

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 dimethylsulphoxide (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^{1,2,3}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Bilirubin is a breakdown product of hemoglobin, insoluble in water. 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: Increase hemolysis, genetic errors, neonatal jaundice, ineffective erythropoiesis, and drugs.

Direct bilirubin: Hepatic cholestasis, genetic errors, hepatocellular damage^{1,6,7}.

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

REAGENTS

R 1	Sulfanilic acid	30 mmol/L
	Hydrochloric acid (HCl)	150 mmol/L
R 2	Sodium nitrite	29 mmol/L
Optional	SPINTROL H CAL	

PRECAUTIONS

R1/RT: Corrosive (C):R35:Causes severe burns.

PREPARATION

Pipette 660 µL of R2 into R1 content. Mix avoiding foam forming and it will be ready to use (WR). Do not use the reagent before 30 min. after the reagent preparation. Working reagent (WR) is stable 24 hours at room temperature and 1 week at 2-8°C.

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 (530-580).
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

NOTES

- For bilirubin determination in newborns, pipette 50 µL of sample. Multiply the result by 2.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

SAMPLES

Serum or plasma, free of hemolysis¹. Protect samples from direct light.

Stability: Bilirubin is stable at 2-8°C for 4 days and 2 months at -20°C.

APPLICATION TO SPINLAB 180

Name	Direct Bilirubin	Ref. male low	0.0
Abbr. Name	DBIL	Ref. male high	0.25
Mode	Endpoint	Ref. female low	0.0
Wavelength	546 nm	Ref. female high	0.25
Units	mg/dL	Ref. Ped. Low	0.0
Decimals	2	Ref. Ped. High	12.0
Low Conc.	0.1 mg/dL	Control 1	*
High Conc.	15.0 mg/dL	Control 2	*
Calibrator name	CAL	Control 3	*
Prozone check	No	Correlat. factor	1.000
		Correlat. offset	0.000
MONO MODE			
Sample blank	No		
R1 bottle (mL)	25 mL		
normal volume	250 µL		
rerun volume	250 µL		
Sample			
normal volume	25.0 µL		
rerun volume	15.0 µL		
Predilución	No		
Incubation time	11.5 min.		
Factor			
Reagent blank	Yes (0.000)		
Low Absorbance	-0.100 Abs		
High Absorbance	3.000 Abs		
R. Abs. L. Limit	-0.100 Abs		
R. Abs. H. Limit	3.000 Abs		

NOTE: Using control and/or calibrators low valued for this parameters, a sample blank must be performed (Sample Blank Yes) in order to avoid color sample interference. R1 must be used without R2.

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 Direct: Up to 0.25 mg/dL \cong 4.27 µmol/L

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

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.*
- Martinek R. *Improved micro-method for determination of serum bilirubin. Clin Chim 1966: Acta 13: 61-170.*
- 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: SP1001043

Cont.

R 1: 10 x 25 mL

R 2: 2 x 5 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-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, solo 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 probables de la hiperbilirrubinemia : Bilirrubina Total: Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas.

Bilirrubina Directa: Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas^{1,6,7}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Ácido sulfanílico	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico (ClH)	150 mmol/L
R 2	Sodio nitrito	29 mmol/L
Opcional	SPINTROL H CAL	

PRECAUCIONES

R1 /RT: Corrosivo (C): R35: Provoca quemaduras graves.

PREPARACIÓN

Pipetear 660 µL de R2 en un frasco de R1. Mezclar evitando la formación de espuma y quedará listo para usar (RT). Dejar reposar el reactivo unos 30 min. antes de usar.

La estabilidad del reactivo de trabajo (RT) es de 24 horas a temperatura ambiente o 1 semana a 2-8°C.

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 R 2.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro ó analizador para lecturas a 555 nm (530-580).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

NOTAS

1. Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 2.
2. **SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis¹. Proteger de la luz.

Estabilidad de la muestra: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

APLICACIÓN AL SPINLAB 180

Nombre	Bilirrubina Directa	Ref. Hombre Inf.	0.0
Nombre abreviado	BILD	Ref. Hombre Sup.	0.25
Modo	Endpoint	Ref. Mujer Inf.	0.0
Long. ondas	546 nm	Ref. Mujer Sup.	0.25
Unidades	mg/dL	Ref. Ped. Inf.	0.0
Decimales	2	Ref. Ped. Sup.	12.0
Conc. Inferior	0.1 mg/dL	Valor pánico bajo	*
Conc. Superior	15.0 mg/dL	Valor pánico alto	*
Calibrador	CAL	Control 1	*
Chequeo prozona	No	Control 2	*
		Control 3	*
		Factor correl.	1.000
		Offset de correl.	0.000
MODO MONO			
Blanco muestra	No		
Frasco R1 (mL)	25 mL		
Vol. normal	250 µL		
Vol. repet.	250 µL		
Muestra			
Vol. normal	25.0 µL		
Vol. repet.	15.0 µL		
Predilución	No		
Incubación	11,5 min.		
Factor			
Blanco reactivo	Si (0.000)		
Absorbancia inf.	-0.100 Abs		
Absorbancia sup.	3.000 Abs		
Lim. Inf. Abs. React.	-0.100 Abs		
Lim. Sup. Abs. React.	3.000 Abs		

NOTA: Para controles y/o calibradores con una concentración baja de este parámetro será necesario cambiar el Blanco de muestra a Sí para así evitar la interferencia por el color de la propia muestra. Deberá medirse con R1 sin añadir R2.

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 Directa: Hasta 0,25 mg/dL \cong 4.27 µmol/L

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

BIBLIOGRAFÍA

1. Kaplan A et al. *Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1238-1241. 436 and 650.
2. Malloy H T. et al. *The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem* 1937; 112, 2; 481-491.
3. Martinek R. *Improved micro-method for determination of serum bilirubin. Clin Chim* 1966: Acta 13: 61-170.
4. Young DS. *Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.*
5. Young DS. *Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.*
6. Burtis A et al. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.*
7. Tietz N W et al. *Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.*

PRESENTACIÓN

Ref: SP1001043 Cont. R 1: 10 x 25 mL
R 2: 2 x 5 mL