

Bilirrubina Total y Directa MonlabTest®



DMSO. Colorimétrico.

Determinación cuantitativa de bilirrubina total y directa

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. 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-glucuronido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo 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 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 (T): Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas.
- Bilirrubina Directa (D): Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas^{1,5,6}.

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

REACTIVOS

R 1 (D)	Ácido sulfanílico (C ₆ H ₇ NO ₃ S)	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico (HCl)	150 mmol/L
R 2 (T)	Ácido sulfanílico (C ₆ H ₇ NO ₃ S)	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico (HCl)	50 mmol/L
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	7 mol/L
	Nitrito de sodio	29 mmol/L
Opcional	CAL BILIRRUBINA (Nota 3)	MO-165109

PRECAUCIONES

R1/R2: H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. EUH208-Contiene ácido sulfanílico (C₆H₇NO₃S)

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 R2.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 555 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis (separado lo antes posible de los hematíes). Proteger de la luz. Estabilidad de la muestra separada ya de los hematíes: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 555 nm (530-580)
 - Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura: 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta: (Nota 2)

	Blanco	B. Total	Blanco	B. Directa
R1 (D) (mL)	--	--	1,5	1,5
R2 (T) (mL)	1,5	1,5	--	--
R3 (µL)	--	50	--	50
Muestra ^(Nota 1) /Calibrador (µL)	100	100	100	100

- Mezclar e incubar exactamente **5 minutos** a 15-25°C.
- Leer la absorbancia (A).

CÁLCULOS

- Con Calibrador:

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

- Con Factor:

$$((A) Muestra - (A) Blanco Muestra) \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirrubina en la muestra}$$

*Factor: Concentración del Calibrador

$$(A) Calibrador - (A) Blanco Calibrador$$

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

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

CONTROL Normal y Patológico (MO-165253 y MO-165254).

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 \approx 18,81 µmol/L
Bilirrubina Total en recién nacidos	<12 mg/dL \approx < 205,2 µmol/L
Bilirrubina Directa	Hasta 0,25 mg/dL \approx 4,27 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) 0,00526 mg/dL (D) 0,07 mg/dL hasta el límite de linealidad de 18 mg/dL (T) y 20 mg/dL (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)	1,53	5,06	1,53	5,02
SD	0,03	0,05	0,03	0,11
CV (%)	1,73	1,01	1,92	2,18

Bilirrubina D	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (mg/dL)	0,96	2,48	0,96	2,50
SD	0,024	0,051	0,043	0,035
CV (%)	2,52	2,06	4,49	1,41

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,05074 A (T).

1 mg/dL = 0,06856 A (D).

Exactitud: Los reactivos MonlabTest no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Los resultados obtenidos con 50 muestras para Bilirrubina D fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,96

Ecuación de la recta de regresión: 0,71177x - 0,05267

Los resultados obtenidos con 50 muestras para Bilirrubina T fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,991

Ecuación de la recta de regresión: y=0,82743x - 0,0382

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina^{1,2}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de bilirrubina^{3,4}.

NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 2.
- Uso de pipeta desechable para la dispensación.
- Solo para ser utilizado en la bilirrubina total.

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.
- 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

MO-165074

R1: 1 x 125 mL

R2: 1 x 125 mL

R3: 1 x 10 mL

MO-165401

R (nitrito): 1 x 10 mL

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD



Fabricante



Uso de diagnóstico *in vitro*



No reutilizar



Consultar las instrucciones de uso



Contiene suficiente para <n> test



Mantener seco



Código



Límite de temperatura



Número de lote



Fecha de caducidad



Bilirubin Total and Direct MonlabTest®



Total and Direct. DMSO. Colorimetric.

Quantitative determination of bilirubin total and direct

Only for professional *in vitro* diagnostic use. 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-gluconuride and free bilirubin loosely bound to albumin, only the former reacts directly in aqueous solution (bilirubin direct), while free bilirubin requires solubilization with dimethylsulfoxide (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}.

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 (T): Increase hemolysis, genetic errors, neonatal jaundice, ineffective erythropoiesis, and drugs.
- Direct bilirubin (D): Hepatic cholestasis, genetic errors, hepatocellular damage^{1,5,6}.

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

REAGENTS

R1 (D)	Sulphanilic acid (C ₆ H ₇ NO ₃ S)	30 mmol/L
	Hydrochloric acid (HCl)	150 mmol/L
R2 (T)	Sulphanilic acid (C ₆ H ₇ NO ₃ S)	30 mmol/L
	Hydrochloric acid (HCl)	50 mmol/L
	Dimethylsulfoxide (DMSO)	7 mol/L
R3	Sodium nitrite	29 mmol/L
Optional	BILIRUBIN CAL (Note 3)	MO-165109

PRECAUTIONS

R1/R2: H314-Causes severe burns and eye damage. EUH208-Contains sulphanilic acid (C₆H₇NO₃S). 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 R2.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 555 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or plasma, free of hemolysis (separated from red blood cells as soon as possible). Protect samples from direct light.

Sample Stability (without red blood cells): 2-8°C for 4 days and 2 months at -20°C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 555 nm (530-580)
Cuvette: 1 cm light path
Temperature: 15-25°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette: (Note 2)

	Blank	Total B.	Blank	Direct B.
R1 (D) (mL)	--	--	1.5	1.5
R2 (T) (mL)	1.5	1.5	--	--
R3 (µL)	--	50	--	50
Sample ^(Note 1) / Calibrator (µL)	100	100	100	100

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

CALCULATIONS

- With Calibrator:

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

- With Factor:

$$((A) \text{ Sample} - (A) \text{ Sample Blank}) \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirubin in the sample}$$

$$\text{Factor}^* = \frac{\text{Concentration of Calibrator}}{(A) \text{ Calibrator} - (A) \text{ Calibrator Blank}}$$

$$\text{Conversion factor: mg/dL} \times 17.1 = \mu\text{mol/L.}$$

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: CONTROL Normal and Pathologic (MO-165253 and MO-165254).

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 adult	Up to 1.10 mg/dL \cong 18.81 μ mol/L
Total Bilirubin in newborn	<12 mg/dL \cong < 205,2 μ mol/L
Bilirubin Direct	Up to 0.25 mg/dL \cong 4.27 μ mol/L

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of (T) 0.00526 mg/dL (D) 0.07 mg/dL to linearity limit of 18 mg/dL (T) and 20 mg/dL (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:

Bilirubin T	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (mg/dL)	1.53	5.06	1.53	5.02
SD	0.03	0.05	0.03	0.11
CV (%)	1.73	1.01	1.92	2.18

Bilirubin D	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (mg/dL)	0.96	2.48	0.96	2.50
SD	0.024	0.051	0.043	0.035
CV (%)	2.52	2.06	4.49	1.41

Sensitivity: 1 mg/dL = 0.05074 A (T).
1 mg/dL = 0.06856 A (D).

Accuracy: Results obtained using MonlabTest reagents did not show systematic differences when compared with other commercial reagents.

The results obtained using 50 samples for Bilirubin D were the following:

Correlation coefficient (r)²: 0,96
Regression equation: y=0,71177x - 0,05267

The results obtained using 50 samples for Bilirubin T were the following:

Correlation coefficient (r)²: 0.991
Regression equation: y=0.82743x - 0.0382

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

INTERFERENCES

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

A list of drugs and other interfering substances with bilirubin determination has been reported^{3,4}.

NOTES

- For bilirubin determination in newborns, pipette 50 µL of sample. Multiply the result by 2.
- Use clean disposable pipette for the dispensation.
- Only to be used in bilirubin total.

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.
- 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

MO-165074	MO-165401
R1: 1 x 125 mL	R (nitrite): 1 x 10 mL
R2: 1 x 125 mL	
R3: 1 x 10 mL	

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

	Manufacturer		For <i>in vitro</i> diagnostic use only
	Don't re-use		Consult instructions for use
	Contains sufficient for <n> tests		Keep dry
	Catalogue Code		Temperature limitation
	Lot Number		Use by

