

Fluitest® BIL direct DCA

BILIRUBIN, DCA METHOD



Order information:

| Catalog No. | Contents | | | | | |
|---------------------|----------|-----|-------|----|-----|-------|
| 3348 | R1 | 5 x | 20 ml | R2 | 1 x | 20 ml |
| H3351 Hit I (ILab*) | R1 | 6 x | 47 ml | R2 | 6 x | 11 ml |

(*) Kit contains only reagent barcode for Hitachi system.

System information:

Hitachi 911: ACN 269
For application on the Hitachi 912, please use an open system or contact the Analyticon Customer Support.

Intended use:

Quantitative determination of direct bilirubin in serum, heparinized plasma or EDTA plasma by DCA method.

Summary:

80-85% of bilirubin originates on degradation of hemoglobin with the other 15-20% being derived from cytochrome, myoglobin and catalases. Unconjugated bilirubin, which binds to plasma albumin, is produced in the course of degradation in the reticuloendothelial system, liver Kupffer cells, spleen and bone marrow. Unconjugated (primary, indirect, water-insoluble) bilirubin is soluble in lipids and toxic. With the aid of the glucuronyl transferase enzyme, bilirubin is conjugated primarily by glucuronic acid in the microsomes of hepatic parenchymal cells. In contrast to unconjugated bilirubin, conjugated (secondary, direct) bilirubin is soluble in water, and is excreted via the kidneys. Bilirubin assays are suitable for evaluating the degree of severity of icteric clinical symptoms as well as for monitoring and objectively assessing these symptoms. Distinguishing between direct and indirect bilirubin is a valuable aid in the differential diagnosis of different forms of jaundice. A direct bilirubin value of < 20 % total bilirubin is an indicator of jaundice of pre-hepatic origin. This value can increase to > 50 % in hepatic and post-hepatic jaundice.

Test principle:

Colorimetric test with stabilized dichloraniline (DCA)

- Sample and addition of R1
- Addition of R2 (DCA) and start of the reaction: Stabilized diazonium salt (DCA) reacts in acidic medium with bilirubin to form an azobilirubin (red dye). In the direct bilirubin assay, only conjugated bilirubin reacts.



The color intensity of the red azo dye formed is directly proportional to the direct (conjugated) bilirubin concentration and can be determined photometrically.

Reagents – contents and concentrations:

| | |
|----------------------|-------------|
| R1: | |
| EDTA-Na ₂ | 0,07 mmol/l |
| Sodium chloride | 6,6 g/l |
| Sulfamic acid | 70 mmol/l |

| | |
|----------------------------------|-------------|
| R2: | |
| 2,4-Dichlorophenyl-Diazoniumsalt | 0,09 mmol/l |
| HCl | 130 mmol/l |
| EDTA-Na ₂ | 0,02 mmol/l |

Preparation and stability:

R1 ready for use.
R2 ready for use.
(Un)opened kit components: Up to the expiration date at +2 to +8°C
Avoid contamination. Do not freeze! Protect reagent 2 from light

Specimen:

Fresh serum, heparinized plasma or EDTA plasma.
Keep out of light and protect the sample from the effects of sunlight.
Perform the assay immediately.
Stability: 2 days at +18 to +25°C
7 days at +2 to +8°C
3 month at < -20°C freeze immediately and only once!
Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay.

Note:

For in vitro diagnostic use.
The material safety data sheet contains further safety-related information. It is available for download from our homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com>.
Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Limitations - interference:

Lipemia (Intralipid): No significant interference up to an index L of 500 (approximate triglycerides concentration: 1000 mg/dl). There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.
Hemolysis: No significant interference up to an index H of 50 (approximate hemoglobin concentration: 50 mg/dl).
Ascorbic acid: No significant interference up to an index A of 30 (approximate ascorbic acid concentration: 30 mg/dl).
The effect of drugs or their metabolic products on the test is not known in all cases. In case of doubt it is recommended to repeat the test after the medication has been discontinued. However, the medication may only be discontinued according to instructions of the attending physician.

Testing procedure:

Applications for automated systems are available on request.

Materials provided

- Working solutions as described above
- Additional materials required
- Calibrators and controls as indicated below
- 0.9% NaCl

Manual procedure:

Wavelength: 546 nm (540-560 nm)
Temperature: +25 / +37°C
Cuvette: 1 cm light path
Zero adjustment: against reagent blank

| | Blank | Sample / Calibr. |
|---------------------|---------|------------------|
| Sample / Calibrator | --- | 100 µl |
| Aqua dest. | 100 µl | --- |
| R1 | 1000 µl | 1000 µl |

Mix, incubate for 3–5 min. at assay temperature, read initial absorbance A₁, then add:

| | | |
|----|--------|--------|
| R2 | 200 µl | 200 µl |
|----|--------|--------|

Mix and incubate exactly 5 minutes at 37°C or 10min at 20–25°C. Then read absorbance A₂.

Calculation:

$$\Delta A = (A_2 - A_1) \text{Sample/Calibrator} - (A_2 - A_1) \text{Blank}$$

$$\frac{\Delta A \text{ sample}}{\Delta A \text{ calibrator}} \times \text{calibrator conc.} = \text{direct bilirubin in mg/dl}$$

Measuring /reportable range:

Up to 10 mg/dl (171 µmol/l)
Determine samples having higher concentrations via the rerun function. On instruments without rerun function dilute manually with 0.9% NaCl or distilled/deionized water (e.g. 1 + 1). Multiply the result by the appropriate dilution factor (e.g. factor 2).

Expected values in serum:

Direct bilirubin: < 0.2 mg/dl (3.4 µmol/l)

Analytical sensitivity (lower detection limit):

0.1 mg/dl (1.71 µmol/l)
The lower detection limit represents the lowest measurable Bilirubin concentration that can be distinguished from zero.

Imprecision:

Reproducibility was determined using controls in an internal protocol within (between day n = 20). The following results were obtained:

| Sample | Between day | | |
|----------|--------------|------------|------|
| | Mean (mg/dl) | SD (mg/dl) | CV % |
| Sample 1 | 0.35 | 0.01 | 3.34 |
| Sample 2 | 0.75 | 0.01 | 1.00 |
| Sample 3 | 2.13 | 0.02 | 0.71 |

| Sample | Within run | | |
|----------|--------------|------------|------|
| | Mean (mg/dl) | SD (mg/dl) | CV % |
| Sample 1 | 0.36 | 0.01 | 3.12 |
| Sample 2 | 0.76 | 0.01 | 1.46 |
| Sample 3 | 2.07 | 0.03 | 1.30 |

Method comparison:

A comparison of the Analyticon Fluitest BIL-Direct DCA (y) with a commercial obtainable assay (x) gave the following result:

$$y = 0.95x + 0,04; \quad r = 0.995$$

Quality Control:

| | | |
|---------------------|-----------|-------|
| Human Control Serum | | |
| Contronorm® Plus | 5 x 5 ml | #1205 |
| | 20 x 5 ml | #1220 |
| Controptath® Plus | 5 x 5 ml | #1305 |
| | 20 x 5 ml | #1320 |

The control intervals and limits must be adapted to the individual laboratory and country-specific requirements. Values obtained should fall within established limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits.

Fluitest[®] BIL direct DCA

BILIRUBIN, DCA METHOD



Calibration:

Multicalibrator

| | | |
|------------|-----------|-------|
| Bio Cal® | 20 x 3 ml | #1420 |
| Bio Cal® E | 10 x 3 ml | #1430 |

Text passages with grey background were changed in the latest revision of this package insert.

Literature:

1. Thomas L ed. Clinical Laboratory Diagnostics, 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsges, 1998:192-202.
2. 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.
3. Rand RN, di Pasqua A. A new diazo method for the determination of bilirubin. Clin Chem 1962;6:570-8



Fluitest® BIL direct DCA

BILIRUBIN, DCA METHODE



Bestellinformation:

| Katalog-Nr. | Inhalt |
|---------------------|-----------------------------|
| 3348 | R1 5 x 20 ml R2 1 x 20 ml |
| H3351 Hit I (ILab*) | R1 6 x 47 ml R2 6 x 11 ml |

(*) Kit enthält nur Reagenzien-Barcodes für Hitachi-Systeme.

Systeminformation:

Hitachi 911: ACN 269
Für die Benutzung am Hitachi 912 verwenden Sie bitte ein offenes System oder wenden Sie sich an den Analyticon Kundensupport.

Anwendungszweck:

Quantitative Bestimmung von direktem Bilirubin in Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma nach der DCA-Methode.

Zusammenfassung:

Bilirubin entsteht zu 80-85% beim Abbau von Hämoglobin und zu 15-20% aus Cytochromen, Myoglobin und Katalasen. Beim Abbau im retikuloendothelialen System, den Kupfer'schen Sternzellen der Leber, in der Milz und im Knochenmark wird unkonjugiertes Bilirubin gebildet und dann an Plasmaalbumin gebunden. Unkonjugiertes (primäres, indirektes, wasserunlösliches) Bilirubin ist lipidlöslich und toxisch. In den Mikrosomen der Leberparenchymzellen wird es unter Beteiligung des Enzyms Glucuronyltransferase überwiegend mit Glucuronsäure konjugiert. Konjugiertes (sekundäres, direktes) Bilirubin ist im Gegensatz zur unkonjugierten Form wasserlöslich und kann über die Nieren ausgeschieden werden. Die Bestimmung von Bilirubin ist geeignet zur Erfassung des Schweregrades und des Verlaufs sowie zur Objektivierung des klinischen Symptoms „Ikterus“. Die Unterscheidung von direktem und indirektem Bilirubin trägt zur Differentialdiagnose der Iktusformen bei. Ein Anteil des direkten Bilirubins deutet auf eine prähepatische Ursache des Iktus hin, während bei hepatischer und posthepatischer Gelbsucht dieser Anteil auf über 50% ansteigen kann.

Testprinzip:

Farbtest mit stabilisiertem Dichloranilin-Derivat (DCA).

- Probe und Zugabe von R1
- Zugabe von R2 (DCA) und Start der Reaktion:
Stabilisiertes Diazoniumsalz (DCA) reagiert mit Bilirubin zu einem Azobilirubin (roter Farbstoff). Im direkten Bilirubintest reagiert nur konjugiertes Bilirubin.



Die Farbintensität des gebildeten roten Azofarbstoffs ist direkt proportional zur direkten (konjugierten) Bilirubinkonzentration und wird photometrisch gemessen.

Konzentration der Reagenz:

| | |
|----------------------|-------------|
| R1: | |
| EDTA-Na ₂ | 0,07 mmol/l |
| NaCl | 6,6 g/l |
| Sulfaminsäure | 70 mmol/l |

| | |
|---------------------------------|-------------|
| R2: | |
| 2,4-Dichlorphenyl-Diazoniumsalz | 0,09 mmol/l |
| HCl | 130 mmol/l |
| EDTA-Na ₂ | 0,02 mmol/l |

Herstellung und Haltbarkeit:

R1 ist gebrauchsfertig.
R2 ist gebrauchsfertig.
Haltbarkeit der (un)geöffneten Komponenten: bei +2°C - +8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum.
Kontamination vermeiden. Reagenzien nicht einfrieren! Reagenz 2 vor Licht schützen.

Hinweis:

In vitro Diagnostikum.
Weitere sicherheitsrelevante Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten. Dieses steht auf unserer Homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com> zum Download bereit.
Die beim Umgang mit Laborreagenzien üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten

Einschränkung des Verfahrens - Interferenzen:

Lipämie (Intralipid): Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 500 (ca. 1000 mg/dl Triglyceride).
Hämolyse: Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 50 (ca. 50 mg/dl Hämoglobin).
Ascorbinsäure: Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index A von 30 (ca. 30 mg/dl Ascorbinsäure).
Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.
Die Auswirkung von Medikamenten oder deren Metaboliten auf den Test ist nicht in allen Fällen bekannt. Im Zweifelsfall wird deshalb empfohlen, den Test nach Absetzen der Medikation zu wiederholen. Ein Absetzen der Medikation darf allerdings nur nach Anweisung des behandelnden Arztes erfolgen.

Untersuchungsgut:

Frisches Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma.
Probe vor Licht und Sonneneinstrahlung schützen.
Bestimmung sofort durchführen.
Haltbarkeit: 2 Tage bei +18 bis +25°C
7 Tage bei +2 bis +8°C
3 Monate bei < -20°C sofort und nur einmal einfrieren!

Proben, die Präzipitate enthalten, müssen vor dem Test zentrifugiert werden.

Testverfahren:

Anwendungen für automatisierte Systeme sind auf Anfrage erhältlich.

Delivered Materials

- Gebrauchsfertige Lösungen wie vorher angegeben.
- Zusätzlich benötigte Materialien**
- Kalibrations- und Kontrollmaterial wie nachfolgend beschrieben
- Natriumchlorid-Lösung (0,9%)

Manuelle Testdurchführung:

| | |
|---------------|---------------------|
| Wellenlänge: | 546 nm (540-560 nm) |
| Temperatur: | +25 / +37°C |
| Schichtdicke: | 1 cm |
| Messung: | Reagenzienleerwert |

| Probe / Kalibrator | Leerwert | Probe / Kalibr. |
|--------------------|----------|-----------------|
| Aqua dest. | 100 µl | --- |
| R1 | 1000 µl | 1000 µl |

Mischen und für 3–5 min. inkubieren. Extinktion E₁ ablesen, dann zugeben:

| | | |
|----|--------|--------|
| R2 | 200 µl | 200 µl |
|----|--------|--------|

Mischen und exakt 5 Minuten bei 37°C oder 10 min bei 20–25°C inkubieren. Dann Extinktion E₂ ablesen.

Berechnung:

$$\Delta E = (E_2 - E_1) \text{Probe} / \text{Kalibrator} - (E_2 - E_1) \text{RLW}$$

$$\Delta E \text{ Probe} \quad \text{---} \quad \text{X Kalibrator Konz.} = \text{direktes Bilirubin in mg/dl}$$
$$\Delta E \text{ Kalibrator}$$

Messbereich:

Bis 10 mg/dl (171 µmol/l)
Bei höheren Konzentrationen werden die Proben mit Rerun Funktion bestimmt oder manuell 1 + 1 mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. Die Analyse wird wiederholt und das Ergebnis mit 2 multipliziert.

Normalwerte im Serum:

Direktes Bilirubin bis 0,20 mg/dl bzw. 3,4 µmol/l

Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

0,1 mg/dl (1,71 µmol/l)
Die Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten messbaren Bilirubinkonzentration, die von Null unterschieden werden kann.

Impräzision:

Die Reproduzierbarkeit wurde mit Kontrollproben bestimmt und ergab folgende Ergebnisse:

| | Tag / Tag | | |
|---------|------------|------------|------|
| Probe | MW (mg/dl) | SD (mg/dl) | VK % |
| Probe 1 | 0,35 | 0,01 | 3,34 |
| Probe 2 | 0,75 | 0,01 | 1,00 |
| Probe 3 | 2,13 | 0,02 | 0,71 |

| | In der Serie | | |
|---------|--------------|------------|------|
| Probe | MW (mg/dl) | SD (mg/dl) | VK % |
| Probe 1 | 0,36 | 0,01 | 3,12 |
| Probe 2 | 0,76 | 0,01 | 1,46 |
| Probe 3 | 2,07 | 0,03 | 1,30 |

Methodenvergleich:

Bei einem Vergleich von Analyticon Fluitest BILI-T/D (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden folgende Ergebnisse erhalten:
 $y = 0,95 x + 0,04$; $r = 0,995$

Fluitest® BIL direct DCA

BILIRUBIN, DCA METHODE



Qualitätskontrolle:

Humane Kontrollseren:

| | | |
|------------------|-----------|-------|
| Contronorm® Plus | 5 x 5 ml | #1205 |
| | 20 x 5 ml | #1220 |
| Contropath® Plus | 5 x 5 ml | #1305 |
| | 20 x 5 ml | #1320 |

Die Kontrollintervalle und Kontrollgrenzen sind den individuellen Anforderungen jedes Labors und den länderspezifischen Richtlinien anzupassen. Die Ergebnisse müssen innerhalb der festgesetzten Bereiche liegen. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall beschreiben, dass Werte außerhalb des Bereichs liegen.

Kalibration:

Multikalibrator

| | | |
|-----------|-----------|-------|
| BioCal® | 20 x 3 ml | #1420 |
| BioCal® E | 10 x 3 ml | #1430 |

Grau hinterlegte Textpassagen wurden in der letzten Überarbeitung dieser Gebrauchsanweisung geändert.

Literatur:

1. Thomas L ed. Clinical Laboratory Diagnostics, 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsges, 1998:192-202.
2. 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.
3. Rand RN, di Pasqua A. A new diazo method for the determination of bilirubin. Clin Chem 1962;6:570-8

