

Quantitative determination of total bilirubin IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

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

CLINICAL SIGNIFICANCE

Bilirubin is caused by the degradation of hemoglobin and exists in two forms. Unconjugated bilirubin is transported to the liver bound by albumin where it becomes conjugated (direct) with glucuronic acid and excreted. Hyperbilirubinemia is the result of an increase of bilirubin in plasma.

Possible causes:

Total bilirubin: Increase hemolysis, genetic alteration, neonatal anemia, erythropoiesis alterations and presence of drugs.

Direct Bilirubin: cholestasis liver, liver abnormalities and genetic.

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

REAGENTS

R 1	Surfactants Hydrochloric acid (HCl)	<1% 160 mM
R 2	2,4-DPD Hydrochloric acid (HCl) Surfactant	≥2 mM 120 mM <1%

PRECAUTIONS

R1/ R2: H290- Corrosive to metals. H314 - Irritation or skin corrosion.

R1: contains HCl and Triton X-114. R2: contains HCl and 2,4-DPD.

Follow the safety advice given in MSDS and product label.

PREPARATION

The reagents are provided in a ready to use format.

STORAGE AND STABILITY

The reagents are stable until the expiry date stated on the label when stored at 2-8°C, protected from light and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 546 nm.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or plasma, free of hemolysis. Protect samples from light.

Stability of the sample: 4 days at 2-8°C or 2 months at -20°C.

REFERENCE VALUES

Total bilirubin 0,2-1,2 mg/dL (3,4 – 20,5 μmol/L)

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

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.

INTERFERENCES

Interferences from hemolysis, lipemia and a. ascorbic were evaluated for this total bilirubin method on a Spintech 240 analyzer. Two concentrations of total bilirubin were evaluated. No interferences were observed for lipemia (Intralipid) up to 1800 mg/dL, hemoglobin up to 2000 mg/dL and ascorbic acid up to 40 mg/L.

A list of drugs and other interfering substances with bilirubin has been reported by Young et. al ^{4,5}.

APPLICATION SPINLAB 180

Name	BILIRUBIN T	Ref. male low	*
Abbr.name	BILT	Ref. male high	*
Mode	Twopoint	Ref. female low	*
Wavelength	546 nm	Ref. female high	*
Units	mg/dL	Ref. Ped. low	*
Decimals	2	Ref. Ped. high	*
Low conc.	0.1 mg/dL	Valor pánico bajo	*
High conc.	30.0 mg/dL	Valor pánico alto	*
Calibrator	*	Control 1	*
Prozone check	No	Control 2	*
		Control 3	*
		Correlat. factor	1.000
		Correlat. offset	0.000
DUAL MODE		MONO MODE	
Sample blank	No	Sample blank	No
R1 bottle (mL)	25 mL	R1 bottle (mL)	25 mL
Normal volume	240 μL	Normal volume	** μL
Rerun volume	240 μL	Rerun volume	** μL
Sample		Sample	
Normal volume	12.0 μL	Normal volume	** μL
Rerun volume	12.0 μL	Rerun volume	** μL
R2 bottle (mL)	5 mL		
Normal volume	60 μL		
Rerun volume	60 μL		
Predilution	No		
Incubation time	-3.236 seg.	Incubation time	**
Factor	**	Factor	**
Reagent blank	Yes (0,000)	Reagent blank	Yes (0,000)
Low Absorbance	-0.100 Abs Abs	Low Absorbance	-0.100 Abs Abs
High Absorbance	3.000 Abs Abs	High Absorbance	3.000 Abs Abs
R.Abs.L.Limit	-0.100 Abs Abs	R.Abs.L.Limit	-0.100 Abs Abs
R.Abs.H.Limit	3.000 Abs Abs	R.Abs.H.Limit	3.000 Abs Abs

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From *quantification limit* of 0,1 mg/dL to *linearity limit* of 30 mg/dL.

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

Precision:

Mean (mg/dL)	Inter assay (n= 40)		Intra assay (n= 80)	
		1,169	5,0485	1,1682
SD	0,0285	0,0594	0,012	0,046
CV (%)	2,4	1,2	1,0	0,9

Sensitivity: 1 mg/dL = 0,033 Abs. units.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x) on a Spintech 240 analyzer. The results obtained using 61 samples ranging from 0,42 a 19,36 mg/dL (7,18 to 331,056 μmol/L) were:

Correlation coefficient: (r) 0,996

Regression equation: $y = 0,9836x + 0,1644$

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

NOTES

1. SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

BIBLIOGRAPHY

1. David G Levitt and Michael D Levitt. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. Clin Exp Gastroenterol. 2014; 7: 307–328.
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.

PACKAGING

Ref: SP1001046	Cont.	R 1: 10 x 20 mL
		R 2: 10 x 5 mL

Determinación cuantitativa de bilirrubina total IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina total (tanto conjugada como no conjugada) se une con el agente diazo en presencia de un surfactante para formar azobilirrubina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada. El aumento de la absorbancia a 546 nm es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina total.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina y existe en dos formas. La bilirrubina no conjugada se transporta al hígado, unida por la albúmina, donde se convierte en conjugada (directa) con el ácido glucurónico y se excreta. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más 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.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Surfactantes	<1%
	Ácido clorhídrico (HCl)	160 mM
R 2	2,4-DPD	≥2 mM
	Ácido clorhídrico (HCl)	120 mM
	Surfactante	<1%

PRECAUCIONES

R1/ R2: H290- Corrosivo para los metales. H314-Irritación o corrosión cutánea.

R1: contiene HCl y Triton X-114. R2: contiene HCl y 2,4-DPD.

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

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen 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.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 546 nm.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

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.

VALORES DE REFERENCIA

Bilirrubina Total 0,2-1,2 mg/dL (3,4-20,5 μmol/L)

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

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.

INTERFERENCIAS

Las interferencias debidas a la hemólisis, lipemia y a. ascórbico se evaluaron para este método de bilirrubina total en un analizador 240 Spintech. Se evaluaron dos concentraciones de la bilirrubina total. No se observaron interferencias para la lipemia (Intralipid) hasta 1800 mg/dL, hemoglobina hasta 2000 mg/dL y el ácido ascórbico hasta 40 mg/L.

Una lista de medicamentos y otras sustancias que interfieren en la bilirrubina ha sido reportado por Young et. al.^{4,5}

APLICACIÓN AL SPINLAB 180

Nombre	BILIRRUBINA T	Ref. Hombre Inf.	*
Nombre abreviado	BILT	Ref. Hombre Sup.	*
Modo	Dos puntos	Ref. Mujer Inf.	*
Long. ondas	546 nm	Ref. Mujer Sup.	*
Unidades	mg/dL	Ref. Ped. Inf.	*
Decimales	2	Ref. Ped. Sup.	*
Conc. Inferior	0.1 mg/dL	Valor pánico bajo	*
Conc. Superior	30.0 mg/dL	Valor pánico alto	*
Calibrador	*	Control 1	*
Chequeo prozona	No	Control 2	*
		Control 3	*
		Factor correl.	1.000
		Offset de correl.	0.000
MODO DUAL		MODO MONO	
Blanco muestra	No	Blanco muestra	No
Frasco R1 (mL)	25 mL	Frasco R1 (mL)	25 mL
Vol. normal	240 μL	Vol. Normal	** μL
Vol. repet.	240 μL	Vol. repet.	** μL
Muestra		Muestra	
Vol. normal	12.0 μL	Vol. normal	** μL
Vol. repet.	12.0 μL	Vol. repet	** μL
Frasco R2 (mL)	5 mL		
Vol. Normal	60 μL		
Vol. repet.	60 μL		
Predilución	No		
Incubación	-3.236 seg.	Incubación	**
Factor	**	Factor	**
Blanco reactivo	SI (0.000)	Blanco reactivo	SI (0.000)
Absorbancia inf.	-0.100 Abs Abs	Absorbancia inf.	-0.100 Abs Abs
Absorbancia sup.	3.000 Abs Abs	Absorbancia sup.	3.000 Abs Abs
Lim.Inf. Abs. React.	-0.100 Abs Abs	Lim.Inf. Abs. React.	-0.100 Abs Abs
Lim.Sup. Abs. React.	3.000 Abs Abs	Lim.Sup. Abs. React.	3.000 Abs Abs

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de cuantificación de 0,1 mg/dL hasta el límite de linealidad de 30 mg/dL.

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

Precisión:

	Interserie (n= 40)		Intraserie (n= 80)	
Media (mg/dL)	1,169	5,0485	1,1682	5,0485
SD	0,0285	0,0594	0,012	0,046
CV (%)	2,4	1,2	1,0	0,9

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,033 Abs.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x) con el analizador de Spinreact, Spintech 240.

Los resultados obtenidos con 61 muestras con valores de entre 0,42 a 19,36 mg/dL (7,18 a 331,056 μmol/L) fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,996

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0,9836x + 0,1644$

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

NOTAS

1. SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- David G Levitt and Michael D Levitt. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. Clin Exp Gastroenterol. 2014; 7: 307-328.
- 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.

PRESENTACIÓN

Ref: SP1001046	Cont.	R 1: 10 x 20 mL
		R 2: 10 x 5 mL

Determinação quantitativa de bilirrubina total IVD

Conservar entre 2-8 °C

PRINCÍPIO DO MÉTODO

A bilirrubina total (tanto conjugada como não conjugada) liga-se ao agente diazo na presença de um surfactante para formar azobilirrubina. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de bilirrubina presente na amostra testada. O aumento da absorvância a 546 nm é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina total.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A bilirrubina resulta da degradação da hemoglobina e existe em duas formas. A bilirrubina não conjugada é transportada para o fígado ligada à albumina, onde se converte na forma conjugada (direta) com o ácido glicurónico e é excretada. A hiperbilirrubinemia é o resultado de um aumento da bilirrubina no plasma. Causas mais prováveis da:

Bilirrubina Total: Aumento da hemólise, alterações genéticas, anemia neonatal, alterações eritropoiéticas, presença de fármacos.

Bilirrubina direta: Colestase hepática, alterações genéticas e alterações hepáticas.

O diagnóstico clínico deve realizar-se tendo em consideração todos os dados clínicos e laboratoriais.

REAGENTES

R 1	Surfactantes	<1%
	Ácido clorídrico (HCl)	160 mM
R 2	2,4-DPD	≥ 2mM
	Ácido clorídrico (HCl)	120 mM
	Surfactante	<1%

PRECAUÇÕES

R1/ R2: H290 - Pode ser corrosivo para os metais. H314- Provoca irritação ou corrosão cutânea.

R1: contém HCl e Triton X-114. R2: contém HCl e 2,4-DPD.

Seguir os conselhos de prudência indicados na FDS e na etiqueta do produto.

PREPARAÇÃO

Todos os reagentes estão prontos a ser utilizados.

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Os reagentes são estáveis até ao prazo de validade indicado na etiqueta, quando os frascos são mantidos bem fechados, a uma temperatura entre 2-8 °C, protegidos da luz e se evita a sua contaminação. Não utilizar reagentes que tenham ultrapassado o prazo indicado.

Indicadores de degradação dos reagentes:

- Presença de partículas e turvação.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Espectrofotómetro ou analisador capaz de medir a absorvância a 546 nm.
- Equipamento habitual de laboratório.

AMOSTRAS

Soro ou plasma livre de hemólise. Proteger da luz.

Estabilidade da amostra: durante 4 dias a 2-8 °C ou durante 2 meses a -20 °C.

VALORES DE REFERÊNCIA

Bilirrubina Total 0,2 - 1,2 mg/dl (3,4 - 20,5 µmol/l)

Estes valores são orientativos. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CONTROLO DE QUALIDADE

É conveniente analisar juntamente com as amostras de soro de controlo avaliados:

SPINTROL H Normal e Patológico (Ref. 1002120 e 1002210).

Se os valores determinados se encontrarem fora do intervalo de tolerância, devem de-se verificar o aparelho, os reagentes e a calibração.

Cada laboratório deve dispor do seu próprio Controlo de Qualidade e estabelecer procedimentos de correção no caso de os controlos não cumprirem as tolerâncias.

APLICAÇÃO AO SPINLAB 180

Name	BILIRUBIN T	Ref. male low	*
Abbr.name	BILT	Ref. male high	*
Mode	Twopoint	Ref. female low	*
Wavelength	546 nm	Ref. female high	*
Units	mg/dL	Ref. Ped. low	*
Decimals	2	Ref. Ped. high	*
Low conc.	0.1 mg/dL	Valor pánico bajo	*
High conc.	30.0 mg/dL	Valor pánico alto	*
Calibrator	*	Control 1	*
Prozone check	No	Control 2	*
		Control 3	*
		Correlat. factor	1.000
		Correlat. offset	0.000
DUAL MODE		MONO MODE	
Sample blank	No	Sample blank	No
R1 bottle (mL)	25 mL	R1 bottle (mL)	25 mL
Normal volume	240 µL	Normal volume	** µL
Rerun volume	240 µL	Rerun volume	** µL
Sample		Sample	
Normal volume	12.0 µL	Normal volume	** µL
Rerun volume	12.0 µL	Rerun volume	** µL
R2 bottle (mL)	5 mL		
Normal volume	60 µL		
Rerun volume	60 µL		
Predilution	No		
Incubation time	-3.236 seg.	Incubation time	**
Factor	**	Factor	**
Reagent blank	Yes (0.000)	Reagent blank	Yes (0.000)
Low Absorbance	-0.100 Abs Abs	Low Absorbance	-0.100 Abs Abs
High Absorbance	3.000 Abs Abs	High Absorbance	3.000 Abs Abs
R.Abs.L.Limit	-0.100 Abs Abs	R.Abs.L.Limit	-0.100 Abs Abs
R.Abs.H.Limit	3.000 Abs Abs	R.Abs.H.Limit	3.000 Abs Abs

INTERFERÊNCIAS

As interferências devidas a hemólise, lipémia e ácido ascórbico foram avaliadas neste método de bilirrubina total num analisador Spintech 240. Foram avaliadas duas concentrações de bilirrubina total. Não foram observadas interferências da lipémia (Intralipid) até 1800 mg/dl, da hemoglobina até 2000 mg/dl e do ácido ascórbico até 40 mg/l. Uma lista de medicamentos e outras substâncias que interferem com a bilirrubina foi reportada por Young et. al^{4,5}.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Intervalo de medição: Desde o limite de deteção de 0,1 mg/dl até ao limite de linearidade de 30 mg/dl.

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

Precisão:

Média (mg/dl)	Inter-série (n=40)		Intra-série (n=80)	
	1,169	5,0485	1,1682	5,0485
SD	0,0285	0,0594	0,012	0,046
CV (%)	2,4	1,2	1,0	0,9

Sensibilidade analítica: 1 mg/dl = 0,033Abs.

Exatidão: Os reagentes SPINREACT (y) não apresentam diferenças sistemáticas significativas quando comparados com outros reagentes comerciais (x) com o analisador da Spinreact, Spintech 240.

Os resultados obtidos com 61 amostras com valores entre 0,42 a 19,36 mg/dl (7,18 a 331,056 µmol/l) foram os seguintes:

Coefficiente de correlação (r): 0,996

Equação da reta de regressão: $y = 0,9836x + 0,1644$

As características do método podem variar em função do analisador utilizado.

NOTAS

1. **A SPINREACT dispõe de instruções detalhadas para a aplicação deste reagente em diferentes analisadores.**

BIBLIOGRAFIA

1. David G Levitt and Michael D Levitt. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. Clin Exp Gastroenterol. 2014; 7: 307-328.
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.

APRESENTAÇÃO

Ref: SP1001046

Cont.

R 1: 10 x 20 ml
R 2: 10 x 5 ml