

Quantitative determination of bilirubin IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Bilirubin is converted to colored azobilirubin by diazotized sulfanilic acid and measured photometrically. Of the two fractions presents in serum, bilirubin-glucuronide and free bilirubin loosely bound to albumin, only the former reacts directly in aqueous solution (bilirubin direct), while free bilirubin requires solubilization with dimethylsulfoxide (DMSO) to react (bilirubin indirect). In the determination of indirect bilirubin the direct is also determined, the results correspond to total bilirubin.

The intensity of the color formed is proportional to the bilirubin concentration in the sample^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Bilirubin is a breakdown product of hemoglobin.

It is transported from the spleen to the liver and excreted into bile.

Hyperbilirubinemia results from the increase of bilirubin concentrations in plasma.

Causes of hyperbilirubinemia:

Total bilirubin (T): Increase hemolysis, genetic errors, neonatal jaundice, ineffective erythropoiesis, and drugs.

Direct bilirubin (D): Hepatic cholestasis, genetic errors, hepatocellular damage^{1,5,6}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

| | | |
|-----------------|-------------------------------|--------------|
| R 1 (D) | Sulfanilic acid | 30 mmol/L |
| | Hydrochloric acid (HCl) | 150 mmol/L |
| R 2 (T) | Sulfanilic acid | 30 mmol/L |
| | Hydrochloric acid (HCl) | 50 mmol/L |
| | Dimethylsulfoxide (DMSO) | 7 mol/L |
| R 3 | Sodium nitrite | 29 mmol/L |
| Optional | BILIRUBIN CAL (Note 3) | Ref: 1002250 |

PRECAUTIONS

R1/R2: H290-May be corrosive to metals. H314-Causes severe burns and eye damage. EUH208-Contains sulphanic acid. May produce an allergic reaction.

Follow the precautionary statements given in MSDS and label of the product.

PREPARATION

All the reagents are ready to use.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Color development in R 2.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 555 nm.
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or plasma, free of haemolysis (separated from red blood cells as soon as possible). Protect samples from direct light.

Sample Stability (without red blood cells): 2-8°C for 4 days and 2 months at 20°C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
 Wavelength:555 nm (530-580)
 Cuvette:1 cm light path
 Temperature:15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette: (Note 2)

| | Blank | Total B. | Blank | Direct B. |
|--|-------|----------|-------|-----------|
| R 1 (D) (mL) | -- | -- | 1,5 | 1,5 |
| R 2 (T) (mL) | 1,5 | 1,5 | -- | -- |
| R 3 (μL) | -- | 50 | -- | 50 |
| Sample ^(Note 1) / Calibrator (μL) | 100 | 100 | 100 | 100 |

- Mix and incubate exactly for **5 minutes** at 15-25°C.
- Read the absorbance (A).

CALCULATIONS

- **With Calibrator:**

$$\frac{(A) \text{ Sample} - (A) \text{ Sample Blank}}{(A) \text{ Calibrator} - (A) \text{ Calibrator Blank}} \times \text{Conc. Calibrator} = \text{mg/dL bilirubin}$$

- **With Factor:**

$$((A) \text{ Sample} - (A) \text{ Sample Blank}) \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirubin in the sample}$$

$$*\text{Factor: } \frac{\text{Concentration of Calibrator}}{(A) \text{ Calibrator} - (A) \text{ Calibrator Blank}}$$

Conversion factor: mg/dL x 17,1 = μmol/L.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINTROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

| | |
|------------------|---------------------------------|
| Bilirubin Total | Up to 1,10 mg/dL ≅ 18,81 μmol/L |
| Bilirubin Direct | Up to 0,25 mg/dL ≅ 4,27 μmol/L |

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of (T) 0,00526 mg/dL (D) 0,07 mg/dL to linearity limit of 18 mg/dL. (T) and 20 mg/dL (D).

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

| Bilirubin T | Intra-assay (n=20) | |
|--------------|--------------------|------|
| Mean (mg/dL) | 1,53 | 5,06 |
| SD | 0,03 | 0,05 |
| CV (%) | 1,73 | 1,01 |

| Inter-assay (n=20) | |
|--------------------|------|
| 1,53 | 5,02 |
| 0,03 | 0,11 |
| 1,92 | 2,18 |

| Bilirubin D | Intra-assay (n=20) | |
|--------------|--------------------|-------|
| Mean (mg/dL) | 0,96 | 2,48 |
| SD | 0,024 | 0,051 |
| CV (%) | 2,52 | 2,06 |

| Inter-assay (n=20) | |
|--------------------|-------|
| 0,96 | 2,50 |
| 0,043 | 0,035 |
| 4,49 | 1,41 |

Sensitivity: 1 mg/dL = 0,05074 A (T).
 1 mg/dL = 0,06856 A (D).

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents did not show systematic differences when compared with other commercial reagents.

The results obtained using 50 samples for Bilirubin D were the following:

Correlation coefficient (r)²: 0,96

Regression equation: y=0,71177x - 0,05267

The results obtained using 50 samples for Bilirubin T were the following:

Correlation coefficient (r)²: 0,991

Regression equation: y=0,82743x - 0,0382

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

Hemolysis causes decreased bilirubin values^{1,2}.

A list of drugs and other interfering substances with bilirubin determination has been reported^{3,4}.

NOTES

- For bilirubin determination in newborns, pipette 50 μL of sample. Multiply the result by 2.
- Use clean disposable pipette for the dispensation.
- Only to be used in bilirubin total.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.**

BIBLIOGRAPHY

- Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241. 436 and 650.
- Malloy H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem 1937; 112, 2; 481-491.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PACKAGING

Ref: 1001044

Cont.

R 1 (D): 1 x 150 mL
 R 2 (T): 1 x 150 mL
 R 3: 1 x 10 mL

Determinación cuantitativa de bilirrubina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónico y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina. Es transportada del bazo al hígado y se excreta en la bilis. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia: Bilirrubina Total (T): Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. Bilirrubina Directa (D): Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas^{1,5,6}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

| | | |
|-----------------|---|-----------------------------------|
| R 1 (D) | Ácido sulfanílico Ácido clorhídrico (ClH) | 30 mmol/L 150 mmol/L |
| R 2 (T) | Ácido sulfanílico Ácido clorhídrico (ClH) Dimetilsulfóxido (DMSO) | 30 mmol/L 50 mmol/L 7 mol/L |
| R 3 | Sodio nitrito | 29 mmol/L |
| Opcional | BILIRUBIN CAL (Nota 3) | Ref: 1002250 |

PRECAUCIONES

R1/R2: H290-Puede ser corrosivo para los metales. H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. EUH208-Contiene ácido sulfanílico. Puede provocar una reacción alérgica. Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Desarrollo de color en el R 2.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 555 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis (separado lo antes posible de los hematíes). Proteger de la luz. Estabilidad de la muestra separada ya de los hematíes: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda:.....555 nm (530-580)
Cubeta:.....1 cm paso de luz
Temperatura:.....15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta: (Nota 2)

| | Blanco | B. Total | Blanco | B. Directa |
|----------------------------------|--------|----------|--------|------------|
| R 1 (D) (mL) | -- | -- | 1,5 | 1,5 |
| R 2 (T) (mL) | 1,5 | 1,5 | -- | -- |
| R 3 (µL) | -- | 50 | -- | 50 |
| Muestra (Nota 1)/Calibrador (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 |

- Mezclar e incubar exactamente **5 minutos** a 15-25°C.
- Leer la absorbancia (A).

CÁLCULOS

- **Con Calibrador:**

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco Muestra}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco Calibrador}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

- **Con Factor:**

$$((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco Muestra}) \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirrubina en la muestra}$$

$$*\text{Factor} = \frac{\text{Concentración del Calibrador}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco Calibrador}}$$

Factor de conversión: mg/dL x 17,1 = µmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

| | |
|---------------------|---------------------------------|
| Bilirrubina Total | Hasta 1,10 mg/dL ≅ 18,81 µmol/L |
| Bilirrubina Directa | Hasta 0,25 mg/dL ≅ 4,27 µmol/L |

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de (T) 0,00526 mg/dL (D) 0,07 mg/dL hasta el límite de linealidad de 18 mg/dL (T) y 20 mg/dL (D).

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

| Bilirrubina T | Intraserie (n= 20) | |
|---------------|--------------------|------|
| Media (mg/dL) | 1,53 | 5,06 |
| SD | 0,03 | 0,05 |
| CV (%) | 1,73 | 1,01 |

| Interserie (n= 20) | |
|--------------------|------|
| 1,53 | 5,02 |
| 0,03 | 0,11 |
| 1,92 | 2,18 |

| Bilirrubina D | Intraserie (n= 20) | |
|---------------|--------------------|-------|
| Media (mg/dL) | 0,96 | 2,48 |
| SD | 0,024 | 0,051 |
| CV (%) | 2,52 | 2,06 |

| Interserie (n= 20) | |
|--------------------|-------|
| 0,96 | 2,50 |
| 0,043 | 0,035 |
| 4,49 | 1,41 |

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,05074 A (T).
1 mg/dL = 0,06856 A (D).

Exactitud: Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Los resultados obtenidos con 50 muestras para Bilirrubina D fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,96

Ecuación de la recta de regresión: y=0,71177x - 0,05267

Los resultados obtenidos con 50 muestras para Bilirrubina T fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,991

Ecuación de la recta de regresión: y=0,82743x - 0,0382

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina^{1,2}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de bilirrubina^{3,4}.

NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 2.
- Uso de pipeta desechable para la dispensación.
- Sólo para ser utilizado en la bilirrubina total.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241. 436 and 650.
- Malloy H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem 1937; 112, 2; 481-491.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001044

| | | |
|-------|----------|------------|
| Cont. | R 1 (D): | 1 x 150 mL |
| | R 2 (T): | 1 x 150 mL |
| | R 3: | 1 x 10 mL |

Détermination quantitative de bilirubine IVD

Conserver à 2-8°C

PRINCIPE DE LA METHODE

La bilirubine est transformée en azobilirubine au moyen de l'acide sulfanilique diazote, et se mesure par photométrie. Des deux fractions présentes dans le sérum, la bilirubine-glucuronide et la bilirubine libre associée à l'albumine, seule la première réagit en milieu aqueux (bilirubine directe). La deuxième ne réagit que par solubilisation avec du diméthylsulfoxyde (DMSO)- (bilirubine indirecte). Dans la détermination de la bilirubine indirecte, on détermine également la directe, le résultat correspondant à la bilirubine totale. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de bilirubine présente dans l'échantillon testé^{1,2}.

SIGNIFICATION CLINIQUE

La bilirubine provient de la dégradation de l'hémoglobine. Elle est transporté depuis la rate vers le foie et est excrétée dans la bile. L'hyper bilirubinémie est le résultat d'une augmentation de la bilirubine dans le plasma. Les causes les plus probables de la hyper bilirubinémie sont: La bilirubine totale (T): Augmentation de l'hémolyse, altérations génétiques, anémie néonatale, altérations d'éritropoïétines, présence de drogues. Bilirubine directe (D): Choléstase hépatique, altérations génétiques et hépatiques^{1,5,6}. La diagnostique clinique doit tenir compte des données cliniques et de laboratoire.

REACTIFS

| | | |
|------------------|---|------------------------------------|
| R 1 (D) | Acide sulfanilique Acide chlorhydrique (ClH) | 30 mmol/L 150 mmol/L |
| R 2 (T) | Acide sulfanilique Acide chlorhydrique (ClH) Diméthylsulfoxyde (DMSO) | 30 mmol/L 50 mmol/L 7 mmol/L |
| R 3 | Nitrite de sodium | 29 mmol/L |
| Optionnel | BILIRUBIN CAL (Remarque 3) | Réf: 1002250 |

PRECAUTIONS

R1/R2: H290-Peut être corrosif pour les métaux. H314-Provoque des brûlures graves et des lésions oculaires. EUH208-Contient de l'acide sulfanilique. Peut déclencher une réaction allergique. Suivez les conseils de prudence donnés dans la fiche signalétique et l'étiquette du produit.

PREPARATION

Tous les réactifs sont prêts à l'emploi.

CONSERVATION ET STABILITE

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la capsule, et si les capsules sont maintenus hermétiquement fermés à 2-8°C, à l'abri de la lumière et des sources de contamination. Ne pas utiliser les réactifs en dehors de la date indiquée.

Indices de détérioration des réactifs:

- Présence de particules et turbidité.
- Développement de couleurs en R 2.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

- Spectrophotomètre ou analyseur pour les lectures à 555 nm.
- Cuvettes de 1,0 cm d'éclairage.
- Equipement classique de laboratoire.

ECHANTILLONS

Sérum ou plasma sans hémolyse (séparé dès que possible des hématies). A l'abri de la lumière. Stabilité de l'échantillon de par la présence d'hématies: 4 jours à 2-8°C ou 2 mois à -20°C.

PROCEDURE

- Conditions de test:
Longueur d'ondes:555 nm (530-580)
Cuvette:..... 1 cm d'éclairage
Température..... 15-25°C
- Régler le spectrophotomètre sur zéro en fonction de l'eau distillée
- Pipetter dans une cuvette:(Remarque 2)

| | Blanc | B. Totale | Blanc | B. Directe |
|--|-------|-----------|-------|------------|
| R 1 (D) (mL) | -- | -- | 1,5 | 1,5 |
| R 2 (T) (mL) | 1,5 | 1,5 | -- | -- |
| R 3 (µL) | -- | 50 | -- | 50 |
| Echantillon ^(Remarque 1) / Calibreur (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 |

- Mélanger et incuber pendant exactement **5 minutes** à 15-25°C.
- Lire l'absorption (A).

CALCULS

- Avec calibreur:

$$\frac{(A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc Echantillon}}{(A) \text{ Calibreur} - (A) \text{ Blanc Calibreur}} \times \text{Calibreur Conc.} = \text{mg/dL de bilirubine}$$

- Avec facteur:

$$((A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc d'échantillon}) \times \text{Facteur}^* = \text{mg/dL bilirubine dans l'échantillon}$$

$$*\text{Facteur: } \frac{\text{Concentration du Calibreur}}{(A) \text{ Calibreur} - (A) \text{ Blanc Calibreur}}$$

Facteur de conversion: mg/dL x 17,1 = µmol/L.

CONTROLE DE QUALITE

Il est conseillé d'analyser conjointement les échantillons de sérum dont les valeurs ont été contrôlées: SPINTROL H Normal et pathologique (Réf. 1002120 et 1002210). Si les valeurs se trouvent en dehors des valeurs tolérées, analyser l'instrument, les réactifs et le calibreur. Chaque laboratoire doit disposer de son propre contrôle de qualité et déterminer les mesures correctives à mettre en place dans le cas où les vérifications ne correspondraient pas aux attentes.

VALEURS DE REFERENCE¹

Bilirubine totale Jusqu'à 1,10 mg/dL ≅ 18,81 µmol/L
Bilirubine directe Jusqu'à 0,25 mg/dL ≅ 4,27 µmol/L

Ces valeurs sont données à titre indicatif. Il est conseillé à chaque laboratoire de définir ses propres valeurs de référence.

CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

Gamme de mesures: Depuis la limite de détection de (T) 0,00526 mg/dL (D) 0,07 mg/dL jusqu'à la limite de linéarité 18 mg/dL (T) et 20 mg/dL (D).

Si la concentration de l'échantillon est supérieure à la limite de linéarité, diluer 1/2 avec du ClNa 9 g/L et multiplier le résultat final par 2.

Précision:

| Bilirubine T | Intra-série (n= 20) | | Inter-série (n= 20) | |
|--------------|---------------------|------|---------------------|------|
| | Moyenne (mg/dL) | 1,53 | 5,06 | 1,53 |
| SD | 0,03 | 0,05 | 0,03 | 0,11 |
| CV (%) | 1,73 | 1,01 | 1,92 | 2,18 |

| Bilirubine D | Intra-série (n= 20) | | Inter-série (n= 20) | |
|--------------|---------------------|-------|---------------------|-------|
| | Moyenne (mg/dL) | 0,96 | 2,48 | 0,96 |
| SD | 0,024 | 0,051 | 0,043 | 0,035 |
| CV (%) | 2,52 | 2,06 | 4,49 | 1,41 |

Sensibilité analytique: 1 mg/dL = 0,05074 A (T).
1 mg/dL = 0,06856 A (D).

Exactitude: Les réactifs SPINREACT ne montrent pas de différences systématiques significatives lorsqu'on les compare à d'autres réactifs commerciaux.

Les résultats obtenus avec 50 échantillons pour la bilirubine D ont été les suivants:

Coefficient de corrélation (r²): 0,96

Equation de la courbe de régression: y=0,71177x - 0,05267

Les résultats obtenus avec 50 échantillons pour la bilirubine T ont été les suivants:

Coefficient de corrélation (r²): 0,991.

Equation de la Courbe de régression: y=0,82743x - 0,0382

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier suivant l'analyseur employé.

INTERFERENCES

La présence d'hémolyse fait réduire la valeur en bilirubine^{1,2}.

Différentes drogues ont été décrites ainsi que d'autres substances pouvant interférer dans la détermination de la bilirubine^{3,4}.

REMARQUES

- Pour déterminer la bilirubine dans les néonatales, relever à la pipette 50 µL de l'échantillon. Multiplier le résultat obtenu par 2.
- Utilisez pipette jetable propre pour la dispensation.
- Seulement à utiliser dans la bilirubine totale.
- SPINREACT dispose de consignes détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.**

BIBLIOGRAPHIE

- Kaplan A et al. Bilirubine. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241. 436 and 650.
- Malloy H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem 1937; 112, 2; 481-491.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTATION

Ref: 1001044

Cont.

 R 1 (D): 1 x 150 mL
 R 2 (T): 1 x 150 mL
 R 3: 1 x 10 mL

Determinação quantitativa de bilirrubina
IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A bilirrubina converte-se em azobilirrubina mediante o ácido sulfanílico diazotado medindo-se fotométricamente. Das duas fracções presentes no soro, bilirrubina-glucuronido e bilirrubina livre ligada á albumina, só a primeira reage em meio aquoso (bilirrubina directa) precisando a segunda de solubilizar com dimetilsulfóxido (DMSO) para que haja reacção (bilirrubina indirecta). Na determinação da bilirrubina indirecta, determina-se também a directa, correspondendo o resultado à bilirrubina total. A intensidade da coloração é proporcional á concentração de bilirrubina presente na amostra ensaiada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A bilirrubina origina-se pela degradação da hemoglobina. É transportada a partir do baço para o fígado e excretada pela biliar. A hiperbilirrubinemia é o resultado de um aumento da bilirrubina no plasma. As causas mais prováveis da hiperbilirrubinemia são: Bilirrubina Total (T): Aumento da hemólise, alterações genéticas, anemia neonatal, alterações eritropoiéticas, presença de drogas. Bilirrubina Directa (D): Colestase hepática, alterações genéticas e alterações hepáticas^{1,5,6}. O diagnóstico clínico deve realizar-se tendo em conta todos os dados clínicos e laboratoriais.

REAGENTES

| | | |
|-----------------|---------------------------------|--------------|
| R 1 (D) | Ácido sulfanílico | 30 mmol/L |
| | Ácido clorídrico (HCl) | 150 mmol/L |
| R 2 (T) | Ácido sulfanílico | 30 mmol/L |
| | Ácido clorídrico (HCl) | 50 mmol/L |
| | Dimetilsulfóxido (DMSO) | 7 mol/L |
| R 3 | Nitrito de sódio | 29 mmol/L |
| Opcional | BILIRRUBINA CAL (Nota 3) | Ref: 1002250 |

PRECAUÇÕES

R1/R2: H290-Pode ser corrosivo para os metais. H314-Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. EUH208-Contém ácido sulfanílico. Pode provocar uma reacção alérgica.

Seguir os conselhos de prudência dados em SDS e etiqueta.

PREPARAÇÃO

Todos os reagentes estão prontos a ser utilizados.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade indicado na etiqueta, quando os frascos são mantidos bem fechados a 2-8°C, protegidos da luz e se evita a sua contaminação. Não usar reagentes fora de prazo.

Indicadores de deterioração dos reagentes:

- Presença de partículas e turvação.
- Desenvolvimento de cor no R 2.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro ou analisador para leituras a 555 nm.
- Cuvetes de 1,0 cm de passo de luz.
- Equipamento habitual de laboratório.

AMOSTRAS

Soro ou plasma livre de hemólise (separado o mais rapidamente possível de hemácias). Proteger da luz.

Estabilidade da amostra já separada das hemácias: 4 dias a 2-8°C ou 2 meses a -20°C.

PROCEDIMENTO

- Condições do ensaio:
Comprimento de onda:.....555 nm (530-580)
Cuvete:..... 1 cm passo de luz
Temperatura:.....15-25°C
- Ajustar o espectrofotómetro a zero com água destilada.
- Pipetar para uma cuvete: (Nota 2)

| | Branco | B. Total | Branco | B. Directa |
|----------------------------------|--------|----------|--------|------------|
| R 1 (D) (mL) | -- | -- | 1,5 | 1,5 |
| R 2 (T) (mL) | 1,5 | 1,5 | -- | -- |
| R 3 (µL) | -- | 50 | -- | 50 |
| Amostra (Nota 1)/Calibrador (µL) | 100 | 100 | 100 | 100 |

- Misturar e incubar exactamente 5 minutos a 15-25°C.
- Ler a absorvância (A).

CÁLCULOS
– Com Calibrador:

$$\frac{(A)Amostra}{(A)Calibrador} \times \frac{(A)BrancoAmostra}{(A)BrancoCalibrador} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

– Com Factor:

$$((A) Amostra - (A) Branco Amostra) \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirrubina na Amostra}$$

$$\text{*Factor: } \frac{\text{Concentração do Calibrador}}{(A) Calibrador - (A) Branco Calibrador}$$

Factor de conversão: mg/dL x 17,1 = µmol/L.

CONTROLO DE QUALIDADE

É conveniente analisar juntamente com as amostras, os soros controlo valorizados: SPINTROL H Normal e Patológico (Ref. 1002120 e 1002210). Se os valores determinados estiverem fora do intervalo de tolerância, verificar o equipamento, os reagentes e o calibrador. Cada laboratório deve dispor do seu próprio Controlo de Qualidade e estabelecer correcções caso os controlos não cumpram com as tolerâncias.

VALORES DE REFERÊNCIA¹

Bilirrubina Total Até 1,10 mg/dL \cong 18,81 µmol/L

Bilirrubina Directa Até 0,25 mg/dL \cong 4,27 µmol/L

Estes valores são orientativos. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Intervalo de medida: Desde o limite de detecção de (T) 0,00526 mg/dL (D) 0,07 mg/dL até ao limite de linearidade de 18 mg/dL (T) e 20 mg/dL (D).

Se a concentração da amostra for superior ao limite de linearidade, diluir para 1/2 com NaCl 9 g/L e multiplicar o resultado final por 2.

Precisão:

| Bilirrubina T | Intrasérie (n= 20) | | Intersérie (n= 20) | |
|---------------|--------------------|------|--------------------|------|
| | Média (mg/dL) | DP | CV (%) | |
| | 1,53 | 0,03 | 1,73 | |
| | 5,06 | 0,05 | 1,01 | |
| | 1,53 | 0,03 | 1,92 | 2,18 |
| | 5,02 | 0,11 | | |

| Bilirrubina D | Intrasérie (n= 20) | | Intersérie (n= 20) | |
|---------------|--------------------|-------|--------------------|------|
| | Média (mg/dL) | DP | CV (%) | |
| | 0,96 | 0,024 | 2,52 | |
| | 2,48 | 0,051 | 2,06 | |
| | 0,96 | 0,043 | 4,49 | 1,41 |
| | 2,50 | 0,035 | | |

Sensibilidade analítica: 1 mg/dL = 0,05074 A (T).

1 mg/dL = 0,06856 A (D).

Exactidão: Os reagentes de SPINREACT (y) não mostram diferenças sistemáticas significativas quando comparados com outros reagentes comerciais (x).

Os resultados obtidos com 50 amostras para Bilirrubina D foram os seguintes:

Coefficiente de correlação (r)²: 0,96

Equação da recta de regressão: y=0,71177x – 0,05267

Os resultados obtidos com 50 amostras para Bilirrubina T foram os seguintes:

Coefficiente de correlação (r)²: 0,991

Equação da recta de regressão: y=0,82743x – 0,0382

As características do método podem variar segundo o analisador utilizado.

INTERFERÊNCIAS

A presença de hemólise diminui o valor de bilirrubina^{1,2}.

Estão descritas várias drogas e outras substâncias que interferem com a determinação de bilirrubina^{3,4}.

NOTAS

- Para a determinação de bilirrubina em recém-nascidos, pipetar 50 µL de amostra. Multiplicar o resultado obtido por 2.
- Utilização de uma pipeta descartável para distribuição.
- Apenas para ser usado em bilirrubina total.
- SPINREACT dispõe de instruções detalhadas para a aplicação deste reagente em distintos analisadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241. 436 and 650.
- Malloy H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem 1937; 112, 2: 481-491.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

APRESENTAÇÃO

Ref: 1001044

Cont.

R 1 (D): 1 x 150 mL

R 2 (T): 1 x 150 mL

R 3: 1 x 10 mL