



مواد و تجهیزات مورد نیاز برای انجام آزمایش:

- کالیبراتور و کنترل
- سرم فیزیولوژی
- دستگاه اتوآنالایزر یا فوتومتر

شرایط آزمایش:

- طول موج مناسب: ۵۴۶ نانومتر
- دمای مناسب: ۳۷ °C

شرایط و پایداری نمونه:

- نمونه مناسب، سرم یا پلاسمای حاوی EDTA یا هپارین می باشد.
- همولیز و لیپمیک شدید نمونه باعث ایجاد خطا در نتایج می گردد.
- نمونه را از تابش نور و اشعه ماوراءبنفش دور نگاهدارید زیرا بیلی روبین در معرض نور شکسته می شود. نمونه ها در کمترین زمان آنالیز گردند.
- هموگلوبین بالا واکنش دی آزو را مهار و امکان منفی کاذب نتایج وجود دارد.
- رعایت ۸ ساعت ناشتایی به کسب نتایج بهتر کمک می کند.
- برای نگهداری در ۲۰ °C - حتماً دقت داشته باشید که نمونه بلافاصله فریز گردد.
- نمونه ها به مدت ۷ روز در دمای ۸-۲ °C و سه ماه در دمای ۲۰ °C - پایدار می باشند.
- از آلوده شدن نمونه ها جلوگیری شود.

نحوه آماده سازی ریجنت ها:

**ریجنت ها به صورت آماده قابل استفاده هستند.

احتیاط و نکات ایمنی:

- از بلعیدن و تماس مستقیم با پوست خودداری گردد.
- در صورت تماس با چشم با آب فراوان شسته شود.
- این کیت صرفاً برای استفاده توسط پرسنل واجد شرایط آزمایشگاه طراحی شده است.
- در مورد چگونگی دور ریختن مواد طبق قوانین تدوین شده در آزمایشگاه عمل شود.

روش انجام آزمایش:

- (۱) دستگاه فوتومتر را روشن نموده و طول موج مناسب را انتخاب کنید.
- (۲) درون کووت های مجزا 500µl ریجنت شماره ۱ را به 50µl از نمونه، کالیبراتور و کنترل اضافه و مخلوط نموده سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه نمایید.

کیت تشخیص کمی بیلی روبین مستقیم دی آزما طب

Reagent 1 (4 x 80 ml)

محتویات کیت:

Reagent 2 (1 x 80 ml)

کاربرد: تعیین کمی بیلی روبین مستقیم در سرم و پلاسما حاوی

EDTA یا هپارین در آزمایشگاه های بالینی

مقدمه: بیلی روبین (رنگدانه اصلی در صفرا) محصول اصلی کاتابولیزم هموگلوبین است. در بدن انسان دو نوع بیلی روبین وجود دارد: بیلی روبین کونژوگه و غیر کونژوگه. بیلی روبین غیر کونژوگه آزاد شدیداً غیر قطبی و نامحلول در آب است. بیلی روبین پس از تشکیل در سلول های رتیکولواندوتلیال به آلبومین متصل شده و به کبد منتقل می شود که در آنجا توسط واکنش آنزیمی گلوکورونیل ترانسفراز با گلوکورونید کونژوگه می شود. کونژوگه سازی و ترشح مؤثر بیلی روبین بستگی به عملکرد مناسب سیستم کبدی - صفراوی و میزان نوسازی و تخریب گلبول قرمز خون دارد؛ بنابراین اندازه گیری بیلی روبین غیر کونژوگه (غیر مستقیم) و کونژوگه (مستقیم) می تواند در ارزیابی عملکرد سیستم کبدی - صفراوی و خون سازی کمک کننده باشد. در نوزادان مقادیر بیلی روبین بسیار حائز اهمیت است زیرا بیلی روبین غیر کونژوگه اضافی در مغز تجمع یافته و آسیب های غیر قابل جبران ایجاد می کند.

DCA Method

اساس آزمایش:

بیلی روبین مستقیم (کونژوگه و محلول در آب) در حضور دیازوتید ۲ و ۴ دی کلرو آنیلین یک ترکیب قرمز رنگ را در محلول اسیدی تشکیل می دهد که شدت رنگ ایجاد شده متناسب با مقدار بیلی روبین سرم است. بیلی روبین غیر کونژوگه را بر اساس اختلاف میان بیلی روبین تام و مستقیم تخمین می زنند.

اجزا و غلظت معرف ها:

Reagent	concentration
Reagent 1:	
Sulfamic acid	300 mmol/L
Sodium Chloride	300 mmol/L
Reagent 2:	
2,4-Dichlorophenyl:	25 mmol/L
Sodium Nitrite	25 mmol/L
HCl	25 mmol/L

پایداری و نگهداری محصول:

- * در دمای ۸-۲ °C تا تاریخ انقضا درج شده بر روی محصول قابل استفاده می باشد.
- * یخ زدگی، قرار گرفتن در معرض نور، گرمای نامتعرف و آلودگی، باعث ناپایداری محتویات کیت می گردند.

Direct Bilirubin Quantitative Assay Kit

Model: Direct Bilirubin Photometric 2.4DCA - 400 ml Ref:1106

عوامل مداخله‌گر

جهت بررسی احتمال تداخل آنالیت‌های موجود در سرم بر روی تست بیلی‌روبین مستقیم، سرم‌های دارای مقادیر مختلف آنالیت‌های زیر مورد آزمون قرار گرفتند و تا غلظت‌های ذکر شده، این آنالیت‌ها هیچ‌گونه تأثیر مداخله-گرایانه‌ای بر نتایج این تست نداشتند.

- تری گلیسرید: عدم تداخل معنی‌دار تا غلظت 1000 mg/dL
- اسید آسکوربیک: عدم تداخل معنی‌دار تا غلظت 20 mg/dL
- همولیز: عدم تداخل معنی‌دار تا غلظت 30 mg/dL

استفاده در دستگاه اتوآنالایزر: این کیت برای استفاده با طیف وسیعی از دستگاه‌های سنجش بیوشیمی مناسب می‌باشد.

نکات:

- (۱) معرف بلانک همان ترکیب 500µl ریجنت ۱ و 50µl سرم فیزیولوژی یا آب مقطر است که بعد از خوانش اول با 125 µl ریجنت دوم مخلوط می‌شود.
- (۲) اعدادی که به‌عنوان دامنه مرجع ارائه گردیده فقط به‌عنوان یک راهنما مورداستفاده قرار می‌گیرد. نتایج به‌دست‌آمده توسط هر آزمایشگاه ممکن است برای هر اقلیم و منطقه و در شرایط خاص قابل تغییر باشد.
- (۳) ترکیباتی که برای جایگاه‌های اتصال به آلبومین رقابت می‌کنند (مانند آسپرین و پنی‌سیلین یا sulfisoxazole) موجب تداخل با بیلی‌روبین سرم می‌گردند.
- (۴) جهت کالیبراسیون و کنترل کیفی، توصیه می‌شود از کالیبراتور و سرم کنترل‌های شرکت دی‌آزما طب استفاده شود. همچنین امکان استفاده از کالیبراتور و سرم کنترل‌های سازگار با روش کیت از منابع معتبر موجود در کشور نیز وجود دارد.
- (۵) حجم معرف‌ها و نمونه را می‌توان به‌تناسب تغییر داد تا با هر نوع دستگاه سنجش بیوشیمی قابل خوانش باشد.

مراجع:

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics.
2. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd Edition W.B Saunders, 1987.
3. Laker, M. F., Clinical biochemistry. 1996
4. CLSI/NCCLS Evaluation Protocol, EP5-A, 1999

نشانه‌ها:

هشدار		شرایط نگهداری ۲-۸ درجه سلسیوس	
تاریخ انقضاء		شماره‌ساخت	LOT
تاریخ تولید		دستورالعمل استفاده	
قابل مصرف در آزمایشگاه	IVD	تولیدکننده	
		شماره‌کاتالوگ	REF

(۳) دستگاه فوتومتر را توسط معرف بلانک صفر نمایید.

(۴) خوانش اول جذب نوری (A1) را انجام دهید

(۵) سپس 125 µl از ریجنت شماره ۲ را نیز به کووت اضافه نموده و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه نمایید.

(۶) پس از آن خوانش دوم جذب نوری (A2) را انجام داده و سپس برای محاسبه از فرمول زیر استفاده کنید.

محاسبات:

$$\frac{\Delta \text{ Abs Sample}}{\Delta \text{ Abs Standard/Cal}} \times \text{C Standard/Cal} = \text{Bilirubin Direct (mg/dl)}$$

$$\text{Bilirubin Direct (mg/dl)} \times 17.1 = \text{Bilirubin Direct (\mu mol/L)}$$

دامنه مرجع:

مقادیر نرمال بیلی‌روبین مستقیم یا کونژوگه $0.3 \text{ mg/dl} \leq$ می‌باشد.

نتایج عملکردی و کارایی کیت:

خطی بودن: با این روش مقدار بیلی‌روبین مستقیم تا 8.0 mg/dl خطی اندازه‌گیری می‌شود. نمونه‌های با غلظت بالاتر از 8 mg/dl را به نسبت ۱ واحد نمونه با ۲ واحد سرم فیزیولوژی رقیق نموده و جواب‌ها را در عدد ۳ ضرب نمایید.

حساسیت: حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری 0.15 mg/dl می‌باشد.

دقت: تکرارپذیری با استفاده از نمونه‌های انسانی تعیین و نتایج زیر به دست آمد:

Serum Bilirubin Direct mean (mg/dl)	Within-run (CV%)	Between-run (CV%)
0.73	1.59	1.94
1.69	0.72	1.01
0.26	2.71	2.91
0.76	1.44	2.44
	n ¹ =40 replicate	n ¹ =4 runs

مقایسه روش‌ها:

در مقایسه انجام‌شده جهت ارزیابی کیت بیلی‌روبین مستقیم شرکت دی‌آزما طب (Y) با یکی از متداول‌ترین کیت‌های بیلی‌روبین مستقیم با متد یکسان (X) بر روی ۴۴ نمونه بیمار نتیجه زیر به دست آمد:

$$Y = 1,0034x + 0.0215, \quad r^2 = 0.9994$$