

Total and Direct Bilirubin

Jendrassik – Grof. 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 caffeine 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: Increased 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 Hydrochloric acid (HCl)	30 mmol/L 400 mmol/L
R 2	Sodium nitrite	50 mmol/L
R 3	Caffeine	100 mmol/L
Optional	BILIRUBIN CAL	Ref: 1002250

PRECAUTIONS

R1: H290-May be corrosive to metals. H314-Causes severe burns and eye damage. EUH208-Contains sulfanilic 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 540 nm.
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- 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.

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 540 nm
Cuvette: 1 cm light path
Temperature 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette:

	Total B.	Direct B.	Blank
R 1 (µL)	200	200	200
R 2 (drop)	1	1	--
NaCl 9 g/L (mL)	--	2,0	2,0
R 3 (mL)	2,0	--	--
Sample / Calibrator (µL) (Note 1)	200	200	200

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

CALCULATIONS

- With Calibrator:

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

- **Theoretical calculation:** In the absence of a suitable calibrator, theoretical factors can be used, only as guidelines. The calculation with calibrator is the most appropriate.

Calculation: (A) Sample - (A) Blank Sample x Factor = mg / dL bilirubin

Total Bilirubin Factor: 13,8

Direct Bilirubin Factor: 10,4

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

Total Bilirubin in adults Up to 1,10 mg/dL ≅ 18,81 µmol/L

Total Bilirubin in newborns <12 mg/dL ≅ < 205,2 µmol/L

Direct Bilirubin 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) 0,0926 mg/L (D) 0,0453 to *linearity limit* of 20 mg/dL. (T&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:

T Bilirubin	Intraserie (n= 20)	
Mean (mg/dL)	1,16	4,21
SD	0,02	0,04
CV (%)	2,03	1,06

Interserie (n= 20)	
1,15	4,27
0,02	0,13
1,91	3,10

D Bilirubin	Intra-assay (n=20)	
Mean (mg/dL)	0,78	2,28
SD	0,01	0,01
CV (%)	1,28	0,65

Inter-assay (n=20)	
0,80	2,18
0,01	0,03
1,63	1,53

Sensitivity: (T) 1 mg/dL = 0,07880 (A). (D) 1 mg/dL = 0,12772 (A).

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

The results obtained using 50 samples were the following:

TOTAL BILIRUBIN

Correlation coefficient (r)²: 0,9894

Regression equation: y= 0,9832x + 0,0224.

DIRECT BILIRUBIN

Correlation coefficient (r)²: 0,9867

Regression equation: y= 0,9923x + 0,0048.

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

INTERFERENCES

Hemolysis causes decreased bilirubin values^{1,2,3}.

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

NOTES

- For bilirubin determination in newborns, pipette 50 µL of sample. Multiply the result by 4.
- 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.
- Jendrassik L et al. Biochemische Zeitschrift Band 1938; 297:80-89.
- 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: 1001041

Cont.

R 1: 1 x 60 mL

R 2: 1 x 10 mL

R 3: 1 x 150 mL



Bilirrubina Total y Directa

Jendrassik – Grof. Colorimétrico

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, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con cafeína 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^{1,2,3}.

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: 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	400 mmol/L
R 2	Sodio nitrito	50 mmol/L
R 3	Cafeína	100 mmol/L
Opcional	BILIRUBIN CAL	Ref:1002250

PRECAUCIONES

R1: 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 con cubeta para lecturas a 540 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- 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.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 540 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	B. Total	B. Directa	Blanco
R 1 (µL)	200	200	200
R 2 (gotas)	1	1	--
ClNa 9 g/L (mL)	--	2,0	2,0
R 3 (mL)	2,0	--	--
Muestra / Calibrador (µL) ^(Nota 1)	200	200	200

- Mezclar e incubar exactamente **5 minutos** a 15-25°C.
- Medir la absorbancia (A) del calibrador y la muestra.

CÁLCULOS

- Con Calibrador:

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

-**Cálculo teórico:** En ausencia de un calibrador adecuado, se pueden utilizar factores teóricos, solo como orientativos. El cálculo con calibrador es el más adecuado.

Cálculo: (A) Muestra - (A) Blanco Muestra x Factor = mg/dL de bilirrubina

Factor Bilirrubina Total: 13,8

Factor Bilirrubina Directa: 10,4

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

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL 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 en adultos	Hasta 1,10 mg/dL ≅ 18,81 µmol/L
Bilirrubina Total en recién nacidos	<12 mg/dL ≅ < 205,2 µmol/L
Bilirrubina Directa	Hasta 0,25 mg/dL ≅ 4,275 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) 0,0926 mg/dL (D) 0,0453 mg/dL hasta el *límite de linealidad* de 20 mg/dL (T y D).

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:

Bilirrubina T	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
	Media (mg/dL)	SD	Media (mg/dL)	SD
Media (mg/dL)	1,16	0,02	1,15	0,02
SD	0,02	0,04	0,02	0,13
CV (%)	2,03	1,06	1,91	3,10

Bilirrubina D	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
	Media (mg/dL)	SD	Media (mg/dL)	SD
Media (mg/dL)	0,78	0,01	0,80	0,01
SD	0,01	0,01	0,01	0,03
CV (%)	1,28	0,65	1,63	1,53

Sensibilidad analítica: (T) 1 mg/dL = 0,07880 (A). (D) 1 mg/dL = 0,12772 (A).

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x). Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

BILIRRUBINA TOTAL

Coefficiente de correlación (r)²: 0,9894.

Ecuación de la recta de regresión: y= 0,9832x + 0,0224.

BILIRRUBINA DIRECTA

Coefficiente de correlación (r)²: 0,9867.

Ecuación de la recta de regresión: y= 0,9923x + 0,0048.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina^{1,3}.

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

NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 4.
- 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.
- Jendrassik L et al. Biochemische Zeitschrift Band 1938; 297:80-89.
- 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: 1001041

Cont.

R 1: 1 x 60 mL
R 2: 1 x 10 mL
R 3: 1 x 150 mL

Bilirubine totale et directe

Jendrassik – Grof. Colorimétrie

Détermination quantitative de bilirubine IVD

Conserver à 2-8°C

PRINCIPE DE LA METHODE

La bilirubine se transforme en azobilirubine au moyen de l'acide sulfanilique diazoté et se mesure par photométrie. Des deux fractions présentes dans le sérum, bilirubine-glucuronide et bilirubine libre liée à l'albumine, seule la première réagit en milieu aqueux (bilirubine directe), la seconde demandant une solubilisation avec de la caféine pour réagir (bilirubine indirecte). Dans la détermination de la bilirubine indirecte, on détermine également la directe, ce qui permet ainsi d'obtenir le résultat de la bilirubine totale.

L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de bilirubine présente dans l'échantillon testé^{1,2,3}.

SIGNIFICATION CLINIQUE

La bilirubine est produite par la dégradation de l'hémoglobine. Elle est transportée de la rate vers le foie et est excrétée dans la bile. L'hyperbilirubinémie est le résultat d'une augmentation de la bilirubine dans le plasma. Causes plus probables de l'hyperbilirubinémie : Bilirubine Totale : Augmentation de l'hémolyse, altérations génétiques, anémie néonatale, altérations érythropoïétiques, présence de drogues. Bilirubine Directe : Cholestase hépatique, altérations génétiques et altérations hépatiques^{1,6,7}. Le diagnostic clinique doit être réalisé en tenant compte de toutes les données cliniques et de laboratoire.

RÉACTIFS

R 1	Acide sulfanilique Acide chlorhydrique	30 mmol/L 400 mmol/L
R 2	Nitrite de sodium	50 mmol/L
R 3	Caféine	100 mmol/L
Optionnel	BILIRUBINE CAL	Réf.:1002250

PRÉCAUTIONS

R1; H290-Peut être corrosif pour les métaux. H314-Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. EUH208-Contient acide sulfanilique. Peut produire une réaction allergique. Suivez les conseils de prudence donnés en SDS et étiquette.

PRÉPARATION

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, et si les flacons 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 la couleur dans le R 2.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

- Spectrophotomètre ou analyseur pour les lectures à 540 nm.
- Cuvettes de 1,0 cm d'éclairage.
- Equipement classique de laboratoire.

ÉCHANTILLONS

Sérum ou plasma sans hémolyse¹. Protéger de la lumière. Stabilité de l'échantillon : 4 jours à 2-8°C ou 2 mois à -20°C.

PROCEDURE

- Conditions de test:
Longueur d'ondes: 540 nm
Cuvette: 1 cm d'éclairage
Température: 15 - 25°C
- Régler le spectrophotomètre sur zéro en fonction de l'eau distillée.
- Pipeter dans une cuvette:

	B. Totale	B. Directe	Blanc
R 1 (µL)	200	200	200
R 2 (gouttes)	1	1	--
ClNa 9 g/L (mL)	--	2,0	2,0
R 3 (mL)	2,0	--	--
Échantillon / Étalon (µL) (Remarque 1)	200	200	200

- Mélanger et incubé exactement **5 minutes** à 15-25°C.
- Mesurer l'absorbance (A) de l'étalon et de l'échantillon.

CALCULS

- Avec Étalon :

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

- **Calcul théorique:** En l'absence d'un calibrateur adéquat, des facteurs théoriques peuvent être utilisés, uniquement en tant que lignes directrices. Le calcul avec étalon est le plus approprié.

Calcul: (A) Échantillon - (A) Échantillon blanc x Facteur = mg / dL bilirubine

Facteur total de bilirubine: 13,8

Facteur direct de bilirubine: 10,4

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 calibre.

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 adulte Jusqu'à 1,1 mg/dL \cong 18,81 µmol/L

Bilirubine Totale chez les nouveau-nés <12 mg/dL \cong < 205,2 µmol/L

Bilirubine Directe Jusqu'à 0,25 mg/dL \cong 4,275 µmol/L

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

CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

Plage de mesure: Depuis la limite de détection de (T) 0,0926 mg/dL (D) 0,0453 mg/dL jusqu'à la limite de linéarité de 20 mg/dL. (T & D).

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

Précision:

Bilirubine T	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
	Moyenne (mg/dL)	1,16	4,21	1,15
SD	0,02	0,04	0,02	0,13
CV (%)	2,03	1,06	1,91	3,10

Bilirubine D	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
	Moyenne (mg/dL)	0,78	2,28	0,80
SD	0,01	0,01	0,01	0,03
CV (%)	1,28	0,65	1,63	1,53

Sensibilité analytique: (T) 1 mg/dL = 0,07880 A. (D) 1 mg/dL = 0,12772 A.

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

Les résultats obtenus avec 50 échantillons ont été les suivants:

BILIRUBINE TOTALE

Coefficient de corrélation (r)²: 0,9894

Equation de la Courbe de régression: y=0,9832 x +0,0224

BILIRUBINE DIRECTE

Coefficient de corrélation (r)²: 0,9867

Equation de la Courbe de régression: y=0,9923 x +0,0048

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

INTERFÉRENCES

La présence d'hémolyse diminue la valeur de bilirubine^{1,3}.

Il a été rapporté que certaines drogues et autres substances interfèrent avec la détermination de la bilirubine^{4,5}.

REMARQUES

- Pour la détermination de bilirubine chez les nouveau-nés, pipeter 50 µL d'échantillon. Multiplier le résultat obtenu par 4.
- SPINREACT dispose de consignes détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.**

BIBLIOGRAPHIE

- 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.
- Jendrassik L et al. Biochemische Zeitschrift Band 1938; 297:80-89.
- 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.

PRÉSENTATION

Réf: 1001041

Cont.

R 1 1 x 60 mL

R 2 1 x 10 mL

R 3 1 x 150 mL