

Bilirubin Direct

DMSO. Colorimetric

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. 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

PRECAUTIONS

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

PREPARATION

Pipette 1.2 mL 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.

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

- MINDRAY BS-120 / BS-200 Autoanalyser.
- General laboratory equipment.

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.

MINDRAY BS-120 / BS-200E APPLICATION

PARAMETERS			
Test	BILD	R1	250
Nº	**	R2	*
Full Name	BILIRRUBIN	Sample Volume	25
Standard nº		R1 Blank	
Reac. type	Endpoint	Mixed Rgt Blank	
Pri. Wavelength	546 nm	Linearity range	0.1 - 15.0
Sec. Wavelength		Linearity limit	*
Direction	Increase	Substrate limit	*
Reac. time	1-33 / -1-45	Factor	*
Incub. Time		Prozone check	*
Units	mg/dL	q1	q2
Precision	0.01/0.1	q3	q4
		PC	Abs
CALIBRATION (Cal + Rg Blk)			
Rule	One-point Linear / Two-point linear		
Sensitivity	1		
Replicates	2		
Interval (days)	0		
Difference limit			
SD			
Blank Response			
Error Limit			
Correlation coefficient			

Blank parameter must be performed in order to get good results in CALIB screen from main menu. The blank calibration is stable until 20 days. After this period the blank parameter must be performed again in order to validate the calibration.

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 $\approx$ 4.27 μ mol/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: MI1001043	Cont.	R 1: 5 x 30 mL
		R 2: 1 x 10 mL

Bilirrubina Directa

DMSO. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de bilirrubina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

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 CLINICO

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: 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

PRECAUCIONES

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

PREPARACION

Pipetear 1.2 mL 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.

CONSERVACION 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

- Autoanalizador MINDRAY BS-120 / BS-200
- 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.

APLICACIÓN AL MINDRAY BS-120 / BS-200E

PARAMETROS			
Nombre Abrev	BILD	R1	250
Numero	**	R2	*
Nombre	BILIRRUBINA	Volumen muestra	25
Num standard		Blanco R1	
Modo	Punto final	Blanco mezcla reactivo	
Long onda primaria	546 nm	Rango	0.1-15.0
Long onda secundaria		Límite linealidad	*
Dirección	Aumentar	Límite Substrato	*
Tiempo reacción	1-33 / -1-45	Factor	*
Tiempo Incubación		Efecto Prozona	*
Unidades	mg/dL	q1	q2
Precisión	0.01 / 0.1	q3	q4
		PC	Abs
CALIBRACIÓN (Cal + BI reactivo)			
Tipo curva	Lineal un punto / Lineal dos puntos		
Sensibilidad	1		
Replicados	2		
Intervalos (días)	0		
Límite aceptación			
Desviación Estandar			
Respuesta del Blanco			
Error Límite			
Coefficiente correlación			

Es necesario solicitar el blanco en este parámetro para obtener resultados correctos en la pantalla principal de CALIB. La Calibración junto al blanco de reactivo es estable hasta **20 días**. Pasado este período es necesario solicitar de nuevo el blanco de reactivo para hacer validar la calibración.

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 μ mol/L

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

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.
- 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.

PRESENTACION

Ref: MI1001043

Cont.

R 1: 5 x 30 mL

R 2: 1 x 10 mL