

# Fluitest® BIL total DCA

BILIRUBIN, DCA METHODE



## Order information:

Catalog No.	Contents						
3248	R1	5 x	20 ml	R2	1 x	20 ml	
H3251	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 042  
For application on the Hitachi 912, please use an open system or contact the Analyticon Customer Support.

## Intended use:

Quantitative determination of total 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). Because of a special detergent mix both conjugated and unconjugated bilirubin participate in the reaction.



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

## Reagents – contents and concentrations:

<b>R1:</b>	
Phosphate buffer	40 mmol/l
Sodium chloride	9 g/l
Detergents and stabilizers	
<b>R2:</b>	
2,4-Dichlorophenyl-Diazoniumsalt	1,0 mmol/l
HCl	30 mmol/l
Detergent	

## 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 - 25°C

7 days at +2 - 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:

Hemolysis: No significant interference up to an index H of 500 (approximate hemoglobin concentration: 500 mg/dl).

Ascorbic acid: No significant interference up to an index A of 30 (approximate ascorbic acid concentration: 30 mg/dl).

Lipemia (Intralipid): No significant interference up to an index L of 1000 (approximate triglycerides concentration: 2000 mg/dl). 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.

## 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 sample blank	

Sample / Calibrator	Blank	Sample / Calibr.
Aqua dest.	50 µl	---
R1	1000 µl	1000 µl

Mix, incubate for 5 min. at +37°C or 10 min. at +20-25°C. 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:

$$\Delta A = (A2-A1) \text{Sample/Calibrator} - (A2-A1) \text{Blank}$$

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

## Measuring /reportable range:

Up to 30 mg/dl (513 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:

Adults:	0.1 – 1.2 mg/dl	(1.7 – 21 µmol/l)
Children >1 month:	0.2 – 1.0 mg/dl	(3.4 – 17 mol/l)

## Analytical sensitivity (lower detection limit):

0.07 mg/dl (1.197 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:

Between day			
Sample	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	0.87	0.02	2.74
Sample 2	1.15	0.04	3.49
Sample 3	4.65	0.13	2.86

Within run			
Sample	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	0.89	0.03	3.05
Sample 2	1.02	0.02	2.32
Sample 3	4.83	0.05	0.95

## Method comparison:

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

$$y = 1.00 x + 0.00; \quad r = 1.000$$

# Fluitest® BIL total DCA

BILIRUBIN, DCA METHODE



## 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:

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

## Literature:

1. Thomas L. ed. Clinical Laboratory Diagnostics, 1<sup>st</sup> 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. 3<sup>rd</sup> 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 total DCA

BILIRUBIN, DCA METHODE



## Bestellinformation:

Katalog-Nr.	Inhalt
3248	R1 5 x 20 ml   R2 1 x 20 ml
H3251 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 042  
Für die Benutzung am Hitachi 912 verwenden Sie bitte ein offenes System oder wenden Sie sich an den Analyticon Kundensupport.

## Anwendungszweck:

Quantitative Bestimmung von Gesamtbilirubin 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 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 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). Durch ein spezielles Detergenzgemisch nehmen sowohl unkonjugiertes als auch konjugiertes Bilirubin an der Reaktion teil.

Bilirubin + Diazoniumsalz → Azobilirubin

Die Farbintensität des gebildeten roten Azofarbstoffs ist direkt proportional zur Gesamt-Bilirubinkonzentration und wird photometrisch gemessen.

## Konzentration der Reagenzien:

<b>R1:</b>	
Phosphat-Puffer	40 mmol/l
NaCl	9 g/l
Detergenzien und Stabilisatoren	
<b>R2:</b>	
2,4-Dichlorphenyl-Diazoniumsalz	1,0 mmol/l
HCl	30 mmol/l
Detergenz	

## 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 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride).  
Hämolyse: Keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 500 (ca. 500 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 Tag bei +18 bis +25°C  
7 Tag bei +2 bis +8°C  
3 Monate unter -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.

### Gelieferte Materialien

• Gebrauchsfertige Lösungen wie vorher angegeben.

### Zusätzlich benötigte Materialien

Kalibrations- und Kontrollmaterial wie nachfolgend beschrieben.  
• Natriumchlorid-Lösung (0,9%)

## Testdurchführung:

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

	Leerwert	Probe / Kalibr.
Probe / Kalibrator	---	50 µl
Aqua dest.	50 µl	---
R1	1000 µl	1000 µl

Mischen und 5min. bei +37°C oder 10min. bei +20-25°C inkubieren. Extinktion E1 ablesen, dann zugeben:

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

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

## Berechnung:

$$\Delta E = (E2 - E1) \text{Probe/Kalibrator} - (E2 - E1) \text{RLW}$$
$$\frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Kalibrator}} \times \text{Kalibrator Konz.} = \text{direktes Bilirubin in mg/dl}$$

## Messbereich:

Bis 30 mg/dl (513 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:

Erwachsene: 0.1 – 1.2 mg/dl (1.7 – 21 µmol/l)  
Kinder >1 Monat: 0.2 – 1.0 mg/dl (3.4 – 17 µmol/l)

## Sensitivität (analytische Nachweisgrenze):

0.07 mg/dl (1.197 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	0.87	0.02	2.74
Probe 2	1.15	0.04	3.49
Probe 3	4.65	0.13	2.86

Probe	In der Serie		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	0.89	0.03	3.05
Probe 2	1.02	0.02	2.32
Probe 3	4.83	0.05	0.95

## Methodenvergleich:

Bei einem Vergleich von Analyticon Fluitest BIL total DCA (y) mit einem kommerziell erhältlichen Test (x) wurden folgende Ergebnisse erhalten:  
 $y = 1,00 x + 0,00;$   $r = 1,000$



# Fluitest® BIL total 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

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

## Literatur:

1. Thomas L ed. Clinical Laboratory Diagnostics, 1<sup>st</sup> 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. 3<sup>rd</sup> 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

