

**Bilirrubina Directa MonlabTest®**

DMSO. Colorimétrico.



**Determinación cuantitativa de bilirrubina 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-glucurónico 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<sup>1,2,3</sup>.

**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<sup>1,6,7</sup>.

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

**REACTIVOS**

<b>R1</b>	Ácido sulfanílico (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S)	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico (HCl)	150 mmol/L
<b>R2</b>	Nitrito de sodio	29 mmol/L

**PRECAUCIONES**

R1: H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. EUH208-Contiene ácido sulfanílico (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S). 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 R2.

**MATERIAL ADICIONAL**

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 555 nm (530-580).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

**MUESTRAS**

Suero o plasma libre de hemólisis<sup>1</sup>. 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: .....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. Directa
R1 (mL)	1,5	1,5
R2 (µL)	--	50
Muestra / Calibrador (µL)(Nota 1)	100	100

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

**CÁLCULOS**

**Con Calibrador:**

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

**Con Factor:**

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

$$\text{*Factor: } \frac{\text{Concentración del Calibrador}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco Calibrador}}$$

$$\text{Factor de conversión: mg/dL} \times 17,1 = \mu\text{mol/L.}$$

**CONTROL DE CALIDAD**

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: CONTROL Normal y Patológico (MO-165107 y MO-165108).

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 REFERENCIA<sup>1</sup>**

Bilirrubina Directa: Hasta 0,25 mg/dL  $\equiv$  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 0,07 mg/dL hasta el límite de linealidad de 20 mg/dL.

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:**

	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 = 0,06856 A.

**Exactitud:** Los reactivos MonlabTest (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas al compararse con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)<sup>2</sup>: 0,96.

Ecuación de la recta de regresión:  $y = 0,71177x - 0,05267$ .

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

**INTERFERENCIAS**

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina<sup>1,2,3</sup>.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de la bilirrubina<sup>4,5</sup>.

**NOTAS**

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 2.
- Utilice una punta de pipeta desechable y limpia para la dispensación.
- MONLAB 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.
- 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 AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

**PRESENTACIÓN**

MO-165072  
R1: 2 x 125 mL  
R2: 1 x 10 mL

MO-165198  
R1: 4 x 250 mL  
R2: 3 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 Direct MonlabTest®**



Direct. DMSO. Colorimetric.

**Quantitative determination of bilirubin 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-glucomide 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<sup>1,2,3</sup>.

**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<sup>1,6,7</sup>.  
 Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

**REAGENTS**

<b>R1</b>	Sulfanilic acid (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S)	30 mmol/L
	Hydrochloric acid (HCl)	150 mmol/L
<b>R2</b>	Sodium nitrite	29 mmol/L

**PRECAUTIONS**

R1:H314-Causes severe burns and eye damage. EUH208-Contains sulphanic acid (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S). 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 (530-580).
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

**SAMPLES**

Serum or plasma, free of hemolysis<sup>1</sup>. 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: ..... 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<sup>(Note 2)</sup>:

	Blank	B. Direct
R1 (mL)	1.5	1.5
R2 (µL)	--	50
Sample / Calibrator (µL) <sup>(Note 1)</sup>	100	100

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

**CALCULATIONS**

**With Calibrator:**

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

**With Factor:**

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

$$\text{*Factor: } \frac{\text{Concentration of Calibrator}}{(A)Calibrator - (A) CalibratorBlank}$$

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

**QUALITY CONTROL**

Control sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: CONTROL Normal and Pathologic (MO-165107 and MO-165108).

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 VALUES<sup>1</sup>**

Bilirubin Direct: Up to 0.25 mg/dL  $\cong$  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 0.07 mg/dL to linearity limit of 20 mg/dL.

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:**

	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 = 0,006856 A.

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

The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r)<sup>2</sup>: 0,96.  
 Regression equation: y=0,71177x-0,05267.

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

**INTERFERENCES**

Hemolysis causes decreased bilirubin values<sup>1,2,3</sup>.

A list of drugs and other interfering substances with bilirubin has been reported<sup>4,5</sup>.

**NOTES**

- For bilirubin determination in newborns, pipette 50 µL of sample. Multiply the result by 2.
- Use clean disposable pipette for the dispensing.
- MONLAB 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.
- 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**

MO-165072	MO-165198
R1: 2 x 125 mL	R1: 4 x 250 mL
R2: 1 x 10 mL	R2: 3 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

