

# Fluitest® BIL direct

## BILIRUBIN JENDRASSIK/GRÓF METHOD



### BioLyzer® Order information:

Catalog No.	BioLyzer	Contents
B3301	200 / 600	R1 6 x 100 ml
		R2 4 x 40 ml
		R3 4 x 8 ml
B3333	300 / 600*	R1 5 x 47 ml
		R2 5 x 12 ml
		R3 5 x 3 ml

\*only for instruments with a reagent tray for 20 / 70ml bottles

### Intended use:

Quantitative determination of direct bilirubin in serum, heparinized plasma or EDTA plasma by the Jendrassik-Gróf 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:

Jendrassik-Gróf method

In the presence of caffeine accelerator, total bilirubin couples with sulfanilic acid to form a red azobilirubin dye. The color intensity is proportional to the bilirubin concentration. Determination of direct bilirubin is performed without caffeine additive.

### Reagents – contents and concentrations:

<b>R1:</b>	
Sodium chloride	150 mmol/l
Preservative	
<b>R2:</b>	
Sulfanilic acid	29 mmol/l
HCl	0.17 N
<b>R3:</b>	
Sodium nitrite	25 mmol/l

### Preparation and stability:

R1 is ready for use.

Stability of R1: 99 days at 2-8°C Protect from light.

Working reagent:

Prepare working reagent by pouring the content of bottle R3 into R2. Mix, the resulting reagent is ready to use.

Stability of working reagent: 5 days at 2-8°C Protect from light.

Unopened kit components: Up to the expiration date at 2-8°C

Close bottles after use.

### Specimen:

Fresh serum, heparinized plasma or EDTA plasma. Hemolysis interferes with the test.

Keep out of light and protect the sample from the effects of sunlight. Perform the assay immediately.

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:

Criterion: Recovery within ±10% of initial value.

Hemolysis: No significant interference up to an H index of 13 (approximate haemoglobin concentration: 13 mg/dl).

Lipemia (Intralipid): No significant interference up to an L index of 100 (approximate triglycerides concentration: 200 mg/dl). There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.

Protect samples from light to avoid false low values.

Hepatotoxic drugs which cause cholestasis and haemolysis produce elevated recoveries.

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:

Materials provided

• Working solutions as described above

Additional materials required

• Calibrators and controls as indicated below

• 0.9% NaCl

### Measuring /reportable range:

0.1 – 6.0 mg/dl (1.7 – 102 µmol/l)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function using 0.9% NaCl solution as diluents.

### Expected values in serum:

Direct bilirubin: < 0.25 mg/dl (4.3 µmol/l)

### Analytical sensitivity (lower detection limit):

0.01 mg/dl (0.17 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	Run to run		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	1.02	0.039	3.8
Sample 2	13.0	0.322	2.47

Sample	Within run		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	1.00	0.009	0.9
Sample 2	2.60	0.025	1.0
Sample 3	2.85	0.025	0.9

### Method comparison:

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

$$y = 0.9433x - 0.0984; \quad r = 0.9934$$

### Quality Control:

Human Control Serum

Contronorm® Plus 5 x 5 ml #1205

20 x 5 ml #1220

ControPath® 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.

### Calibration:

Calibration Type: Linear

S1: 0.9% NaCl

S2: Bio Cal® E 10 x 3 ml #1430

### Calibration frequency:

Two point calibration is recommended;

- Daily of working reagent
- after lot change
- as required following quality control procedures

### Literature:

- Silbernagel S, Despopoulos A. Physiologie für die Praxis, Medica 1983; 4 ; 492 – 495
- Thomas L. Labor und Diagnose, Marburg: Med Verlagsges, 1984.
- Thaler H. Bilirubin: Ein Wegwerfprodukt bleibt weiter aktuell. Dt. med Wschr 1984; 109:283 - 284
- Stiehl A. Hyperbilirubinämie bei Lebererkrankungen. Fortschr Med 1982; 100:842-845
- Schmidt E, Schmidt FW. Diagnostik des Icterus. Dt med Wschr 1984;109:139-144
- Jendrassik L et al. Biochem Z 1938;297:81.
- Schellong G, Wende U. Technik für die Eichung von Methoden zur Serumbilirubin-Bestimmung. Klin Wschr 1960;38:703.
- Richter R. Klinische Chemie, 3<sup>rd</sup> ed. Basel: Karger Verlag, 1971:450-452.
- Sherlock S. Liver Disease. London: Churchill, 1951:204.
- Malloy HT, Evelyn KA. J Biol Chem 1937;119:481.

### BioLyzer® Bestellinformation:

Katalog-Nr.	BioLyzer	Inhalt
B3301	200 / 600	R1 6 x 100 ml
		R2 4 x 40 ml
		R3 4 x 8 ml
B3333	300 / 600*	R1 5 x 47 ml
		R2 5 x 12 ml
		R3 5 x 3 ml

\*nur für Instrumente mit Reagenzteller für 20 / 70ml Flaschen

### Anwendungszweck:

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

### 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 Kupffer'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 Ikterusformen bei. Ein Anteil des direkten Bilirubins deutet auf eine prähepatische Ursache des Ikterus hin, während bei hepatischer und posthepatischer Gelbsucht dieser Anteil auf über 50% ansteigen kann.

### Testprinzip:

Methode nach Jendrassik-Gróf

Gesamt-Bilirubin wird in Gegenwart von Coffein als Akzelerator mit diazotierter Sulfanilsäure zu rotem Azobilirubin gekoppelt, dessen Farbintensität proportional der Bilirubinkonzentration ist. Die Bestimmung des „Direkten“ Bilirubins erfolgt ohne Koffeinzusatz.

### Konzentration der Reagenzien:

<b>R1:</b>	
Natriumchlorid	150 mmol/l
Konservierungsmittel	
<b>R2:</b>	
Sulfanilsäure	29 mmol/l
HCl	0,17 N
<b>R3:</b>	
Natriumnitrit	25 mmol/l

### Herstellung und Haltbarkeit:

Lösung R1 ist gebrauchsfertig.

Stabilität R1: 99 Tage bei 2-8°C Lichtgeschützt lagern

Herstellung des Arbeitsreagenz: Inhalt von Flasche R3 in Flasche R2 gießen.

Stabilität Arbeitsreagenz: 5 Tage bei 2-8°C Lichtgeschützt lagern

Haltbarkeit der ungeöffneten Komponenten: bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum.

Flaschen nach Gebrauch verschließen.

### Untersuchungsgut:

Frisches Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma.

Hämolyse stört. Lipämische Seren können nicht verwendet werden.

Probe vor Licht und Sonneneinwirkung schützen. Bestimmung sofort durchführen.

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

### 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:

Als Bewertung gilt: Wiederfindung ± 10% vom Ausgangswert.

Hämolyse: Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 13 (ca. 13 mg/dl Hämoglobin).

Lipämie (Intralipid): Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 100 (ca. 200 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.

Belichtung der Proben führt ebenfalls zu niedrigeren Messwerten, daher vor Licht schützen.

Lebertoxische Medikamente, die Cholestase und Hämolyse verursachen bewirken erhöhte Wiederfindungen.

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.

### Testverfahren:

Gelieferte Materialien

• Gebrauchsfertige Lösungen wie vorher angegeben.

Zusätzlich benötigte Materialien

Kalibrations- und Kontrollmaterial wie nachfolgend beschrieben.

• Natriumchlorid-Lösung (0,9%)

### Messbereich:

0,1 – 6,0 mg/dl (1,7 – 102 µmol/l)

Proben mit höheren Aktivitäten werden über eine Rerun-Funktion mit NaCl-Lösung (0,9%) bestimmt.

### Normalwerte im Serum:

Direktes Bilirubin bis 0,25 mg/dl bzw. 4,3 µmol/l

### Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

0,01 mg/dl (0,17 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:

Probe	Tag / Tag		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	1,02	0,039	3,8
Probe 2	13,0	0,322	2,47

Probe	In der Serie		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	1,00	0,009	0,9
Probe 2	2,60	0,025	1,0
Probe 3	2,85	0,025	0,9

### Methodenvergleich:

Bei einem Vergleich von Analyticon Fluitest® BILI-T/D (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden folgende Ergebnisse erhalten:

y = 0,9433x - 0,0984; r = 0,9934

### Qualitätskontrolle:

Humane Kontrollseren:

Contronorm® Plus	5 x 5 ml	#1205
	20 x 5 ml	#1220
Controptath® 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:

Kalibrations Typ: Linear

S1: 0,9% NaCl

S2: Bio Cal® E 10 x 3 ml #1430

### Kalibrationshäufigkeit:

Eine Zweipunkt-Kalibration wird empfohlen:

- Täglich des Arbeitsreagenzes
- nach Chargenwechsel
- wenn Qualitätskontrollverfahren dies erfordern

### Literatur:

1. Silbernagel S, Despopoulos A. Physiologie für die Praxis, Medical 1983; 4 : 492 – 495
2. Thomas L. Labor und Diagnose, Marburg: Med Verlagsges, 1984.
3. Thaler H. Bilirubin: Ein Wegwerfprodukt bleibt weiter aktuell. Dt. med Wschr 1984; 109:283 - 284
4. Stiehl A. Hyperbilirubinämie bei Lebererkrankungen. Fortschr Med 1982; 100:842-845
5. Schmidt E, Schmidt FW. Diagnostik des Ikterus. Dt med Wschr 1984;109:139-144
6. Jendrassik L et al. Biochem Z 1938 ;297 :81.
7. Schellong G, Wende U. Technik für die Eichung von Methoden zur Serumbilirubin-Bestimmung. Klin Wschr 1960;38:703.
8. Richter R. Klinische Chemie, 3rd ed. Basel: Karger Verlag, 1971:450-452.
9. Sherlock S. Liver Disease. London: Churchill, 1951:204.
10. Malloy HT, Evelyn KA. J Biol Chem 1937;119:481.

## How to handle extra bottle labels for R2

For the Bilirubin direct test a working solution has to be prepared prior to use by mixing R2 and R3. This working solution has a stability of 5 days.

To ensure that the total volume of reagent can be used even at low sample throughput, the volume of R2 can be divided into half and additional bottle labels for R2 are provided with the kit.

Mix half of the volume of R2 and R3 in an extra system bottle and put one R2 label on the bottle. Prepare the next working solution by pouring the remaining R3 into the remaining bottle of R2 (this bottle already has the appropriate barcode).

## Handhabung der zusätzlichen Etiketten für R2

Für den Bilirubin direkt Test muss vor der Verwendung ein Arbeitsreagenz hergestellt werden indem R2 und R3 gemischt werden. Dieses Arbeitsreagenz ist 5 Tage stabil.

Um sicherzustellen, dass das gesamte Reagenz auch bei niedrigem Probendurchsatz aufgebraucht werden kann, ist es möglich die Volumina von R2 und R3 zu halbieren. Zusätzliche Etiketten für R2 liegen der Packung bei.

Mischen Sie das halbe Volumen R2 und R3 in einer zusätzlichen Systemflasche und kleben Sie ein R2-Etikett auf die Flasche. Für das nächste Arbeitsreagenz gießen Sie die verbliebene Hälfte R3 in die Flasche mit der verbliebenen Hälfte R2 (auf dieser Flasche befindet sich bereits das entsprechende Etikett).