

### Order information:

Catalog-No.	Contents					
1965	R1	1 x	50 ml	R2	1 x	10 ml
	R3	1 x	100 ml	R4	1 x	100 ml

### Intended use:

In vitro test for the quantitative determination of direct bilirubin and total bilirubin in serum, heparinized plasma or EDTA plasma by the Jendrassik-Gróf method.

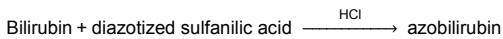
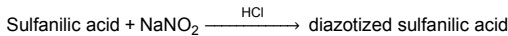
### Summary:

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 which is proportional to the bilirubin concentration. Determination of direct bilirubin is performed without caffeine additive. The addition of alkaline tartrate causes a transformation from the red azobilirubin dye to a blue dye and the absorbance maximum from 546nm to 578nm.



### Reagents – contents and concentrations:

<b>R1:</b>		
Sulfanilic acid		29 mmol/l
HCl		0.17 mol/l
<b>R2:</b>		
Sodium nitrite		25 mmol/l
<b>R3:</b>		
Caffeine		0.26 mol/l
Sodium benzoate		0.52 mol/l
<b>R4:</b>		
Tartrate		0.93 mol/l
NaOH		1.9 mol/l

### Preparation and stability:

R1 ready for use.

Unopened kit components: Up to the expiration date at + 2 to + 8°C.  
Close bottles after use.

### Specimen:

Fresh serum, heparinized plasma or EDTA plasma.  
Hemolysis interferes with the test. Don't use lipemic sera.  
Keep out of light and protect the sample from the effects of sunlight.  
Centrifuge samples containing precipitate before performing the assay.

Stability:	Total	Direct	
	1 day	2 days	at +20 to +25°C
	7 days	7 days	at +4 to +8°C
	6 months	6 months	at - 20°C

### 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: Elevated levels of haemoglobin may interfere.  
Lipemia (Intralipid): Elevated levels of triglycerides may interfere. There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration.  
Protect samples from light to avoid false low values.  
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
- NaCl - sol. 0.9%

#### Procedure Bilirubin Total:

Wavelength: Hg 578 nm (560 – 600 nm)  
Temperature: +20 to +25°C  
Cuvette: 1 cm  
Zero adjustment: against sample blank

	Sample blank	sample
R1	200 µl	200 µl
R2	-----	50 µl
R3	1000 µl	1000 µl
sample	200 µl	200 µl

Mix and incubate at room temperature for 10 – 60 minutes. Add:

R4	1000 µl	1000 µl
----	---------	---------

Mix and incubate at room temperature for 5 – 30 minutes. Read absorbance of sample against sample blank.

#### Calculation:

##### with factors

Concentration in mg/dl  $10.8 \times \Delta A_{\text{Bilirubin Total}}$   
Concentration in µmol/l  $185 \times \Delta A_{\text{Bilirubin Total}}$

##### with calibrator

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

#### Procedure Bilirubin Direct:

Wavelength: Hg 546 nm (530 – 555 nm)  
Temperature: +20°C to +25°C  
Cuvette: 1 cm  
Zero adjustment: against sample blank

	Sample blank	sample
R1	200 µl	200 µl
R2	-----	50 µl
NaCl - sol. 0.9%	2000 µl	2000 µl
Sample	200 µl	200 µl

Mix and incubate at room temperature for 5 minutes. Read absorbance of sample against sample blank.

#### Calculation:

##### with factors

Concentration in mg/dl  $13.7 \times \Delta A_{\text{Bilirubin Direct}}$   
Concentration in µmol/l  $234 \times \Delta A_{\text{Bilirubin Direct}}$

##### with calibrator

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

### Measuring /reportable range:

Bilirubin direct: Up to 6.0 mg/dl (102 µmol/l)

Bilirubin total: Up to 14 mg/dl (238 µmol/l)

Dilute determine samples having higher concentrations with 0.9% NaCl or distilled/deionized water (e.g. 1 + 3) and repeat test. Multiply the result by the appropriate dilution factor (e.g. factor 4).

### Expected values in serum:

Total bilirubin up to 1.0 mg/dl or 17.1 µmol/l

Direct bilirubin up to 0.25 mg/dl or 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.

# Fluitest® BIL T/D

## BILIRUBIN JENDRASSIK/GRÓF METHOD



### Imprecision:

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

#### BILIRUBIN TOTAL

Sample	Between day		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	1.00	0.014	1.40
Sample 2	1.84	0.018	1.00
Sample 3	4.79	0.051	1.07

Sample	Within run		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	1.14	0.017	1.47
Sample 2	1.82	0.021	1.18
Sample 3	5.14	0.020	0.39

#### BILIRUBIN DIRECT

Sample	Between day		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	0.73	0.021	2.90
Sample 2	0.90	0.029	3.28
Sample 3	2.15	0.035	1.63

Sample	Within run		
	Mean mg/dl	SD mg/dl	CV %
Sample 1	0.33	0.008	2.38
Sample 2	0.95	0.008	0.80
Sample 3	2.16	0.013	0.62

### Method comparison:

A comparison of the Analyticon Fluitest BILI T/D (y) with a commercial obtainable assay (x) gave the following result (mg/dl):

$$y = 1.001 x + 0.0245; \quad r = 0.996$$

### 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:

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



### Bestellinformation:

Katalog-Nr.	Inhalt					
1965	R1	1 x	50 ml	R2	1 x	10 ml
	R3	1 x	100 ml	R4	1 x	100 ml

### Anwendungszweck:

In vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Direktem Bilirubin und Gesamt-Bilirubin im 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 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 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 Jendrassik-Gróf

Gesamt-Bilirubin wird in Gegenwart von Koffein als Akzelerator mit diazotierter Sulfanilsäure zu rotem Azobilirubin umgewandelt, dessen Farbintensität proportional der Bilirubinkonzentration ist. Die Bestimmung des „Direkten“ Bilirubins erfolgt ohne Koffeinzusatz. Die Zugabe von alkalischem Tartrat gibt dem Azofarbstoff eine blaue Farbe und verschiebt das Absorptionsmaximum von 546nm auf 578nm.



### Konzentration der Reagenzien:

<b>R1:</b>	
Sulfanilsäure	29 mmol/l
HCl	0,17 mol/l
<b>R2:</b>	
Natriumnitrit	25 mmol/l
<b>R3:</b>	
Koffein	0,26 mol/l
Natriumbenzoat	0,52 mol/l
<b>R4:</b>	
Tartrat	0,93 mol/l
NaOH	1,9 mol/l

### Herstellung und Haltbarkeit:

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Haltbarkeit der ungeöffneten Komponenten:

bei + 2°C - + 8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum.

Reagenzien vor Licht schützen und Flaschen nach Gebrauch gut verschließen.

### Untersuchungsgut:

Frisches Serum, Heparin- oder EDTA-Plasma.

Hämolyse stört. Lipämische Seren können nicht verwendet werden.

Probe vor Licht und Sonneneinwirkung schützen.

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

Haltbarkeit:	Total	Direkt	
	1 Tage	2 Tag	bei +20 bis +25°C
	7 Tage	7 Tage	bei +4 bis +8°C
	6 Monate	6 Monate	bei - 20°C

### 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  $\pm$  10% vom Ausgangswert.

Hämolyse: Schon geringe Mengen Hämoglobin können die Messwerte beeinflussen.

Lipämie: Schon geringe Mengen Triglycerid können die Messwerte beeinflussen.

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

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:

Applikationen 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 Bilirubin Total:		
Wellenlänge:	Hg 578 nm (560 – 600 nm)	
Reaktionstemperatur:	+20 bis +25°C	
Schichtdicke:	1 cm	
Messung:	gegen Probenleerwert	
	Probenleerwert	Probe
R1	200 µl	200 µl
R2	-----	50 µl
R3	1000 µl	1000 µl
Probe	200 µl	200 µl
Mischen und 10 – 60 Minuten bei RT inkubieren, dann zufügen:		
R4	1000 µl	1000 µl
Mischen und 5 – 30 Minuten bei RT inkubieren. Extinktionen der Probe gegen Probenleerwert messen.		
<b>Berechnung:</b>		
<b>mit Faktor</b>		
Konzentration in mg/dl	10,8 x $\Delta E_{\text{Bilirubin Total}}$	
Konzentration in µmol/l	185 x $\Delta E_{\text{Bilirubin Total}}$	
<b>mit Kalibrator</b>		
$\frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Kalibrator}}$	x Kalibratorkonz. = Bilirubinkonz.	

Testdurchführung Bilirubin Direkt:		
Wellenlänge:	Hg 546 nm (530 – 555 nm)	
Reaktionstemperatur:	+20°C bis +25°C	
Schichtdicke:	1 cm	
Messung:	gegen Probenleerwert	
	Probenleerwert	Probe
R1	200 µl	200 µl
R2	-----	50 µl
NaCl - Lsg. 0,9%	2000 µl	2000 µl
Probe	200 µl	200 µl
Mischen und 5 Minuten bei RT inkubieren. Extinktionen der Probe gegen Probenleerwert messen.		
<b>Berechnung:</b>		
<b>mit Faktor</b>		
Konzentration in mg/dl	13,7 x $\Delta E_{\text{Bilirubin Direct}}$	
Konzentration in µmol/l	234 x $\Delta E_{\text{Bilirubin Direct}}$	
<b>mit Kalibrator</b>		
$\frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Kalibrator}}$	x Kalibratorkonz. = Bilirubinkonz.	

### Messbereich:

Bilirubin direkt: Bis 6,0 mg/dl (102 µmol/l)

Bilirubin total: Bis 14 mg/dl (238 µmol/l)

Bei höheren Konzentrationen werden die Proben 1 + 3 mit 0,9%iger Kochsalzlösung verdünnt. Die Analyse wird wiederholt und das Ergebnis mit 4 multipliziert.

### Normalwerte im Serum:

Gesamtes Bilirubin bis 1,0 mg/dl bzw. 17,1 µmol/l

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.

9. Thaler H. Bilirubin: Ein Wegwerfprodukt bleibt weiter aktuell. Dt. med Wschr 1984; 109:283 - 284

10. Thomas L. Labor und Diagnose, Marburg: Med Verlagsges, 1984.

### Impräzision:

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

#### BILIRUBIN TOTAL

Probe	Tag / Tag		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	1,00	0,014	1,40
Probe 2	1,84	0,018	1,00
Probe 3	4,79	0,051	1,07

Probe	In der Serie		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	1,14	0,017	1,47
Probe 2	1,82	0,021	1,18
Probe 3	5,14	0,020	0,39

#### BILIRUBIN DIRECT

Probe	Tag / Tag		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	0,73	0,021	2,90
Probe 2	0,90	0,029	3,28
Probe 3	2,15	0,035	1,63

Probe	In der Serie		
	MW mg/dl	SD mg/dl	VK %
Probe 1	0,33	0,008	2,38
Probe 2	0,95	0,008	0,80
Probe 3	2,16	0,013	0,62

### Methodenvergleich:

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

$$y = 1,001 x + 0,0245; \quad r = 0,996$$

### 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:

S1: 0.9% NaCl

S2: Bio-Cal®	20 x 3 ml	#1420
Bio-Cal® E	10 x 3 ml	#1430

### Literatur:

- Jendrassik L et al. Biochem Z 1938 ;297 :81.
- Malloy HT, Evelyn KA. J Biol Chem 1937;119:481.
- Richterlin R. Klinische Chemie, 3. Auflage Basel: Karger Verlag, 1971:450-452.
- Schellong G, Wende U. Technik für die Eichung von Methoden zur Serumbilirubin-Bestimmung. Klin Wschr 1960;38:703.
- Schmidt E, Schmidt FW. Diagnostik des Ikterus. Dt med Wschr 1984;109:139-144
- Sherlock S. Liver Disease. London: Churchill, 1951:204.
- Silbernagel S, Despopoulos A. Physiologie für die Praxis, Medical 1983; 4 ; 492 – 495
- Stiehl A. Hyperbilirubinämie bei Lebererkrankungen. Fortschr Med 1982; 100:842-845

