

# Fluitest® BIL direct

## BILIRUBIN WALTERS/GERARDE METHOD



### Order information:

Catalog-No.	Contents					
803	R1	2 x	100 ml	R2	1 x	10 ml

### Intended use:

In vitro test for the quantitative determination of direct bilirubin in human serum and plasma by the Walters/Gerarde 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:

Walters/Gerarde Method

The azobilirubin produced by the reaction between bilirubins and the diazonium salt of sulfanilic acid shows maximum absorption at 555 nm in an acid medium. The intensity of the colour produced is proportional to the quantity of bilirubin which has reacted. In the absence of an accelerator, only conjugated bilirubins react. In the presence of an accelerator, the dimethylsulphoxide (DMSO), the non-conjugated bilirubin also participate in the reaction, thus to determine the level of total bilirubin.

### Reagents – contents and concentrations:

<b>R1:</b>	
Sulfanilic acid	29 mmol/l
HCl	0.17 N
<b>R2:</b>	
Sodium nitrite	17.1 mmol/l

### Preparation and stability:

R1: ready for use.

R2: ready for use.

Stability: at +2°C to +8°C up to the expiry date

Always keep bottles tightly closed and away from light.

### Specimen:

Fresh serum, heparinized plasma or EDTA plasma.

Hemolysis interferes with the test. Don't use lipaemic sera.

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

Perform the test 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:

Hemolysis: Elevated levels of haemoglobin may interfere.

Lipemia (Intralipid): Elevated levels of triglycerides may interfere. There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.

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.

### Measuring /reportable range:

Up to 10 mg/dl (171 µmol/l)

In case of higher results, dilute sample 1:2 with NaCl solution and repeat test. Multiply result by 2.

### Normal Values:

Serum: Up to 0.20 mg/dl (3.42 µmol/l):

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference range.

### Analytical sensitivity (lower detection limit):

0.01 mg/dl or 0.17 µmol/l

The lower detection limit represents the lowest measurable Bilirubin concentration that can be distinguished from zero.

### 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:	Hg 555 nm (530 – 580 nm)	
Temperature:	+25°C or +37°C	
Cuvette:	1 cm	
Zero adjustment:	against reagent blank	

	Sample blank	Sample
R1	1000 µl	1000 µl
R2	-----	50 µl
Sample	100 µl	100 µl

Mix and incubate at room temperature for 5 minutes or 4 minutes at +37°C. Read absorbance of sample against sample blank

### Calculation:

$$\frac{\Delta E \text{ sample}}{\Delta E \text{ calibrator}} \times \text{calibrator conc.} = \text{bilirubin conc.}$$

### Imprecision:

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

within run			
Sample	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	0.43	0.013	3.02
Sample 2	0.75	0.015	2.00
Sample 3	1.89	0.016	0.85

between day			
Sample	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	0.75	0.022	2.93
Sample 2	1.96	0.040	2.04
Sample 3	2.56	0.047	1.94

### Method comparison:

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

$$y = 0.992x + 0.032; \quad r = 0.996$$

### 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.

### Calibration:

S1: 0.9% NaCl		
S2: Bio-Cal®	20 x 3 ml	#1420
Bio-Cal® E	10 x 3 ml	#1430

### Literature:

Walters M., Gerarde H., Microchem., J., 1970: 15; 231-243



### Bestellinformation:

Katalog-Nr.	Inhalt
803	R1 2 x 100 ml   R2 1 x 10 ml

### Anwendungszweck:

In vitro Test zur quantitativen Bestimmung von direktem Bilirubin im Humanserum und -plasma nach der Methode von Walters/Gerarde.

### 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 Ikterusformen bei. Ein Anteil von < 20% des gesamten Bilirubins deutet auf eine prähepatische Ursache des Ikterus hin, während bei hepatischer und posthepatischer Gelbsucht dieser Anteil auf über 50% ansteigen kann.

### Testprinzip:

Walters/Gerarde Methode

Direktes Bilirubin reagiert mit diazotierter Sulfanilsäure zu Azobilirubin, welches ein Absorptionsmaximum bei 555nm im sauren Medium besitzt. Die Farbintensität ist proportional zur umgesetzten Bilirubinmenge. In Abwesenheit eines Aktivators reagiert nur konjugiertes Bilirubin. In Anwesenheit des Aktivators, Dimethylsulphoxid (DMSO), nimmt auch das unkonjugierte Bilirubin an der Reaktion teil und ermöglicht damit die Bestimmung des Gesamt Bilirubin.

### Konzentration der Reagenzien:

<b>R1:</b>	
Sulfanilsäure	29 mmol/l
HCl	0,17 N
<b>R2:</b>	
Natriumnitrit	17,1 mmol/l

### Herstellung und Haltbarkeit:

R1: Gebrauchsfertig.

R2: Gebrauchsfertig.

Haltbarkeit: bei +2°C bis +8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum.

Flasche stets geschlossen halten und vor Licht schützen.

### Untersuchungsgut:

Frisches Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma.

Hämolyse stört den Test. Lipämische Seren können nicht verwendet werden.

Tests sofort durchführen.

Die Proben vor Licht- und Sonneneinwirkung schützen.

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:

Hämolyse: Erhöhte Hämoglobin-Konzentrationen können die Messwerte beeinflussen.

Lipämie: Erhöhte Triglycerid-Konzentrationen können die Messwerte beeinflussen. Es besteht keine zufrieden stellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglycerid-Konzentration.

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.

### Messbereich:

Bis 10 mg/dl (171 µmol/l)

Bei höheren Konzentrationen wird die Probe 1:2 mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. Die Analyse wird wiederholt und das Ergebnis mit 2 multipliziert.

### Normalwerte:

Serum: bis 0,20 mg/dl (3,42 µmol/l)

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

### Testverfahren:

Anwendungen für automatisierte Systeme sind auf Anfrage erhältlich.

#### Delieferte Materialien

• Gebrauchsfertige Lösungen wie vorher angegeben.

#### Zusätzlich benötigte Materialien

Kalibrations- und Kontrollmaterial wie nachfolgend beschrieben.

• Natriumchlorid-Lösung (0,9%)

Testdurchführung:		
Wellenlänge:	Hg 555 nm (530 – 580 nm)	
Reaktionstemperatur:	+25°C oder +37°C	
Schichtdicke:	1 cm	
Messung:	gegen Probenleerwert	
	Probenleerwert	Probe
R1	1000 µl	1000 µl
R2	-----	50 µl
Probe	100 µl	100 µl
Mischen und 5 Minuten bei RT oder 4 Minuten bei +37°C inkubieren. Extinktion der Probe gegen Probenleerwert messen.		
Berechnung:		
$\frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Kalibrator}} \times \text{Kalibratorkonz.} = \text{Bilirubinkonz.}$		

### Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

0,01 mg/dl bzw. 0,17 µmol/l

Die Nachweisgrenze entspricht der niedrigsten messbaren Bilirubinkonzentration, die von Null unterschieden werden kann.

### Imprecision:

Die Reproduzierbarkeit wurde mit Kontrollproben bestimmt und ergab folgende Ergebnisse (n=20):

Probe	In der Serie		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	0,43	0,013	3,02
Probe 2	0,75	0,015	2,00
Probe 3	1,89	0,016	0,85

Probe	Tag / Tag		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	0,75	0,022	2,93
Probe 2	1,96	0,040	2,04
Probe 3	2,56	0,047	1,94

### Methodenvergleich:

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

$$y = 0,992 x + 0,032 ; r = 0,996$$

### 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:

S1: 0,9% NaCl		
S2: Bio-Cal®	20 x 3 ml	#1420
Bio-Cal® E	10 x 3 ml	#1430

### Literatur:

Walters M., Gerarde H., Microchem., J., 1970: 15; 231-243

