

Quantitative determination of direct bilirubin IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Direct bilirubin (conjugated) couples with the diazo reagent in the presence of sulfamic acid 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 direct 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, neonatal jaundice, ineffective erythropoiesis and presence of drugs. **Direct bilirubin:** Hepatic cholestasis, genetic, hepatocellular damage.

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

REAGENTS

R 1	Sulfamic acid	100 mM
R 2	2,4-DPD	0,5 mM
	Hydrochloric acid (HCl)	0,3 M

PRECAUTIONS

R1: H314 - Irritation or skin corrosion. / R2: H290- Corrosive to metals. H335 - May cause respiratory irritation. H314 - Irritation or skin corrosion.

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 month at -20°C.

REFERENCE VALUES

Direct bilirubin 0 – 0,5 mg/dL (0 – 8,6 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: SPINCONTROL 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.

APPLICATION SPINLAB 180

Name	BILIRUBIN D	Ref. male low	*
Abbr.name	BILD	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.	0.03 mg/dL	Valor pánico bajo	*
High conc.	9.00 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	15.0 µL	Normal volume	** µL
Rerun volume	15.0 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

The Calibration is stable until **7 days**. After this period the Calibration must be performed again in order to obtain good results.

INTERFERENCES

Interferences from hemolysis, lipemia and ascorbic acid were evaluated for this direct bilirubin method on a Spintech 240 analyzer. Two concentrations of direct bilirubin were evaluated. No interferences were observed for lipemia (Intralipid) up to 350 mg/dL and ascorbic acid up to 40 mg/L. Hemolysis causes decreased direct bilirubin values.

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

NOTES

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

BIBLIOGRAPHY

- 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.

PACKAGING

Ref: SP1001047	Cont.	R 1: 10 x 20 mL
		R 2: 10 x 5 mL

Determinación cuantitativa de bilirrubina directa IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina directa (conjugada) se combina con la sal de diazonio en presencia de un ácido sulfámico para formar el compuesto coloreado, 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 directa.

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	Ácido sulfámico	100 mM
R 2	2,4-DPD Ácido clorhídrico (HCl)	0,5 mM 0,3 M

PRECAUCIONES

R1: H314-Irritación o corrosión / R2: H290- Corrosivo para los metales. H335 - Puede irritar las vías respiratorias. H314-Irritación o corrosión.

R2: contiene HCl and 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 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.

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 Directa 0- 0,5 mg/dL (0 -8,6 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.

APLICACIÓN AL SPINLAB 180

Nombre	BILIRRUBINA D	Ref. Hombre Inf.	*
Nombre abreviado	BILD	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	0.03 mg/dL	Valor pánico bajo	*
Conc. Superior	9.00 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	15.0 µL	Vol. normal	** µL
Vol. repet.	15.0 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

La Calibración es estable hasta **7 días**. Pasado este período es necesario solicitar de nuevo la Calibración para la obtención de buenos resultados.

INTERFERENCIAS

Las interferencias debidas a la hemólisis, lipemia y a. ascórbico se evaluaron para este método de bilirrubina directa en un analizador 240 Spintech. Se evaluaron dos concentraciones de la bilirrubina directa. No se observaron interferencias para la lipemia (Intralipid) hasta 350 mg /dL y ácido ascórbico hasta 40 mg/L.

La hemólisis produce una interferencia considerable, por lo que no se deben emplear muestras hemolizadas.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de la bilirrubina^{4,5}.

NOTAS

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

BIBLIOGRAFÍA

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.

PRESENTACIÓN

Ref: SP1001047

Cont.

R 1: 10 x 20 mL

R 2: 10 x 5 mL