

Détermination quantitative de bilirubine IVD

Conserver à 2-8°C

PRINCIPE DE LA METHODE

La bilirubine est transformée en azobilirubine au moyen de l'acide sulfanilique diazoté, et se mesure par photométrie. Des deux fractions présentes dans le sérum, la bilirubine-glucuronide et la bilirubine libre associée à l'albumine, seule la première réagit en milieu aqueux (bilirubine directe). La deuxième ne réagit que par solubilisation avec du diméthylsulfoxyde (DMSO)- (bilirubine indirecte). Dans la détermination de la bilirubine indirecte, on détermine également la directe, le résultat correspondant à la bilirubine totale. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de bilirubine présente dans l'échantillon testé^{1,2}.

SIGNIFICATION CLINIQUE

La bilirubine provient de la dégradation de l'hémoglobine. Elle est transporté depuis la rate vers le foie et est excrété dans la bile. L'hyper bilirubinémie est le résultat d'une augmentation de la bilirubine dans le plasma. Les causes les plus probables de la hyper bilirubinémie sont: La bilirubine totale (T): Augmentation de l'hémolyse, altérations génétiques, anémie néonatale, altérations d'éritropoïétines, présence de drogues. Bilirubine directe (D): Cholécystase hépatique, altérations génétiques et hépatiques^{1,5,6}. La diagnostique clinique doit tenir compte des données cliniques et de laboratoire.

REACTIFS

R 1 (D)	Acide sulfanilique	30 mmol/L
	Acide chlorhydrique (ClH)	150 mmol/L
R 2 (T)	Acide sulfanilique	30 mmol/L
	Acide chlorhydrique (ClH)	50 mmol/L
	Diméthylsulfoxyde (DMSO)	7 mol/L
R 3	Nitrite de sodium	29 mmol/L
Optionnel	BILIRUBIN CAL	Réf: 1002250

PRECAUTIONS

R1/R2/RT :Corrosif (C): R35: provoque des brûlures graves.
S26: En cas de contact avec les yeux, rincer à grande eau immédiatement, et rendez-vous chez un médecin

PREPARATION

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 de la capsule, et si les capsules 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 couleurs en R 2.

MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

- Spectrophotomètre ou analyseur pour les lectures à 555 nm.
- Cuvettes de 1,0 cm d'éclairage.
- Equipement classique de laboratoire.

ECHANTILLONS

Sérum ou plasma sans hémolyse (séparé dès que possible des hématies). A l'abri de la lumière.
Stabilité de l'échantillon de par la présence d'hématies: 4 jours à 2-8°C ou 2 mois à -20°C.

PROCEDURE

- Conditions de test:
Longueur d'ondes: 555 nm (530-580)
Cuvette: 1 cm d'éclairage
Température 15-25°C
- Régler le spectrophotomètre sur zéro en fonction de l'eau distillée
- Pipetter dans une cuvette:

	Blanc	B. Totale	Blanc	B. Directe
R 1 (D) (mL)	--	--	1,5	1,5
R 2 (T) (mL)	1,5	1,5	--	--
R 3 (µL)	--	50	--	50
Echantillon ^(remarque 1) /Calibreur (µL)	100	100	100	100

- Mélanger et incubé pendant exactement **5 minutes** à 15-25°C.
- Lire l'absorption (A).

CALCULS

- Avec calibreur:

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

- Avec facteur:

$$((A) \text{ Echantillon} - (A) \text{ Blanc d'échantillon}) \times \text{Facteur}^* = \text{mg/dL bilirubine dans l'échantillon}$$

$$\text{Concentration du Calibreur}$$

*Facteur:

$$(A) \text{ Calibreur} - (A) \text{ Blanc Calibreur}$$

Facteur théorique: Bilirubine (T) = 19,1 ; Bilirubine (D) = 14

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 calibreur.

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 Jusqu'à 1,10 mg/dL \cong 18,81 µmol/L

Bilirubine directe Jusqu'à 0,25 mg/dL \cong 4,27 µmol/L

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

CARACTERISTIQUES DE LA METHODE

Gamme de mesures: Depuis la limite de détection de (T) 0,099 mg/dL (D) 0,04 mg/dL jusqu'à la limite de linéarité 18 mg/dL.

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

Précision:

Bilirubine T	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
Moyenne (mg/dL)	1,12	5,36	1,01	5,28
SD	0,02	0,12	0,03	0,12
CV (%)	2,33	2,27	2,70	2,32
Bilirubine D	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
Moyenne (mg/dL)	0,64	2,28	0,68	2,53
SD	0,01	0,02	0,02	0,05
CV (%)	1,91	1,10	2,51	1,95

Sensibilité analytique: 1 mg/dL = 0,015 A (T).
1 mg/dL = 0,073 A (D).

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

Les résultats obtenus avec 50 échantillons pour la bilirubine D ont été les suivants:

Coefficient de corrélation (r): 0,99

Equation de la courbe de régression: $y=0,9933x + 0,0039$

Les résultats obtenus avec 50 échantillons pour la bilirubine T ont été les suivants:

Coefficient de corrélation (r): 0,996.

Equation de la Courbe de régression: $y=0,0884x + 0,0208$

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

INTERFERENCES

La présence d'hémolyse fait réduire la valeur en bilirubine^{1,2}.

Différentes drogues ont été décrites ainsi que d'autres substances pouvant interférer dans la détermination de la bilirubine^{3,4}.

REMARQUES

- Pour déterminer la bilirubine dans les néonataux, relever à la pipette 50 µL de l'échantillon. Multiplier le résultat obtenu par 2.
- SPINREACT dispose de consignes détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.**

BIBLIOGRAPHIE

- Kaplan A et al. Bilirubine. 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.
- 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.

PRESENTATION

Ref: 1001044

R 1 (D): 1 x 150 mL

R 2 (T): 1 x 150 mL

R 3: 1 x 10 mL

Cont.