

Bilirubin Jendrassik-Gróf FS*

Zur In-vitro-Bestimmung von direktem Bilirubin und Gesamtbilirubin nach der Jendrassik-Gróf-Methode an fotometrischen Systemen

Bestellinformation

Bestell -Nr.	Packungsgröße
1 0849 99 90 336	<ul style="list-style-type: none"> ① 1 x 90 mL Reagenz 1 Sulfanilsäurelösung ② 1 x 25 mL Reagenz 2 Natriumnitritlösung ③ 2 x 100 mL Reagenz 3 Accelerator ④ 2 x 100 mL Reagenz 4 Fehling-Lösung II

Prinzip

Bilirubin bildet mit diazotierter Sulfanilsäure einen Azofarbstoff, der in neutraler Lösung rot, in alkalischer Lösung blau ist. Während das wasserlösliche Bilirubinglucuronid „direkt“ reagiert, setzt sich das freie „indirekte“ Bilirubin erst in Gegenwart eines Accelerators um. Das Gesamtbilirubin in Serum und Plasma bestimmt man nach Jendrassik und Gróf durch Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure nach Zusatz von Coffein, Natriumbenzoat und Natriumacetat. Mit der alkalischen Fehling-Lösung II entsteht blaues Azobilirubin, dessen Gehalt auch in Gegenwart von gelben Nebenprodukten (grüne Mischfärbung) selektiv fotometrisch bei Hg 578 nm bestimmt werden kann. Das direkt reagierende Bilirubin wird nach Schellong und Wende ohne Zusatz von Alkali als roter Azofarbstoff bei Hg 546 nm gemessen. Das indirekte Bilirubin errechnet sich aus der Differenz zwischen Gesamtbilirubin und direktem Bilirubin

Reagenzien

Bestandteile und Konzentrationen

R1:	Sulfanilsäure	29 mmol/L
	HCl	170 mmol/L
R2:	Natriumnitrit	29 mmol/L
R3:	Coffein	130 mmol/L
	Natriumbenzoat	156 mmol/L
	Natriumacetat	460 mmol/L
R4:	Fehling-Lösung II:	
	Kalium-Natriumtartrat	930 mmol/L
	Natriumhydroxid	1,9 mol/L

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

Die Reagenzien sind bei 15 – 25 °C bis zum Ende des auf der Packung angegebenen Verfallsmonats verwendbar, wenn nach dem Öffnen der Flaschen Kontaminationen vermieden werden. Reagenzien nicht einfrieren!

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

- Reagenz 1: Achtung. H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- Reagenz 4 Gefahr. H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein. H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen. P301+P330+P331 Bei Verschlucken: Mund ausspülen. kein Erbrechen herbeiführen. P303+P361+P353 Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen. P305+P351+P338 Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. P304+P340 Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert. P310 Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. P390 Verschüttete Mengen aufnehmen, um Materialschäden zu vermeiden.
- In sehr seltenen Fällen kann es bei Proben von Patienten mit Gammopathien zu verfälschten Ergebnissen kommen [7].

- Beachten Sie bitte die Sicherheitsdatenblätter und die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen für den Gebrauch von Laborreagenzien. Für diagnostische Zwecke sind die Ergebnisse stets im Zusammenhang mit der Patientenvorgeschichte, der klinischen Untersuchung und anderen Untersuchungsergebnissen zu werten.
- Nur für professionelle Anwendung!

Entsorgung

Bitte beachten Sie die jeweiligen gesetzlichen Vorschriften.

Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Zusätzlich benötigte Materialien

NaCl-Lösung 9 g/L
Übliche Laborausrüstung

Probenmaterial

Serum

Probenmaterial unbedingt vor Lichteinstrahlung schützen!
Haltbarkeit [5]:

Direktes Bilirubin:	2 Tage	bei	20 – 25 °C
	7 Monate	bei	4 – 8 °C
	6 Monate	bei	-20 °C

bei sofortigem Einfrieren! Nur einmal einfrieren!

Gesamtbilirubin:	1 Tag	bei	20 – 25 °C
	7 Tage	bei	4 – 8 °C
	6 Monate	bei	-20 °C

bei sofortigem Einfrieren! Nur einmal einfrieren!

Kontaminierte Proben verwerfen!

Testschema

Schichtdicke	1 cm
Temperatur	15 – 25 °C
Messung	Gegen Probenleerwert (PLW)

Bestimmung des Gesamtbilirubins

(siehe Hinweis 1)

Wellenlänge: Hg 578 nm

	Probenleerwert (PLW)	Probe
Reagenz 2	-	50 µL
Reagenz 1	200 µL	200 µL
Reagenz 3	1000 µL	1000 µL
Probe	200 µL	200 µL
Mischen, 10 – 60 Min. bei 15 – 25 °C inkubieren, dann zufügen:		
Reagenz 4	1000 µL	1000 µL
Mischen, nach 5 – 30 Min. die Extinktion der Probe gegen den Probenleerwert messen.		

Berechnung

Konzentration Gesamtbilirubin:	[mg/dL] = E x 10,5
	[µmol/L] = E x 180

Bestimmung des direkten Bilirubins

(siehe Hinweise 1 und 2)

Wellenlänge: Hg 546 nm

	Probenleerwert (PLW)	Probe
Reagenz 2	-	50 µL
Reagenz 1	200 µL	200 µL
NaCl-Lösung	2000 µL	2000 µL
Probe	200 µL	200 µL

Sofort Mischen, nach genau 5 Min. bei 15 – 25 °C die Extinktion der Probe gegen den Probenleerwert messen.

Berechnung

Konzentration direktes Bilirubin: [mg/dL] = E x 14,0
[µmol/L] = E x 240

Hinweise für die manuelle Anwendung

1. Zur Arbeitserleichterung kann man bei größeren Serien 4 Volumenanteile Sulfanilsäure ❶ und einen Volumenanteil Natriumnitrit ❷ vorher mischen. Man pipettiert zur Probe an Stelle von Sulfanilsäure und Natriumnitrit 200 µL dieser Diazotierungslösung. Sie ist bei 15 – 25 °C 2 Stunden verwendbar. Die Berechnungsformeln lauten dann:

Gesamtbilirubin: [mg/dL] = E x 10,3
[µmol/L] = E x 177

Direkt reagierendes Bilirubin: [mg/dL] = E x 13,7
[µmol/L] = E x 235

2. Direktes Bilirubin kann auch bei Hg 578 nm bestimmt werden. Hierzu gibt man zu Probenleerwert und Probe jeweils nur 1000 µL isotonische NaCl-Lösung und dann, 5 Minuten nach Serumzugabe, je 1000 µL Fehling-Lösung II ❸. Nach dem Mischen und einer Inkubation von 5 min. misst man die Extinktion der Proben gegen den Probenleerwert bei Hg 578 nm und 1 cm Schichtdicke. Die Berechnungsformeln lauten dann:

Direktes Bilirubin: [mg/dL] = E x 10,5
[µmol/L] = E x 180

Kontrollen

Für die interne Qualitätskontrolle sollten DiaSys TruLab N und P Kontrollen gemessen werden. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall einer Abweichung bei der Kontrollwiederfindung festlegen.

	Bestell-Nr.	Packungsgröße
TruLab N	5 9000 99 10 062	20 x 5 mL
	5 9000 99 10 061	6 x 5 mL
TruLab P	5 9050 99 10 062	20 x 5 mL
	5 9050 99 10 061	6 x 5 mL

Leistungsmerkmale**Messbereich**

Der Test ist zur Messung von Bilirubinkonzentrationen von 0,03 – 10 mg/dL geeignet. Wird dieser Bereich überschritten, sollen die Proben 1 + 1 mit NaCl-Lösung (9 g/L) verdünnt und das Ergebnis mit 2 multipliziert werden.

Spezifität/Interferenzen

Bei der Messung von Gesamtbilirubin treten keine Interferenzen mit Hämoglobin bis 400 mg/dL, Naproxen bis 0,4 mmol/L und Lipämie bis zu 800 mg/dL Triglyceride auf.

Weitere Informationen zu Interferenzen finden Sie bei Young DS [6].

Testempfindlichkeit/Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze ist 0,03 mg/dL.

Präzision Bilirubin direkt

In der Serie n = 20	Mittelwert [mg/dL]	SD [mg/dL]	VK [%]
Probe 1	0,33	0,00	1,44
Probe 2	0,71	0,01	0,93
Probe 3	0,15	0,00	3,00

Von Tag zu Tag n = 20	Mittelwert [mg/dL]	SD [mg/dL]	VK [%]
Probe 1	0,77	0,02	2,47
Probe 2	1,99	0,06	2,82
Probe 3	3,44	0,13	3,64

Präzision Gesamtbilirubin

In der Serie n = 20	Mittelwert [mg/dL]	SD [mg/dL]	VK [%]
Probe 1	0,35	0,01	2,15
Probe 2	1,79	0,01	0,45
Probe 3	3,86	0,03	0,79

Von Tag zu Tag n = 20	Mittelwert [mg/dL]	SD [mg/dL]	VK [%]
Probe 1	1,37	0,05	3,32
Probe 2	0,76	0,03	3,33
Probe 3	5,96	0,09	1,43

Methodenvergleich

Bei einem Vergleich der Bestimmung von DiaSys Bilirubin Total FS nach Jendrassik-Gróf (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden mit 38 Proben folgende Ergebnisse erhalten:
 $y = 1,01 x - 0,08 \text{ mg/dL}$; $r = 0,999$

Bei einem Vergleich der Bestimmung von DiaSys Bilirubin Direkt FS nach Jendrassik-Gróf (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden mit 27 Proben folgende Ergebnisse erhalten:
 $y = 0,98 x - 0,01 \text{ mg/dL}$; $r = 0,991$

Referenzbereiche [1]**Gesamtbilirubin**

Neugeborene	24 h	< 8,8 mg /dL	< 150 µmol/L
	2. Tag	1,3 – 11,3 mg /dL	22 – 193 µmol/L
	3. Tag	0,7 – 12,7 mg /dL	12 – 217 µmol/L
	4. – 6. Tag	0,1 – 12,6 mg /dL	1,7 – 216 µmol/L
Kinder	> 1 Monat	0,2 – 1,0 mg /dL	3,4 – 17 µmol/L
Erwachsene		0,1 – 1,2 mg /dL	1,7 – 21 µmol/L

Bilirubin direkt

Erwachsene und Kinder ≤ 0,2 mg /dL 3,4 µmol/L

Jedes Labor sollte die Übertragbarkeit der Referenzbereiche für die eigenen Patientengruppen überprüfen und gegebenenfalls eigene Referenzbereiche ermitteln.

Literatur

- Thomas L ed. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft, 1998:192-202.
- Tolman KG, Rej R. Liver function. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 1125-77.
- Jendrassik L, Gróf P. Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins. Biochem Zeitschrift 1938;297:82-9.
- Schellong G, Wende U. Mikromethode zur Bestimmung des Serumbilirubins aus Kapillarblut bei Neugeborenen. Arch Kinderheilkunde 1960;162:126-35.
- Guder WG, Zawta B et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001;p. 18-9.
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 5th ed. Volume 1 and 2. Washington, DC: The American Association for Clinical Chemistry Press 2000.
- Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. ClinChemLabMed 2007;45(9):1240-1243.

Hersteller

DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Alte Straße 9 65558 Holzheim Deutschland