

## BILIRUBIN-D ASSAY

**CATALOGUE NUMBER:** 202-S7 **SIZE:** 2 x 125 mL, 1 x 7.5 mL

### INTENDED USE

For the IN VITRO quantitative measurement of bilirubin (direct) concentration in serum.

### TEST SUMMARY

Bilirubin is a bile pigment normally found in serum as a result of red cell destruction. It is a product of hemoglobin breakdown by the reticuloendothelial system and exists in two forms. Unconjugated (indirect) bilirubin is transported to the liver bound by albumin where it becomes conjugated (direct) with glucuronic acid and excreted.

Elevated serum bilirubin is indicative of impairment of the liver, excessive hemolysis, or obstruction of the biliary tract.

Ehrlich<sup>(1)</sup> described the coupling of bilirubin with diazotized sulfanilic acid to form a red pigment in neutral solutions and a blue pigment in strongly acid or alkaline solutions. Conjugated (direct-reacting) bilirubin couples directly with the reagent in an aqueous medium. An accelerator can be added to promote the coupling of free bilirubin with the diazo reagent. This allows the measurement of total bilirubin. Alcohol<sup>(2)</sup> or caffeine-sodium benzoate<sup>(3)</sup> are commonly used as accelerators. Winsten and Cehelyk<sup>(4)</sup> used dimethylsulfoxide (DMSO) as an accelerator. This method is based on the Walters and Gerarde<sup>(5)</sup> modification of the DMSO method.

### TEST PRINCIPLE

Direct Bilirubin + Diazotized Sulfanilic Acid → Azobilirubin (Red)

Sulfanilic acid reacts with sodium nitrite to form diazotized sulfanilic acid. Direct bilirubin reacts with diazotized sulfanilic acid forming azobilirubin.

The absorbance of the reaction mixture at 555 nm is directly proportional to the concentration of direct bilirubin.

### REAGENTS

Bilirubin Reagent (Direct) (R1): A solution containing 35.6 mmol/L sulfanilic acid and hydrochloric acid.

Sodium Nitrite Reagent (R2): A solution containing 43.5 mmol/L sodium nitrite.

### WARNINGS & PRECAUTIONS FOR USE

S24/25: Avoid contact with skin and eyes.

Avoid ingestion.

The reagent is corrosive. Use gloves when handling.

See Material Safety Data Sheet for additional information.

### REAGENT PREPARATION, STORAGE & STABILITY

Reagents are ready for use.

A direct bilirubin working reagent may be prepared by adding one drop (0.05 mL) of nitrite reagent to each 3.0 mL of direct bilirubin reagent.

Supplied reagents are stable at 18-26°C until expiry date.

Working reagent is stable for 8 hours when stored in an amber bottle at 18-26°C.

Reagents should be kept out of direct sunlight. Stability claims are based on real time studies.

### REAGENT DETERIORATION

The reagent solutions should be clear. Turbidity would indicate deterioration. The nitrite reagent should be discarded if a dark yellow discoloration is present.

### DISPOSAL

Reagents must be disposed of in accordance with all Federal, Provincial, State and local regulations.

### SPECIMEN

Fresh, clear, unhemolysed serum.

### SAMPLE STORAGE

The specimen must be protected from light. Samples should be stored at 2-8°C and are stable for seven days. Samples may be stored at minus 20-0°C for three months.<sup>(6)</sup>

### ANALYTICAL SPECIFICITY

Cross contamination studies have not been performed on automated instruments. Certain reagent/ instrument combinations used in sequence with this assay may interfere with reagent performance and test results. The existence of, or effects of, any potential cross contamination issues are unknown.

A hemoglobin concentration of greater than 5 g/L in the sample can interfere with the analysis.

A summary of the influence of drugs on clinical laboratory test may be found by consulting Young, D.S.<sup>(7)</sup>

### ANALYTICAL PROCEDURE

#### MATERIALS PROVIDED

Genzyme Diagnostics' Bilirubin (direct) reagents.

#### MATERIALS REQUIRED (BUT NOT PROVIDED)

- 1) Spectrophotometer or analyzer capable of accurately measuring absorbance at appropriate wavelengths as per instrument application.
- 2) Calibration material
- 3) Quality Control materials

#### TEST CONDITION

For data presented in this insert, studies using this reagent were performed using an endpoint test mode, with a sample to reagent ratio of 1:15 and a wavelength reading of 555 nm. For assistance with applications on automated analyzers within Canada and the U.S., please contact Genzyme Diagnostics Technical Services at (800)565-0265. Outside Canada and the U.S., please contact your local distributor.

#### CALIBRATION

Calibration material should be used to calibrate the procedure. The frequency of calibration using an automated system is dependent on the system and the parameters used.

#### QUALITY CONTROL

A normal and abnormal concentration control should be analyzed as required in accordance with local, state and federal guidelines. The results should fall within the acceptable range as established by the laboratory.

#### CALCULATIONS

The analyzer automatically calculates the bilirubin (direct) concentration of each sample.

#### TEST LIMITATIONS

A sample with a bilirubin (direct) concentration exceeding the linearity limit should be diluted with 0.9% saline and reassayed incorporating the dilution factor in the calculation of the value.

#### REFERENCE INTERVALS<sup>(6)</sup>

0.0-0.2 mg/dL (0.0-4.0 µmol/L)

These values are suggested guidelines. It is recommended that each laboratory establish its own expected range.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

These performance characteristics were generated in Genzyme Diagnostics laboratories.

#### RESULTS

Bilirubin (direct) concentration is reported as mg/dL (µmol/L).

#### REPORTABLE RANGE

The linearity of the procedure described is 20 mg/dL (342 µmol/L). Linearity using automated procedures will depend on the sample/reagent ratio used.

## PRECISION STUDIES

Total precision data was collected on two concentrations of control sera in 20 runs conducted over 10 days.

Concentration		Total SD		Total CV%	Concentration		Within Run SD		Within Run CV%
mg/dL	µmol/L	mg/dL	µmol/L		mg/dL	µmol/L	mg/dL	µmol/L	
2.5	43.4	0.05	0.9	2.1	0.4	7.0	0.03	0.5	7.1
15.5	264.5	0.69	11.8	4.5	2.5	42.8	0.04	0.7	1.6

Within run precision data was collected on two concentrations of control sera each run 54 times in a single assay.

## ACCURACY

The performance of this method (y) was compared with the performance of another commercially available method (x) using 54 patient serum samples. The correlation coefficient was 0.99. Linear regression analysis gave the following equation:

$$\text{This method} = 1.02 (\text{reference method}) - 0.0 \text{ mg/dL} (0.04 \text{ µmol/L})$$

The information presented above is based on results from Genzyme Diagnostics studies and is current at the date of publication.

## TRADEMARKS

All trademarks, brands, product names and trade names are the property of their respective companies.

Manufactured by:



**The Americas**  
Genzyme Diagnostics P.E.I. Inc.  
70 Watts Avenue  
Charlottetown, PE C1E 2B9  
Canada

Phone: 800-565-0265  
Fax: 902-628-6504  
Email: customerservice@genzyme.com  
peidiagnosticttechnical@genzyme.com

**International**  
Genzyme Diagnostics  
50 Gibson Drive  
Kings Hill, West Malling  
KENT, ME19 4AF, UK

Email: ukdiagcustomerservice@genzyme.com

www.genzymediagnosics.com

ES

## ANÁLISIS DE BILIRRUBINA DIRECTA

NÚMERO DE CATÁLOGO: 202-S7 TAMAÑO: 2 x 125 ml, 1 x 7.5 ml

## USO PARA EL QUE FUE DISEÑADO

Para la medición cuantitativa IN VITRO de la concentración de bilirrubina (directa) en suero.

## RESUMEN DEL ANÁLISIS

La bilirrubina es un pigmento biliar que se encuentra normalmente en el suero como resultado de la destrucción de glóbulos rojos. Es un producto de la degradación de la hemoglobina por el sistema reticuloendotelial y existe en dos formas. La bilirrubina no conjugada (indirecta) es transportada al hígado aglutinada por la albúmina, donde se convierte en conjugada (directa) con el ácido glucurónico, y se excreta.

Un nivel elevado de bilirrubina en suero es sintomático de una deficiencia hepática, hemólisis excesiva u obstrucción del tracto biliar.

Ehrlich<sup>(1)</sup> describió el acoplamiento de la bilirrubina con ácido sulfanílico diazotizado para formar un pigmento rojo en soluciones neutras y un pigmento azul en soluciones fuertemente ácidas o alcalinas. La bilirrubina conjugada (de reacción directa) se acopla directamente con el agente reactivo en un medio acuoso. Se puede agregar un acelerador para promover el acoplamiento de la bilirrubina libre con el agente diazoreactivo. Esto permite realizar una medición de la bilirrubina total. El alcohol<sup>(2)</sup> o la cafeína-benzoato de sodio<sup>(3)</sup> se utilizan comúnmente como aceleradores. Winsten y Cehelyk<sup>(4)</sup> emplearon dimetilsulfóxido (DMSO) como acelerador. Este método se basa en la modificación del método con DMSO llevada a cabo por Walters y Gerarde.<sup>(5)</sup>

## PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

Bilirrubina directa + ácido sulfanílico diazotizado → azobilirrubina (roja)

El ácido sulfanílico reacciona con el nitrito de sodio para formar ácido sulfanílico diazotizado. La bilirrubina directa reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado y forma azobilirrubina.

La absorbencia de la mezcla de reacción a 555 nm es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina directa.

## AGENTES REACTIVOS

Agente reactivo de bilirrubina (directa) (R1): Una solución que contiene 35.6 mmol/l de ácido sulfanílico y ácido clorhídrico.

Agente reactivo de nitrito de sodio (R2): Una solución que contiene 43.5 mmol/l de nitrito de sodio.

## ADVERTENCIAS Y MEDIDAS DE PRECAUCIÓN PARA SU USO

S24/25: Evite el contacto con la piel y los ojos.

Evite la ingestión.

El agente reactivo es corrosivo. Use guantes para manipularlo.

Para obtener mayor información, lea la hoja de datos de seguridad de materiales.

## PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DEL AGENTE REACTIVO

Los agentes reactivos vienen listos para su uso.

Un agente reactivo de trabajo de bilirrubina directa puede prepararse agregando una gota (0.05 ml) de agente reactivo de nitrito cada 3.0 ml de agente reactivo de bilirrubina directa.

Los agentes reactivos que se suministran son estables hasta la fecha de caducidad, a una temperatura de 18 a 26°C.

El agente reactivo de trabajo es estable durante 8 horas si se guarda en un frasco ámbar a una temperatura de 18 a 26°C.

Los agentes reactivos deben mantenerse alejados de la luz solar directa. Las afirmaciones acerca de la estabilidad se fundan en estudios realizados en tiempo real.

## DETERIORO DEL AGENTE REACTIVO

El agente reactivo debe ser transparente. La turbidez podría ser una indicación de deterioro. El agente reactivo de nitrito debe desecharse si presenta una coloración amarilla oscura.

## ELIMINACIÓN

Los agentes reactivos se deben eliminar de acuerdo con las estipulaciones de las normas federales, provinciales, estatales y locales.

## MUESTRA

Suero recién sacado, transparente, sin hemolizar.

## ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La muestra debe ser protegida de la luz. Las muestras deben guardarse a una temperatura de entre 2 y 8°C, y son estables durante siete días. Las muestras pueden conservarse a una temperatura de entre menos 20 y 0°C durante tres meses.<sup>(6)</sup>

## ESPECIFICIDAD ANALÍTICA

No se ha realizado estudios de contaminación cruzada en instrumentos automatizados. Ciertas combinaciones de agentes reactivos / instrumentos empleados en secuencia en este análisis pueden interferir con las características del agente reactivo y los resultados del análisis. Se desconoce si existen problemas de posible contaminación cruzada, o de sus efectos.

Una concentración de hemoglobina de más de 5 g/l en la muestra puede interferir en el análisis.

Se puede obtener un resumen de la influencia de los medicamentos en estudios clínicos de laboratorio consultando a Young, D.S.<sup>(7)</sup>

## PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

### MATERIALES SUMINISTRADOS

Agentes reactivos de bilirrubina (directa) de Genzyme Diagnostics.

### MATERIALES NECESARIOS (PERO NO SUMINISTRADOS)

- 1) Espectrofotómetro o analizador capaz de medir con precisión la absorbencia a una longitud de onda adecuada, según la aplicación por instrumento.
- 2) Material de calibración
- 3) Materiales de control de calidad

### CONDICIÓN DEL ANÁLISIS

Para la obtención de los datos que se presentan en este encarte, se realizaron estudios con este agente reactivo en modo de análisis de punto final, con una proporción de 1:15 entre la muestra y el agente reactivo, y una lectura de longitud de onda de 555 nm. FSi desea ayuda para aplicaciones en analizadores automatizados en Canadá o EE UU, comuníquese con Genzyme Diagnostics Technical Services llamando al teléfono (800) 565-0265. En otros países, llame al distribuidor de su localidad.

### CALIBRACIÓN

Para calibrar el procedimiento, debe emplearse el material de calibración. La frecuencia de la calibración utilizando un sistema automatizado depende del sistema y de los parámetros aplicados.

### CONTROL DE CALIDAD

Deben analizarse los controles de concentración normal y anormal, según sea necesario, de conformidad con las directrices locales, estatales y federales. Los resultados deben estar dentro de los límites aceptables establecidos por el laboratorio.

### CÁLCULOS

El analizador calcula automáticamente la concentración de bilirrubina (directa) de cada muestra.

### LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

Deben diluirse con una solución salina al 0.9% y volver a analizarse las muestras con una concentración de bilirrubina (directa) que supere el límite de linealidad, teniendo en cuenta el factor de dilución en el cálculo del valor.

### INTERVALOS DE REFERENCIA<sup>(6)</sup>

0.0 - 0.2 mg/dl (0.0-4.0 µmol/l)

Estos valores se sugieren como pauta. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios límites estimados.

## CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS

Estas características de los resultados se generaron en los laboratorios de Genzyme Diagnostics.

## RESULTADOS

La concentración de bilirrubina (directa) se expresa en mg/dl (µmol/l).

## LÍMITES SIGNIFICATIVOS

La linealidad del procedimiento descrito es de 20 mg/dl (342 µmol/l). La linealidad obtenida mediante los procedimientos automatizados depende de la relación entre la muestra y el agente reactivo empleado.

## ESTUDIOS DE PRECISIÓN

Los datos de precisión total fueron recogidos en dos concentraciones de sueros de control, en 20 pruebas realizadas en un periodo de 10 días.

Concentración		SD total		CV total en %	Concentración		SD dentro de la prueba		CV en % dentro de la prueba
mg/dl	µmol/l	mg/dl	µmol/l		mg/dl	µmol/l	mg/dl	µmol/l	
2.5	43.4	0.05	0.9	2.1	0.4	7.0	0.03	0.5	7.1
15.5	264.5	0.69	11.8	4.5	2.5	42.8	0.04	0.7	1.6

Los datos de precisión dentro de la prueba fueron recogidos en dos concentraciones de sueros de control, cada prueba 54 veces en un solo análisis.

## PRECISIÓN

Los resultados de este método (y) se compararon con los de otro método disponible en el mercado (x) usando las muestras de suero de 54 pacientes. El coeficiente de correlación fue de 0.99. El análisis de regresión lineal dio la siguiente ecuación:

$$\text{Este método} = 1.02 (\text{método de referencia}) - 0.0 \text{ mg/dl (0.04 } \mu\text{mol/l)}$$

La información que se presenta arriba se funda en los resultados de los estudios practicados por Genzyme Diagnostics, y está vigente a la fecha de su publicación.

## MARCAS DE FÁBRICA

Todas las marcas de fábrica, marcas, nombres de productos y nombres comerciales son de propiedad de sus respectivas empresas.

Elaborado por:



**Continente americano**  
Genzyme Diagnostics P.E.I. Inc.  
70 Watts Avenue  
Charlottetown, PE C1E 2B9  
Canada

Teléfono: 800-565-0265  
Fax: 902-628-6504  
Correo electrónico:  
customerservice@genzyme.com  
peidiagnosticttechnical@genzyme.com

**Internacional**  
Genzyme Diagnostics  
50 Gibson Drive  
Kings Hill, West Malling  
KENT, ME19 4AF, RU

Correo electrónico:  
ukdiagcustomerservice@genzyme.com

www.genzymediagnostics.com

## Definitions for Symbols/ Definición de los Símbolos

**LOT**

Batch Code  
Código de lote



Manufacturer  
Fabricante



Consult instructions for use  
Consulte las instrucciones de uso

**IVD**

*In vitro* diagnostic medical device  
Dispositivo médico para el diagnóstico in vitro



Use by  
YYYY-MM-DD or YYYY-MM  
Fecha de caducidad  
AAAA-MM-DD o AAAA-MM

**REF**

Catalog number  
Número de catálogo



Temperature limitation  
Límites de temperatura

## REFERENCES/ REFERENCIAS

1. Ehrlich, P., Sulfadiazobenzol, ein Reagens auf Bilirubin. Centr. Klin. Med. 4: 721-723 (1883).
2. Malloy H.T., and Evelyn, K.A., The Determination of Bilirubin with the Photoelectros Colorimeter., J. Biol. Chem. 119: 481-490 (1937).
3. Jendrassik, L. and Grof. P. Vereinfachte, Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blutbilirubins, Biochem. Z. 297: 81-89 (1938).
4. Winsten, J. and Cehelyk, B., A Rapid Micro Diazo Technique for Measuring Total Bilirubin., Clin. Chem. Acta 25: 441-446 (1969).
5. Walters, M. and Gerarde, H., An Ultramicromethod for the Determination of Conjugated and Total Bilirubin in Serum or Plasma, Microchem. J. 15: 231-243 (1970).
6. Tietz, N.W. (Ed.), Fundamentals of Clinical Chemistry, Second Edition, W.B. Saunders Co., Toronto, Pages 1208, 1037 (1982).
7. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, AACC Press, Washington, Third Edition, 1990.

IN20202-19  
February 4, 2010