



Stanbio Total & Direct Bilirubin Procedure No. 0240, 0245

For the Quantitative Colorimetric Determination of Total and Direct Bilirubin in Serum or Plasma.

Summary and Principle

Most routine clinical procedures for the determination of serum bilirubin are based on the classical Diazo reaction of Ehrlich¹, which was first applied to the estimation of this bile pigment in serum in 1913 by Van den Berg and Snapper². An excellent review of many bilirubin methodologies is given by Winkelman and his co-workers³.

When a solution of sulfanilic acid in dilute hydrochloric acid is combined with one of sodium nitrite, nitrous acid is formed. This unstable acid, which must be freshly prepared for each group of assays, react to form diazotized sulfanilic acid.. The latter (also termed "p-benzenediazonium sulfonate") couples with bilirubin to produce azobilirubin, the color intensity of which is proportional to bilirubin concentration.

Since bilirubin standards suffer from a high degree of instability, the method presented utilizes a aqueous solution of N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride as a calibrator, according to Bilissis and Speer⁴. This pure stable aromatic amine couples with diazotized sulfanilic acid under the test conditions to give an azo dye with spectral qualities similar to azobilirubin. The calibrator supplied has been prepared to yield, for the technique described, a color equivalent to the labeled bilirubin level at 540 nm.

Reagents

Total Bilirubin Reagent, Cat. No. 0241

Sulfanilic acid, 32 mmol/L in dilute hydrochloric acid. Accelerator and stabilizer added.

Bilirubin Oxidant, Cat. No. 0262

Sodium nitrite, 20 mmol/L, aqueous. Stabilizer added.

Bilirubin Calibrator (10 mg/dL), Cat. No. 0263

N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride, 0.346 mmol/L.

Stabilizer added. Equivalent to 10 mg/dL Bilirubin in method described.

For Determination of Direct Bilirubin (Supplied Separately)

Direct Bilirubin Reagent, Cat. No. 0245

Sulfanilic acid, 32 mmol/L in dilute hydrochloric acid and stabilizer added.

Precautions: For In Vitro Diagnostic Use.

Reagents are caustic. Do not pipet by mouth.

Reagent Storage and Stability: Total Bilirubin reagent, Direct Bilirubin reagent, oxidant, and calibrator are stable when stored at 15-30°C until the expiration date on their respective labels. An eventual color change of Total Bilirubin reagent may occur but this color will not interfere with the assay. Discard oxidant if a dark yellow color develops.

Working Reagent: Add 1 drop of oxidant to every 1 mL of Total and/or Direct Bilirubin reagent. Invert gently 3-4 times to mix well. Working reagent is stable for 7 days when stored at 15-30°C.

Materials Required But Not Provided

Spectrophotometer capable of absorbance readings at 540 nm
Accurate pipetting devices, Cuvettes, Vortex mixer, Interval timer

Specimen Collection and Preparation^{3,5}

1. Serum, or plasma collected by use of any of the common anticoagulants, should be free of hemolysis and obtained in the fasting state to avoid chylous specimens.
2. Samples must be protected from both sunlight and white artificial light, as bilirubin is highly photolabile. Reportedly, about 50% of bilirubin can be lost when exposed to sunlight for 1 hour.

Sample Stability: Bilirubin is stable in serum or plasma 4-7 days at 2-8°C and for 3 months when frozen (-20°C).

Interfering Substances: Gross hemolysis will cause falsely high bilirubin values, due to the inhibition of the diazo reaction by oxyhemoglobin^{3,6}. An extensive list of drugs or other agents interfering with diazo bilirubin methodologies has been reported by Young et al⁷.

Turbid or lipemic serum may cause a falsely elevated bilirubin values. It is suggested to run a patient serum blank with each patient test.

Automated Analyzers

Parameters:	Total	Direct
Wavelength	540 nm	540 nm
Reaction Type	Endpoint	Endpoint
Reaction Direction	Increasing	Increasing
Reaction Temperature	37°C	37°C
Sample/Reagent Ratio	1:20	1:10
Equilibrium Time	3 seconds	3 seconds
Read Time	4 seconds	4 seconds
Lag Time	300 seconds	180 seconds
Blank Absorbance Limit	0.100A	0.100A
High Absorbance	2.000A	2.000A
Calibrators	10 mg/dL	10 mg/dL
Low Normal	0.0 mg/dL	0.0 mg/dL
High Normal	1.2 mg/dL	0.5 mg/dL
Linearity	20.0 mg/dL	10.0 mg/dL

Above parameters should be employed in programming automated analyzers for Bilirubin. Consult your instrument manual for programming instructions. Specific programming applications for most automated analyzers are available from Stanbio Customer Service Department.

Manual Procedure (Total Bilirubin)

1. Pipet into cuvettes labeled Reagent Blank (RB), K (Calibrator), and S (Specimen) the following volumes (mL), except Oxidant, which is 1 drop, mixing well after each addition:

	TOTAL BILIRUBIN			
	RB	K	S	S
"Total" Reagent	1.0	1.0	-	1.0
Oxidant (Drop)	1	1	-	1
Calibrator (K)	-	0.05	-	-
Sample	-	-	-	0.05
Water	0.05	-	-	-

2. Allow cuvettes to incubate at room temperature for at **least** 5 minutes.
3. Read K and S vs. RB at 540 nm within 30 minutes.

Manual Procedure (Direct Bilirubin)

1. Pipet into cuvettes labeled RB (Reagent Blank), K (Calibrator), Specimen Blank (SB), and S (Specimen) the following volumes (mL), except Oxidant, which is 1 drop, mixing well after each addition:

	DIRECT BILIRUBIN			
	RB	K	SB	S
"Direct" Reagent	1.0	1.0	1.0	1.0
Oxidant (Drop)	1	1	-	1
Water	0.1	-	-	-
Calibrator (K)	-	0.1	-	-
Sample	-	-	0.1	0.1

2. Allow cuvettes to incubate at room temperature for **exactly** 3 minutes.
3. **Immediately** read the K and S-SB vs. RB at 540 nm.

Notes:

1. Timing of 3 minutes for "Direct" samples after addition of serum is critical, as absorbance readings will increase slowly due to presence of the "Indirect" fraction. Timing of calibrator is not critical, as reaction is complete in 3 minutes.
2. For newborns, usually only total bilirubin is requested. However, presence of the conjugated (direct) form occurs with sufficient frequency in newborns that the direct bilirubin test can be utilized.

Quality Control: Control sera, assayed by this method should be included with each run of unknowns.

Results

Values are derived from the following calculations:

$$\text{Total or Direct Bilirubin (mg/dL)} = \frac{\text{As-Asb}}{\text{Ak}} \times 10$$

Where As, Asb and Ak are the absorbance values of the Specimen, Specimen Blank and Calibrator respectively, and 10, the concentration of the calibrator.

Expected Values^{3,5}

Upper Limits of Normal (mg/dL):

Total Bilirubin	Adults:	1.2	Newborns:	12.0
Direct Bilirubin	Adults and Infants (over 1 month)	0.5		

Performance Characteristics⁸

Precision: Serum samples were assayed 20 times (within run precision) and for 10 working days (run-to-run precision). Coefficients of variation were "within run" 3.3% (mean = 0.49 mg/dL), 2.3% (mean = 10.2 mg/dL) and "run-to-run" 3.5% (mean = 0.51 mg/dL), 2.4% (mean = 10.2 mg/dL) for total bilirubin. "Within run" coefficient of variation was 1.82% (mean = 3.70 mg/dL) and 2.76% (mean = 3.62 mg/dL) for direct bilirubin (abnormal).

Correlation: Determination of bilirubin by the procedure described (y) and by a modified Jendrassik-Groff⁹ technique (x) on 25 sera showed a correlation coefficient (r) of 0.9995 for total (normal and abnormal) bilirubin and 0.9970 for direct bilirubin (abnormal). The regression equation for total bilirubin was y = 1.06x - 0.100.

Sensitivity: Both Total and Direct procedures showed a sensitivity of 0.018 mg/dL per 0.001 absorbance units.

Linearity: Total and Direct procedures have been established to 20 mg/dL and 10 mg/dL, respectively.

References

1. Ehrlich P. Charite Ann 8:140, 1883.
2. Van den Bergh AAH, Snapper J. Deut Arch Klin Med 110:540, 1913.
3. Winkelman JW et al. In Clinical Chemistry – Principles and Technics. RJ Henry et al., Eds. Harper & Row, Hagerstown, MD. 1974, pp1042-1061.
4. Bilissis PK, Speer RJ. Clin Chem 9:552, 1963.
5. Routh JI. In Fundamentals of Clinical Chemistry. NW Tietz, Ed Saunders, Philadelphia, 1976, pp. 1035-1043.
6. Shull DC. Clin Chem 26:22, 1980.
7. Young DS et al. Clin Chem 21:22, 1980.
8. Stanbio Laboratory data.
9. Jendrassik L., Groff, P. Biochem Z 297-81, 1938.

STANBIO LABORATORY, LP DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES OF THE MERCHANTABILITY AND FITNESS PERTAINING TO THIS PRODUCT WHICH ARE NOT EXPRESSLY DETAILED IN THIS PACKAGING INFORMATION OR A WRITTEN AGREEMENT BETWEEN THE BUYER AND SELLER OF THIS PRODUCT.

STANBIO LABORATORY, LP MAINTAINS THAT THIS PRODUCT CONFORMS TO THE INFORMATION CONTAINED IN THIS INSERT. PURCHASER MUST DETERMINE THE SUITABILITY OF THE PRODUCT FOR ITS PARTICULAR USE. USE ONLY IN ACCORDANCE WITH LABELING INSTRUCTIONS.

For Technical Service call: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.0240.CE.EN.01-M • Last Revision: 06/05 • Procedure No. 0240



Stanbio Bilirrubina Total y Directa, Procedure No. 0240, 0245

Para la determinación cuantitativa colorimétrica de Bilirrubina Total y Directa en suero ó plasma

Resúmen y Principio

La mayoría de las rutinas en los procimientos clínicos para la determinación de Bilirrubina en suero están basadas en la clásica reacción Diazo de Ehrlich¹ que fué aplicada en principio para la estimación del pigmento biliar en suero en 1913 por Vanden Berg y Snapper².

Una excelente reseña de las muchas metodologías de la Bilirrubina es dada por Winkelman y sus colaboradores³.

Cuando una solución de ácido sulfanílico en ácido clorhídrico diluido se combina con una solución de nitrito de sodio, se forma ácido nitroso. Este ácido inestable, que debe ser preparado en el momento para cada grupo de ensayos, reacciona para formar ácido sulfanílico diazotizado. Este, (también llamado : "p-bencendiazonium sulfanato") se une con la Bilirrubina para producir azobilirrubina, la intensidad de color es proporcional a la concentración de la Bilirrubina.

Debido a que los estándares de Bilirrubina sufren un alto grado de inestabilidad, el presente método utiliza una solución acuosa de N-1-naftiletildiamina diclorhidrica como un calibrador, de acuerdo con Bilissis y Speer⁴.

Esta amina aromática pura, estable, se une con el ácido sulfanílico diazotizado bajo las condiciones de la prueba para dar un tinte (colorante) azo con cada prueba.

El calibrador incluido ha sido preparado para producir, para la técnica descrita, un color equivalente al nivel de bilirrubina marcada a 540 nm.

Reactivos

Reactivo de Bilirrubina Total, Cat. No. 0241

Acido sulfanílico, 32 mmol/L en ácido clorhídrico diluido. Incluye acelerador y estabilizador.

Bilirrubina Oxidante, Cat. No. 0262

Nitrito de sodio 20 mmol/L, acuoso, incluye estabilizador.

Calibrador de Bilirrubina (10 mg/dL), Cat. No. 0263

N-1-nitroetilendiamina diclorhidrico, 0.346 mmol/L. Incluye estabilizador. Equivalente a 10 mg/dL de Bilirrubina en el método destruido.

Para determinacion de Bilirubin Directa (Provisto Separadaminti)

Reactivo de Bilirrubina Directa, Cat. No. 0244

Acido sulfanílico, 32 mmol/L en ácido clorhídrico diluido. Incluye estabilizador.

Precaución: Para uso do diagnóstico in vitro. Los reactivos son cáusticos. No pipetear con la boca.

Preparación del Reactivo de Trabajo: Añada 1 gota (50 µL) de Bilirrubina oxidante a cada 1 mL de reactivo de Bilirrubina total y directa. Invierta suavemente 3-4 veces. El reactivo de trabajo es estable por 7 días a 15-30°C

Estabilidad y Almacenamiento del Reactivo: El reactivo Total y Directo, el oxidante y el calibrador son estables si se mantienen a 15-30°C hasta la fecha de caducidad marcada en las etiquetas. Puede llegar a haber un cambio eventual en el color de la Bilirrubina Total, pero este color no interfiere con la prueba. Deseche el oxidante si presenta coloración amarilla oscura.

Materiales Requeridos Pero No Incluidos

Espectrofotómetro capaz de leer absorbancias a 540 nm
Pipeteadores exactos, Cuvetes, Agitador vortex
Crónometro

Recolección y Preparación de la Muestra^{3,5}

1. El suero o plasma recolectado usando cualquiera de los anticoagulantes comunes. No deben presentar hemólisis y debe obtenerse de la manera más rápida para evitar muestras lipémicas.
2. Las muestras deben ser protegidas de la luz del sol y de la luz artificial blanca, ya que la bilirrubina es altamente fotolábil. Se ha reportado que alrededor del 50% de la Bilirrubina puede perderse cuando se expone a la luz del sol por 1 hora.

Estabilidad de la Muestra: La Bilirrubina en suero/plasma es estable 4-7 días a 2-8°C y por 6 meses cuando se congela.

Substancias Interferentes: La hemólisis puede causar falsos valores altos de Bilirrubina, debido a la inhibición de la reacción diazo por oxihemoglobina^{3,6}. Una larga lista de drogas y otros agentes interferentes con las metodologías de Bilirrubina diazo, han sido reportadas por Young et al⁷.

El suero turbio ó lipemico puede causar falsas elevaciones en la Bilirrubina directa. Si esto ocurre, se debe de usar un blanco de suero del paciente en lugar del reactivo blanco cuando se determine niveles de Bilirrubina directa.

Analizador Automatizado

Parámetros:	Total	Directa
Longitud de onda	540 nm	540 nm
Tipo de reacción	Punto final	Punto final
Dirección de la reacción	Creciente	Creciente
Temperatura de la reacción	37°C	37°C
Relación muestra/reactivo	1:20	1:10
Tiempo de lectura	4 segundos	4 segundos
Tiempo lag	300 segundos	180 segundos
Absorbancia límite del blanco	0.100A	0.100A
Máxima absorbancia	2.000A	2.000A
Calibradores	10.0 mg/dL	10.0 mg/dL
Valor normal bajo	0.0 mg/dL	0.0 mg/dL
Valor normal alto	1.2 mg/dL	0.5 mg/dL
Linealidad	20.0 mg/dL	10.0 mg/dL

Procedimiento Manual (Total)

Pipetear en celdillas marcadas como RB (Reactivo Blanco), K (calibrador), y S (muestra) los siguientes volúmenes (mL), mezcle bién después de cada adición.

	RB	K	S
Reactivo "Total"	1.0	1.0	-
Oxidante (Gota)	1	1	-
Agua	0.05	-	-
Calibrador (K)	-	0.05	-
Muestra	-	-	0.05

2. Deja que las celdillas incuben a temperatura ambiente por un mínimo de 5 minutos.
3. Lea el calibrador (K) y S (muestra) vs. reactivo blanco (RB) a 540 nm antes de 30 minutos.

Procedimiento Manual (Directa)

Pipetear en celdillas marcadas como RB (Reactivo Blanco), K (calibrador), SB (blanco de la muestra) y U (muestra) los siguientes volúmenes (mL), mezcle bién después de cada adición.

	RB	K	SB	S
Reactivo "Directa"	1.0	1.0	1.0	1.0
Oxidante (Gota)	1	1	-	1
Agua	0.1	-	-	-
Calibrador (K)	-	0.1	-	-
Muestra	-	-	0.1	0.1

2. Deja que las celdillas incuben a temperatura ambiente por exactamente 3 minutos.
3. Lea el calibrador (K) y la muestra menos el blanco de muestra (U-SB) contra el reactivo blanco (RB) a 540 nm rápidamente.

NOTA: Si tarda 3 minutos para la "directa", después de la adición del suero, se considera crítico, por que la lectura de las absorbancias se incrementa lentamente debido a la presencia de la fracción "indirecta". El tiempo que tarda el calibrador no es crítico ya que la reacción se completa en 3 minutos.

Control de Calidad: En cada serie de muestras se recomienda usar un pool de sueros ó un suero control comercial.

Resultados

Los valores se derivan de el siguiente cálculo:

$$\text{Bilirrubina Total o Directa en suero mg/dL} = \frac{\text{Au-Asb}}{\text{Ak}} \times 10.0$$

Donde (Au) y (Asb) son los valores de las absorbancias de la muestra y el blanco de muestra. (Ak) es el valor de la absorbancia de el calibrador y 10.0 es la concentración de el calibrador.

Valores Esperados^{3,6}

Límites altos normales (mg/dL)	Adultos	1.2	Recién nacidos	12.0
Bilirrubina Total	Adultos	1.2	Recién nacidos	12.0
Bilirrubina Directa	Adultos e-Infantes	0.5	(mas de un mes)	0.5

Características⁹

Precisión: Las muestras de suero fueron ensayadas 20 veces (precisión intraensayo) durante 10 días de trabajo (precisión ensayo tras ensayo). Los coeficientes de variación "Intraensayo" 3.3% (media = 0.49 mg/dL), 2.3% (media = 10.20 mg/dL) y de "ensayo tras ensayo" 3.5% (media = 0.51 mg/dL), 2.4% (media = 10.4 mg/dL) para Bilirrubina Total. En el intraensayo el coeficiente de variación fue 1.82% (media = 3.70 mg/dL) y 2.76% (media = 3.62 mg/dL) para Bilirrubina Directa.

Correlación: La determinación de Bilirrubina por el procedimiento descrito (y) y por una modificación de la técnica de Jendrassik-Groff¹⁰ (x) en 25 sueros mostrarán un coeficiente de correlación (r) de 0.9995 para la Bilirrubina Total (normal y anormal) y 0.9970 para la Bilirrubina Directa (anormal). La ecuación de regresión para la Bilirrubina Total es y = 1.06x - 0.100.

Linealidad: Ambos procedimientos total y directo han sido establecidos hasta 20 mg/dL y 10 mg/dL respectivamente.

Referencias

1. Ehrlich P. Charite Ann 8:140, 1883.
2. Van den Bergh AAH, Snapper J. Deut Arch Klin Med 110:540, 1913.
3. Winkelman JW et al. In Clinical Chemistry – Principles and Technics RJ Henry et al.
4. Bilissis PK, Speer RJ. Clin Chem 9:552, 1963.
5. Routh JI, In Fundamentals of Clinical Chemistry. NW Tietz, Ed Saunders, Philadelphia, 1976, pp. 1035-1043.
6. Shull DC, Clin Chem 26:22, 1980.
7. Young DS et al. Clin Chem 21:22, 1980.
8. Stanbio Laboratory data.
9. Jendrassik L., Groff, P. Biochem Z 297-81, 1938.

STANBIO LABORATORY, LP DECLINA TODAS LAS GARANTIAS EXPRESADAS E INVOLUCRADAS EN LA NEGOCIABILIDAD Y PROPIEDAD CONCERNIENTE A ESTE PRODUCTO, QUE NO ESTEN EXPRESAMENTE DETALLADAS EN LA INFORMACION CONTENIDA EN EL EMPAQUE O SI NO HAY UN ACUERDO ESCRITO ENTRE EL COMPRADOR Y EL VENDEDOR DE ESTE PRODUCTO.

STANBIO LABORATORY, LP SOSTIENE QUE ESTE PRODUCTO CUMPLE CON LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTE INSERTO. EL COMPRADOR DEBE DETERMINAR LA CONFORMIDAD DEL PRODUCTO PARA SU USO PARTICULAR. USELO SOLO DE ACUERDO A LAS INSTRUCCIONES DE LA ETIQUETA.

Para asistencia tecnica llame: 800-531-5535 • (830) 249-0772

Fax (830) 249-0851 • e-mail: stanbio@stanbio.com

http://www.stanbio.com

Stanbio Laboratory • 1261 North Main Street • Boerne, Texas 78006

DN: RBR.0240.CE.ES.01-M • Ultima Revisión: 06/05 • Proced.No. 0240