

## BILIRUBIN-SL (TOTAL) ASSAY

CATALOGUE NO.: 243-10 SIZE: R1: 1 x 100 mL, R2: 1 x 25 mL

### INTENDED USE

For the IN VITRO quantitative measurement of Bilirubin (Total) 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.

The elevation of total serum bilirubin may occur due to hemolytic processes, liver disease, or a disorder of the biliary tract.

Traditional methods of measuring bilirubin are based on the reaction of bilirubin with a diazo reagent to form the colored compound: azo-bilirubin. The diazo reaction can be accelerated by the addition of various chemicals. For example, Malloy-Evelyn<sup>(1)</sup> used ethanol, Jendrassik-Grof<sup>(2)</sup> used caffeine, and Walters-Gerarde<sup>(3)</sup> used DMSO. Modifications of these methods included the addition of surfactants as solubilizing agents.<sup>(4)</sup>

In this method, a 2,4-dichlorophenyl diazonium salt is used as the diazo reagent and the reaction is facilitated by the use of a surfactant.

### TEST PRINCIPLE

Total Bilirubin + 2,4-Dichlorophenyl diazonium salt  $\xrightarrow{\text{Surfactant}}$  Azobilirubin

Bilirubin (conjugated and unconjugated) couples with the diazo reagent in the presence of a surfactant to form azobilirubin. The increase in absorbance at 546 nm is directly proportional to the total bilirubin concentration.

### REAGENTS

Total Bilirubin-SL Accelerator Reagent R1: A solution containing 40 mmol/L phosphate buffer and 0.25 mol/L NaCl.

Total Bilirubin-SL Diazo Reagent R2: A solution containing 1 mmol/L 2,4-Dichlorophenyl diazonium salt and 30 mmol/L HCl.

### WARNINGS & PRECAUTIONS FOR USE

S24/25: Avoid contact with skin and eyes.  
See Material Safety Data Sheet for additional information.

### REAGENT, PREPARATION, STORAGE & STABILITY

Reagents are ready for use.

Supplied reagents are stable at 2-8°C until expiry date.

Stability claims are based on real time studies.

### REAGENT DETERIORATION

The reagent solutions should be clear. Turbidity would indicate deterioration.

### DISPOSAL

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

### SPECIMEN

Fresh, clear, unhemolysed serum.

### SAMPLE STORAGE

Specimens must be protected from light. Samples may be stored at 2-8°C for 3 days or at minus 70°C for 3 months in the dark.<sup>(5)</sup>

### ANALYTICAL SPECIFICITY (CLSI EP7)<sup>(7)</sup>

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.

Interferences from hemoglobin and lipemia were evaluated for this total bilirubin method on a Roche/Hitachi<sup>®</sup> analyzer using a significance criterion of > 10% variance from control. One concentration of total bilirubin was evaluated. Interference data was collected in serum.

Hemoglobin produces significant interference with this method; therefore, hemolysed samples should not be used.

Concentration of Analyte		Substance Tested	Concentration of Interferent Where Interference is Insignificant	
Conv. Units	SI Units			
0.56 mg/dL	9.5 µmol/L	Intralipid	1000 mg/dL	3000 mg/dL (33.9 mmol/L) Simulated Triglycerides

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

A summary of the influence of drugs on assays may be found by consulting Young, D.S.<sup>(6)</sup>

### ANALYTICAL PROCEDURE

#### MATERIALS PROVIDED

Sekisui Diagnostics' Total Bilirubin-SL reagents.

#### MATERIALS REQUIRED (BUT NOT PROVIDED)

1. Automated analyzer capable of accurately measuring absorbance at appropriate wavelength as per instrument application.
2. Calibration material.
3. Quality Control materials.

#### TEST CONDITION

For the data presented in this insert, studies using this reagent were performed on an automated analyzer using an endpoint test mode, with a sample to reagent ratio of 1:32:8 and a wavelength reading of 546 nm. For assistance with applications on automated analyzers within Canada and the U.S., please contact Sekisui 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, if necessary, using an automated system is dependant 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 total bilirubin concentration of each sample.

#### TEST LIMITATIONS

A sample with a total bilirubin 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>(5)</sup>

0.2-1.0 mg/dL (3.4-17.1 µmol/L)

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

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Data presented was collected on an automated analyzer unless otherwise stated.

#### RESULTS

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

#### REPORTABLE RANGE (CLSI EP6)<sup>(7)</sup>

The linearity of the procedure described is 30.0 mg/dL. The lower limit of detection of the procedure described is 0.0 mg/dL. This data results in a reportable range of 0.0-30.0 mg/dL (0-513 µmol/L).

## PRECISION STUDIES (CLSI EP5)<sup>(7)</sup>

Total precision data was collected on two concentrations of control sera in 40 runs conducted over 20 days.

Concentration		Total SD		Total CV %	Within Run SD		Within Run CV %
mg/dL	µmol/L	mg/dL	µmol/L		mg/dL	µmol/L	
0.8	14	0.03	0.5	4.2	0.03	0.5	3.7
8.9	152	0.37	6.3	4.2	0.15	2.6	1.7

## ACCURACY (CLSI EP9)<sup>(7)</sup>

The performance of this method (y) was compared with the performance of a similar method (x) on a Roche/Hitachi® analyzer. Sixty-five patient serum samples ranging from 0.1 to 10.6 mg/dL (2 to 181 µmol/L) gave a correlation coefficient of 0.9985. Linear regression analysis gave the following equation:

$$\text{This method} = 0.97 (\text{reference method}) + 0.12 \text{ mg/dL (2 } \mu\text{mol/L)}.$$

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

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

Manufactured by:

**SEKISUI**  
DIAGNOSTICS

### The Americas

Sekisui Diagnostics P.E.I. Inc.  
70 Watts Avenue  
Charlottetown, PE C1E 2B9  
Canada

Phone: 800-565-0265

Fax: 902-628-6504

Email: questions@sekisuidiagnostics.com

peidiagnosticttechnical@sekisuidiagnostics.com

www.sekisuidiagnostics.com

### International

Sekisui Diagnostics (UK) Limited  
50 Gibson Drive  
Kings Hill, West Malling  
KENT, ME19 4AF, UK

Email: info@sekisuidiagnostics.com

ES

## ANÁLISIS DE BILIRRUBINA-SL (TOTAL)

No. DE CATÁLOGO: 243-10 TAMAÑO: R1: 1 x 100 ml, R2: 1 x 25 ml

### USO PARA EL QUE FUE DISEÑADO

Para la medición cuantitativa IN VITRO de bilirrubina (total) 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 glucorónico, y se excreta.

El incremento de bilirrubina total en suero puede deberse a procesos hemolíticos, enfermedad hepática o trastornos del tracto biliar.

Los métodos tradicionales de medición de la bilirrubina en suero se fundan en la reacción de la bilirrubina con un agente reactivo diazo para formar el compuesto coloreado: azo-bilirrubina. Se puede acelerar la reacción del diazo agregando diversas sustancias químicas. Por ejemplo, Malloy-Evelyn<sup>(1)</sup> emplearon etanol, Jendrassik-Grof<sup>(2)</sup> emplearon cafeína, y Walters-Gerard<sup>(3)</sup> emplearon DMSO. Se realizaron modificaciones de estos métodos añadiendo agentes tensioactivos como agentes de solubilizantes.<sup>(4)</sup>

En este método, se emplea una sal diazónica 2,4-diclorofenil como agente reactivo diazo y la reacción se facilita con el empleo de un agente tensioactivo.

### PRINCIPIO DEL ANÁLISIS

Bilirrubina total + sal diazónica 2,4-diclorofenil  $\xrightarrow{\text{Agente tensioactivo}}$  Azobilirrubina

La bilirrubina (tanto conjugada como sin conjugar) se une con el agente diazo en presencia de un agente tensioactivo para formar azobilirrubina. El aumento de la absorbencia a 546 nm es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina total.

### AGENTES REACTIVOS

Agente reactivo acelerador de bilirrubina total-SL R1: una solución que contiene 40 mmol/l de tampón de fosfato y 0.25 mol/l de NaCl.

Agente reactivo diazo de bilirrubina total-SL R2: una solución que contiene 1 mmol/l sal diazónica 2,4-diclorofenil y 30 mmol/l de HCl.

### ADVERTENCIAS Y MEDIDAS DE PRECAUCIÓN PARA SU USO

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

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.

Los agentes reactivos que se suministran son estables hasta la fecha de caducidad, a una temperatura de entre 2° y 8° C.

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.

### ELIMINACIÓN

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

### MUESTRA

Suero fresco, transparente, sin hemolizar.

### ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras deben protegerse contra la luz. Las muestras se pueden almacenar durante 3 días a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C, o durante 3 meses a -70 °C en la oscuridad.<sup>(5)</sup>

## ESPECIFICIDAD ANALÍTICA (CLSI EP7)<sup>(7)</sup>

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.

Para este método de análisis de la bilirrubina total, se evaluó la interferencia producida por la hemoglobina y la presencia de lípidos en la sangre, en un analizador de Roche/Hitachi®, aplicando un criterio de relevancia de más de un 10% de desviación de la media de control. Se evaluó una concentración de bilirrubina total. Los datos de interferencia se recogieron en suero.

Con este método, la hemoglobina produce una interferencia considerable, por lo que no se debe emplear muestras hemolizadas.

Concentración del analizado		Substancia analizada	Concentración de interferente en casos en que la interferencia es insignificante	
Unidades de conv.	Unidades del SI			
0.56 mg/dl	9.5 µmol/l	Intralípido	1000 mg/dl	3000 mg/dl (33.9 mmol/l) Triglicéridos simulados

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

Se puede encontrar un resumen de la influencia de los medicamentos en los análisis, consultando a Young, D.S.<sup>(6)</sup>

## PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

### MATERIALES SUMINISTRADOS

Sekisui Agentes reactivos de bilirrubina total-SL de Diagnostics.

### MATERIALES NECESARIOS (PERO NO SUMINISTRADOS)

1. Analizador automatizado 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 un analizador automatizado en modo de análisis de punto final, con una proporción de 1:32:8 entre la muestra y el agente reactivo, y una lectura de longitud de onda de 546 nm. Si desea ayuda para aplicaciones en analizadores automatizados en Canadá o EE UU, comuníquese con Sekisui 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. De ser necesaria, 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 total de cada muestra.

### LIMITACIONES DEL ANÁLISIS

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

### INTERVALOS DE REFERENCIA<sup>(5)</sup>

0.2-1.0 mg/dl (3.4-17.1 µmol/l)

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

### CARACTERÍSTICAS DE LOS RESULTADOS

Salvo que se indique lo contrario, los datos que se presentan fueron recogidos en un analizador automatizado.

## RESULTADOS

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

### LÍMITES SIGNIFICATIVOS ((CLSI EP6)<sup>(7)</sup>

La linealidad del procedimiento descrito es de 30.0 mg/dl. El límite inferior de detección del procedimiento descrito es de 0.0 mg/dl. Estos datos caen dentro de los límites significativos de entre 0.0 y 30.0 mg/dl (0 y 513 µmol/l).

### ESTUDIOS DE PRECISIÓN( (CLSI EP5)<sup>(7)</sup>

Los datos de precisión total fueron recogidos analizando dos concentraciones de suero de control en cuarenta pruebas realizadas durante veinte días.

Concentración		Total de DE		Total de CV en %	Dentro de la prueba con DE		Dentro de la prueba con CV en %
mg/dl	µmol/l	mg/dl	µmol/l		mg/dl	µmol/l	
0.8	14	0.03	0.5	4.2	0.03	0.5	3.7
8.9	152	0.37	6.3	4.2	0.15	2.6	1.7

### PRECISIÓN (CLSI EP9)<sup>(7)</sup>

Los resultados de este método (y) se compararon con los de un método similar de análisis (x), empleando un analizador de Roche/Hitachi®. El análisis de las muestras de suero de sesenta y cinco pacientes, con límites de entre 0.1 y 10.6 mg/dl (entre 2 y 181 µmol/l) dio un coeficiente de correlación de 0.9985. El análisis de regresión lineal dio la siguiente ecuación:

$$\text{Este método} = 0.97 (\text{método de referencia}) + 0.12 \text{ mg/dl (2 } \mu\text{mol/l)}.$$

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

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

Elaborado por:

**SEKISUI**  
DIAGNOSTICS

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

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

**Internacional**  
Sekisui Diagnostics (UK) Limited  
50 Gibson Drive  
Kings Hill, West Malling  
KENT, ME19 4AF, RU

Correo electrónico:  
info@sekisuidiagnostics.com

www.sekisuidiagnostics.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. Malloy H.T. and Evelyn, K.A., The Determination of Bilirubin with the Photoelectro Colorimeter., J. Biol. Chem. 119: 481-490 (1973).
2. Jendrassik, L and Grof. P. Vereinfachte, Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blubilirubins, Biochem. A. 297: 81-89 (1938).
3. 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).
4. Winsten, J. and Cehelyk, B., A Rapid Micro Diazo Technique for Measuring Total Bilirubin., Clin. Chem. Acta 25: 441-446 (1969).
5. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds), Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
6. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, AACC Press, Washington, 1990.
7. *CLSI Method Evaluation Protocols*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

IN24310-10  
November 3, 2011