exposed to light. Total Bilirubin (BIL-T) in serum is stable for 12 hours when stored in the refrigerator at 2 – 8°C and 3 months at – 20°C, if not exposed to sunlight. Direct sunlight may cause up to 50% decrease in BIL-T within 1hour. Shake and bring the samples at room temperature before using.

• Expected value

SERUM	0.2 – 1.2 mg/dl	3.42 – 20.52 µmol/l
--------------	-----------------	---------------------

Consider the above mentioned values as a reference. It is strongly recommended that each laboratory establishes its own normal range according to its geographic area.

• Kit composition and possible risk classification

REAGENT (A)	
Sulfanilic Acid	< 1 %
Hydrochloric Acid 23%	< 5 %
Solvent	< 1 %
REAGENT (B)	
Sodium Nitrite	< 1 %

Avoid pipetting with mouth.

The Reagent (A) contains sulphaniilic acid that may produce an allergic reaction.

• Package: collection and storage

Store at temperature indicated upon the label. Stable until the expiration date reported on the package. After unsealing, it is advised to close up the bottle immediately in order to avoid evaporation, direct light exposure and bacteric contamination.

• Reagent preparation and stability

Liquid reagent ready to use, must be at room temperature (15 – 25°C) before using.

The Reagent is limpid and colourless.

Mono-reagent Procedure :

Add in the ratio 1: 31 (0.5 ml + 15 ml) Reagents (B) and (A).

Stable at least 4 day at room temperature in dark bottle.

Double-reagent Procedure:

Liquid reagent ready to use.

• Precautions and warning

Whenever agents infettantis, chemical reagents, reagents of human/animal origin, blood or other biological liquids are manipulated, it is advisable to follow the most common recommendations and take all the necessary hygienic precautions as the monouse gloves.

• Waste disposal

Please consult local regulations for a correct waste disposal.

• Operative method

Wavelength: 546nm (520-560)
Cuvette: 1cm light path
Temperature: +20/30/37°C.
Zero operation: Against reagent blank
Assay type: End Point
Sample/Reagent ratio: 1/15(monoreagent)

Mono-reagent Procedure:

Prepare two series of tubes, one for samples blank absorbance reading ,and one for samples absorbance reading.

Pipetting in tubes	Reagent Blank	Sample/calibrator	Samp/calbr Blank
Reagent (A+B)	1500 µl	1500 µl	
Reagent (A)			1500 µl
Sample		100 µl	100 µl
Distilled Water	100 µl		

Double-reagent Procedure:

Prepare two series of tubes, one for samples blank absorbance reading ,and one for samples absorbance reading.

Pipetting in tubes	Reagent Blank	Sample/calibrator	Samp/calbr Blank
Reagent (A)	1500 µl	1500 µl	1500 µl
Reagent (B)	50 µl	50 µl	
Sample		100 µl	100 µl
Distilled Water	100 µl		50 µl

Mix, incubate for exactly 5' at room temperature (15 – 25°C) and read samples/calibrator absorbance and samples/calibrator blank absorbance.

Volumes can be proportionally modified.

This methodology describes the manual procedure to use the kit.

• Calculation

FACTOR CALCULATION

BIL-T = (A) Sample - (A) Sample blank x 22 a 546/578nm

CALIBRATOR CALCULATION

$$BIL-T \text{ mg/dl} = \frac{(A) \text{ Sample} - (A) \text{ Sample blank}}{(A) \text{ Calibrator} - (A) \text{ Calibrator blank}} \times \text{Cal. Value}$$

Factor to convert mg/dl in µmol/l = 17.1.

• Performance

A. METHOD PERFORMANCE

Linearity: Monoreagent/ Bi – reagent 25 mg/dl
Detection limit (2DS): 0.06 mg/dl
Sensitivity: 1 mg/dl = 0.0693A (546nm)

B. INTRA-ASSAY PRECISION: n=20

	Mean	C.V.(%)
Low control	M = 0.62 mg/dl	3.38 %
Medium control	M = 1.19 mg/dl	2.04 %
High control	M = 4.90 mg/dl	0.88 %

C. INTER-ASSAY PRECISION: n=20

	Mean	C.V.(%)
Low control	M = 0.65 mg/dl	4.72 %
Medium control	M = 1.18 mg/dl	0.84 %
High control	M = 4.99 mg/dl	1.82 %

D. CORRELATION BETWEEN METHODS

This method compared with a correspondent one from the competition, has given the following results:
N = 40 r = 0.987 y = 1.05 x + 0.016

E. INTERFERENCE (in accordance with recommendations SFBC)

1. Triglicerides don't interfere up to 1000 mg/dl
 2. Hemoglobin does not interfere up to 500 mg/dl
- For a thorough evaluation of the interfering substances, consult: Young, D.S.,et al.,Clin.Chem. 21:1D (1975).

• Limitations

For concentration higher than 25 mg/dl, repeat the measure on sample diluted 1:2 with saline solution and multiply the results by 2.

• Quality Control

It is recommended to execute the quality control at every kit utilization to verify that values are within the reference range indicated by the methodology. For this purpose the use of test serum REF. ASR02010 (Normal level) and REF. ASR02020 (Pathologic level) is suggested.

• Bibliography

Van Den Bergh,A.A.H.,Muller,P.,Biochem Z 77:90(1916).
Vassault,A. et al. Ann.Biol.Clin.,44,686,(1986).



TOTAL BILIRUBIN

Colorimetric method without Dimethyl sulfoxide (DMSO)



In conformity with Directive 98/79 CE

000271



ASR01034/1	4x100 + 1x25 ml
ASR01034/2	2x100 + 1x25 ml
ASKIT0402	6x45 + 6x2 ml

	ELLIPSE rev.0 of 28/06/10	LIASYS rev.0 of 28/06/10
Description:	Total bilirubin	Total bilirubin
Unit:	mg/dl	mg/dl
Decimals:	2	2
LIS Code:	BIT	BIT
Unit Factor:	1.0	1.0
Slope:	1.00	1.00
Intercept:	0.00	0.00
Reaction Type:	End Point	End Point
Direction:	UP	UP
E.P Limit:	0.0070	0.0070
Depl.Limit:		
First Limit:		
Linear Factor:		
Fit:		
RBL Replicates:	x 1	x 1
RBL Max CV%:	10	10
RBL Min (abs):	-0.0100	-0.0100
Max (abs):	0.0500	0.0500
Lin. Lim. Low:	0.00	0.00
High:	30.00	30.00
Rerun when over:	*	*
Calculation Model:	Standard	Standard
Factor:	1.00	1.00
Sample Blank:	Yes	Yes
Reference Range	*	*
Parameters		
Predilut	Times (sec):	
	Dil./Reag Code:	
	Lot Number:	
	Ratio/Vol (ul):	1/1
C. + R.1	Times (sec):	0
	Dil./Reag Code:	BIT
	Lot Number:	
	Ratio/Vol (ul):	216
	Rinse (ul):	0
	Sample (ul):	24
Reag 2	Times (sec):	78
	Dil./Reag Code:	NITR
	Lot Number:	
	Ratio/Vol (ul):	8
	Rinse (ul):	0
	Sample (ul):	
Reag 3	Times (sec):	
	Dil./Reag Code:	
	Lot Number:	
	Ratio/Vol (ul):	
	Rinse (ul):	
	Sample (ul):	
Wash		
Incubation	304	314
Read		
Filter 1 (nm):	546	546
Filter 2 (nm):	(none)	(none)
Bichr. Factor:	1.00	1.00
RBL Stability (days):	1	1
Calibration Stab. (days):	7	7
Dinamic Controls (min.):	*	*

* user-defined

• Performance **ELLIPSE**
METHOD PERFORMANCE

Linearity: 30,66 mg/dl
Sensitivity: 0.1 mg/dl = 0.016A

STABILITY ON BOARD:

Stable two weeks if reagent is kept refrigerated and capped (after working session)

INTRA-ASSAY PRECISION: n=40

	Media	DS	CV
Normal control	1,01	0,02	1,64
Abnormal control	3,96	0,06	1,55

INTER-ASSAY PRECISION: n=40

	Media	DS	CV
Normal control	1,01	0,04	4,28
Abnormal control	3,96	0,18	4,51

CORRELATION BETWEEN METHODS

This method compared with a correspondent one from the competition, has given the following results:

N = 145 r = 1,00 y = 1,4097x - 0,1552

• Performance **LIASYS**
METHOD PERFORMANCE

Linearity: 30,77 mg/dl
Sensitivity: 0.1 mg/dl = 0.015A

STABILITY ON BOARD:

Stable two weeks in refrigerated compartment and capped overnight

INTRA-ASSAY PRECISION: n=40

	Media	DS	CV
Normal control	1,01	0,04	4,03
Abnormal control	3,81	0,10	2,52

INTER-ASSAY PRECISION: n=40

	Media	DS	CV
Normal control	1,01	0,08	7,89
Abnormal control	3,81	0,19	5,11

CORRELATION BETWEEN METHODS

This method compared with a correspondent one from the competition, has given the following results:

N = 145 r = 1,00 y = 1,3619x - 0,1175