

## BILIRUBIN

TOTAL AND DIRECT  
*Colorimetric method*

END POINT

REF KR10082 RD. 5 x 40 mL CONTENTS RD.Reagent 5 x 32 mL RN.Reagent 5 x 8 mL	REF KR10085 RD. 11 x 40 mL CONTENTS RD.Reagent 11 x 32 mL RN.Reagent 11 x 8 mL	REF KR10092 RT. 5 x 40 mL CONTENTS RT.Reagent 5 x 32 mL RN.Reagent 5 x 8 mL	REF KR10095 RT. 11 x 40 mL CONTENTS RT.Reagent 11 x 32 mL RN.Reagent 11 x 8 mL
For <i>in vitro</i> diagnostic use only			

### SUMMARY

Bilirubin is converted to coloured azobilirubin by diazotized sulfanilic acid and is measured photometrically. Of the two bilirubin fractions in serum –bilirubin-glucuronide and free bilirubin which is bound to albumin– only the former reacts directly, while free albumin reacts after being displaced from protein by an accelerator. The difference of two measurements total bilirubin (with accelerator) and direct bilirubin (without accelerator) enables to calculate indirect bilirubin. The terms «direct» and «indirect» bilirubin refers exclusively to the reaction characteristics in the presence or absence of an accelerator or solubilizer and are only approximate equivalents of the two bilirubin fractions.<sup>1,2</sup>

### REAGENTS

**RT.** Sulfanilic acid 29 mmol/L, HCl 0.24 mol/L, Duposol® 3% (w/v).


**RD.** Sulfanilic acid 29 mmol/L, HCl 0.24 mol/L.

**RN.** Sodium nitrite 11.6 mmol/L.

### PREPARATION

The Reagents are ready-to-use.

### STORAGE AND STABILITY

 Store at 2-8°C. The Reagents are stable until the expiry date stated on the label. On board the reagents are stable 30 days. After daily use stored tightly closed and protected from light.

#### Discard if appear signs of deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 540 nm > 0.050 in 1cm cuvette.
- Reagent **RN** if it develops a yellow coloration.

### SAMPLE COLLECTION

Fresh hemolysis-free serum, EDTA or heparinized plasma. Store in the dark until use.

Samples can be frozen at -15°C or below in which case bilirubin is stable for 2 months.

### INTERFERENCES

- Lipemia (intralipid < 5 g/L) does not interfere.
- Direct Bilirubin (Hemoglobin 2 g/L) may affect the results.
- Total Bilirubin (Hemoglobin 16 g/L) does not interfere.
- Other drugs and substances may interfere<sup>3</sup>.
- Lipemic samples interfere with the assay. The interference can be corrected by preparing a sample blank before applying the general formula of calculation.

### INSTRUMENTATION AND MATERIALS

- KROMA analyzer.
- Laboratory equipment.
- iso-Clean Solution. Ref. CT18002.
- Multicalibrator CC/H 10x3 mL Ref. CT19750

### AUTOMATED PROCEDURE

A graphic display pictures the specific sets corresponding to the technical application outlined for this test.

Any new application, to the instrument should be validated to confirm that results meet the analytical performance of the method.

It is recommended to validate periodically the instrument.

### CALIBRATION

Recalibrate weekly (Bilirubin T) or every 2 days (Bilirubin D), when a new lot of reagent is used, when control recovery falls out of the expected range or when adjustments are made to the instrument. Two point calibration is recommended (S1: NaCl 9 g/L and S2: Calibrator). A reagent blank should be run daily before sample analysis.

### RESULTS

Samples with concentrations higher than 20 mg/dL should be diluted 1:2 with saline and assayed again. Multiply results by 2.

If results are to be expressed as SI units apply: mg/dL x 17.1 = µmol/L

### EXPECTED VALUES <sup>4</sup>

ADULTS Total Up to 1.0 mg/dL	Direct Up to 0.2 mg/dL
------------------------------	------------------------

### NEWBORNS (TOTAL BILIRUBIN)

Age	Premature	Full- term
Up to 24 h	1.0-6.0 mg/dL	2.0-6.0 mg/dL
Up to 48 h	6.0-8.0 mg/dL	6.0-7.0 mg/dL
3-5 days	10.0-15.0 mg/dL	4.0-12.0 mg/dL

It is recommended that each laboratory establishes its own reference range.

### QUALITY CONTROL

To ensure adequate quality control (QC), each run should include a set of controls (normal and abnormal) with assayed values handled as unknowns.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

### DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS

*Hyperbilirubinemia* (an abnormal elevation of bilirubin, whether conjugated or unconjugated) in plasma is an indication of a disturbance in bilirubin metabolism. This condition is caused either by an overproduction of bilirubin or by an impairment in the metabolic pathway.

The increase in bilirubin production is usually caused by a rapid destruction of erythrocytes, resulting from blood diseases such as haemolytic anemia.

In newborns the increase in bilirubin may be caused by Rh, ABO, or other blood group incompatibility, by sepsis, hepatic immaturity, or by a variety of hereditary defects in bilirubin conjugation.

Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance characteristics are available on request.

### BIBLIOGRAPHY

1. Walters, M.I. and Gerarde, H.W. Microchemical Journal. 15, 231 (1970).
2. Pearlman, F.C. and Lee, R.T.Y. Clin. Chem. 20/4, 447 (1974).
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
4. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, p.940. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987.

KR1008-09-2/0811



## BILIRRUBINA

TOTAL Y DIRECT

Método colorimétrico

PUNTO FINAL

REF KR10082 RD. 5 x 40 mL CONTENIDO RD.Reactivo 5 x 32 mL RN.Reactivo 5 x 8 mL	REF KR10085 RD. 11 x 40 mL CONTENIDO RD.Reactivo 11 x 32 mL RN.Reagent 11 x 8 mL	REF KR10092 RT. 5 x 40 mL CONTENIDO RT.Reactivo 5 x 32 mL RN.Reactivo 5 x 8 mL	REF KR10095 RT. 11 x 40 mL CONTENIDO RT.Reactivo 11 x 32 mL RN.Reactivo 11 x 8 mL
Sólo para uso diagnóstico <i>in vitro</i>			

### FUNDAMENTO

El ácido sulfanílico diazotado transforma la bilirrubina en azobilirrubina coloreada que se determina fotométricamente. De las dos fracciones de bilirrubina presentes en suero, glucuronato de bilirrubina y bilirrubina libre asociada a albúmina, sólo reacciona directamente la primera, mientras que la bilirrubina libre precisa ser disociada de la proteína por un acelerador para que reaccione. La bilirrubina indirecta se calcula por diferencia entre la bilirrubina total (con acelerador) y la directa (sin acelerador).

Los conceptos «directa» e «indirecta» se refieren exclusivamente a las características de reacción en presencia o ausencia de aceleradores o solubilizantes y equivalen sólo de forma aproximada a las dos fracciones de bilirrubina citadas.<sup>1,2</sup>

### REACTIVOS

**RT.** Acido sulfanílico 29 mmol/L, HCl 0,24 mol/L, Duposol® 3% (p/v).

**RD.** Acido sulfanílico 29 mmol/L, HCl 0,24 mol/L.

**RN.** Nitrito sódico 11,6 mmol/L.

### PREPARACIÓN

Los Reactivos están listos para su uso.

### ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conservar a 2-8°C. Los Reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Después de su uso diario, mantener bien cerrado y protegido de la luz. En el analizador son estables 30 días.

#### Descartar si se observan signos de deterioro:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia del Blanco (A) a 540 nm > 0,050 en cubeta de 1 cm.
- El reactivo **RN** si desarrolla una coloración amarilla.

### MUESTRAS

Suero reciente libre de hemólisis o plasma heparinizado u obtenido con EDTA. Proteger de la luz hasta su ensayo. En estas condiciones es estable 2 días a 2-8°C.

Las muestras pueden congelarse a una temperatura de -15°C o inferior, en cuyo caso la bilirrubina es estable durante 2 meses.

### INTERFERENCIAS

- Lipemia (intralipid < 5 g/L) no interfiere.
- Bilirrubina Directa (Hemoglobina 2 g/L) puede afectar los resultados.
- Bilirrubina Total (Hemoglobina 16 g/L) no interfiere.
- Otros medicamentos y sustancias pueden interferir.<sup>3</sup>
- Muestras altamente lipémicas interfieren en el ensayo. La interferencia puede corregirse preparando un blanco de muestra antes de aplicar la fórmula general de cálculo.

### EQUIPO ADICIONAL

- Analizador KROMA.
- Material de laboratorio.
- iso-Clean Solution. Ref. CT18002.
- Multicalibrador CC/H 10x3 mL Ref. CT19750

### TECNICA AUTOMATICA

Una representación grafica visualiza los ajustes específicos correspondientes a la aplicación técnica diseñada para este ensayo. Cualquier aplicación nueva al instrumento deberá validarse para confirmar que los resultados cumplen las características del método. Se recomienda validar periódicamente el instrumento.

### CALIBRACION

Recalibrar semanalmente (Bilirrubina T) o cada 2 días (Bilirrubina D), al cambiar el lote de reactivos, cuando los valores del control estén fuera del rango de aceptación o cuando se realicen ajustes en el instrumento. Se recomienda la Calibración de dos puntos (M1: C1Na 9 g/L y M2: Calibrador). Realizar un blanco del reactivo cada día de trabajo antes de analizar las muestras. Se recomienda hacer un blanco del reactivo cada día de trabajo antes de analizar las muestras.

### CALCULOS

Muestras con concentraciones superiores a 20 mg/dL deben diluirse 1:2 con solución salina y repetir el ensayo. Multiplicar los resultados por 2. Para expresar los resultados en unidades SI: mg/dL x 17,1 = µmol/L

### VALORES DE REFERENCIA<sup>4</sup>

ADULTOS Total Hasta 1,0 mg/dL	Directa Hasta 0,2 mg/dL
-------------------------------	-------------------------

### RECIEN NACIDOS (BILIRRUBINA TOTAL)

Edad	Prematuros	A término
Hasta 24 h	1,0-6,0 mg/dL	2,0-6,0 mg/dL
hasta 48 h	6,0-8,0 mg/dL	6,0-7,0 mg/dL
3-5 días	10,0-15,0 mg/dL	4,0-12,0 mg/dL

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia.

### CONTROL DE CALIDAD

Para un control de calidad (CC) adecuado, se incluirán en cada serie controles valorados (normal y abnormal) que se tratarán como muestras problema.

Cada laboratorio debe establecer su propio Control de Calidad y sus medidas correctoras cuando los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

### SIGNIFICADO CLINICO

La *hiperbilirrubinemia* (elevación anormal de la bilirrubina tanto conjugada como no conjugada) es indicativa de una alteración fisiológica de la bilirrubina. Esta condición está originada por una sobreproducción de bilirrubina o por una alteración de su ciclo metabólico.

El aumento de la producción de bilirrubina se origina generalmente por una destrucción rápida de los hematíes como resultado de alteraciones sanguíneas tales como la anemia hemolítica.

En recién nacidos el aumento del nivel de bilirrubina puede deberse a una incompatibilidad de grupos sanguíneos (Rh, ABO u otros), sepsis, inmadurez hepática, o a diversos defectos hereditarios.

El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

### CARACTERISTICAS ANALITICAS

Las características analíticas están disponibles bajo solicitud.

### REFERENCIAS

1. Walters, M.I. y Gerarde, H.W. Microchemical Journal. 15, 231 (1970).
2. Pearlman, F.C. y Lee, R.T.Y. Clin. Chem. 20/4, 447 (1974).
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
4. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, p.940. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987.





Aplicaciones en KROMA  
*Applications on KROMA*



## (DIRECT) BILIRUBIN

Two reagents method

(Direct) Bilirubin (5 x 40 mL), Code KR10082  
(Direct) Bilirubin (11 x 40 mL), Code KR10085

**USO**  
*USE*

**Reactivo de diagnóstico *in vitro* para la determinación de la bilirrubina total en suero o plasma.**

*In vitro diagnostic reagent for the determination of total bilirubin in serum or plasma.*

**METODO**  
*METHOD*

**Colorimétrico.**

*Colorimetric.*

**MUESTRA**  
*SAMPLE*

**Suero, plasma heparinizado u obtenido con EDTA.**

*Serum, EDTA or heparinized plasma.*

**REACTIVOS**  
*REAGENTS*

**Los reactivos RD y RN están listos para su uso.**

*The reagents **RT** and **RN** are ready to use.*

**CALIBRADOR**  
*STANDARD*

**Linear Multicalibrator CC/H, Code CT19750**

**CONTROL CALIDAD**  
*QUALITY CONTROL*

**Linear Human Multisera Normal CT19800**

**Linear Human Multisera Abnormal CT19850**

**DETERMINACIONES**  
*NUMBER OF TESTS*

**1000 tests/kit, Code KR10082**

**2.200 tests/kit, Code KR10085**

**(no se considera el volumen muerto).**

*(dead volume is not taken in consideration).*

**LINEALIDAD**  
*LINEARITY*

**Sin post-dilución automática: Hasta 10 mg/dL**

*Without automatic post-dilution: Up to 10 mg/dL*

**NOTA**  
*NOTE*

**Para más información lea el prospecto del reactivo.**

*For additional information read reagent packaging insert.*

**NOTA DE AVISO**  
*WARNING*

**La aplicación incluida se da solamente como pauta. Cualquier aplicación deberá ser validada con el fin de demostrar que se cumplen las características analíticas del método.**

*The reported application is given only as a guideline. Any application to an instrument should be validated to demonstrate that results meet the performance characteristics of the method.*



**General Info**

Name:  Code:  Barcode:  Unit:  Decimal digits:

Visible Type:   No. of rgt:  Multiply diluted result:

Notes:

**Filters**

F1:  F2:

**Incubation/Reading time [sec]**

Substrate/Sample Start

Sample Start:

R1,S -> R2    R1,R2,S -> R3    Final incub.

**Reference Ranges**

Sample type:

Patien...	Min	Max
Female	0.30	1.00
Male	0.30	0.80
Paediatric	0.60	1.90

**Volumes [microlitres]**

Sample:

R1:  R1:

R2:  R2:

R3:  R3:

**Kinetic/Fixed Time data**

**Instrument Factor (Y = aX + b)**

a:  b:

**Reagents**

Include blank in calc.

Blank Abs (min; max):

Reagent linearity:

Detection limit:

**Calibrations**

No. of Standards:

Piecewise Linear  Calib. Curve

**Controls**

C1     C2     C3

Dilutions by sample

Formula Builder

Print

Delete

Save

Name	N. of Standards	N. of rep.	Units	Stability
Direct Bilirubin	2	1	mg/dL	

Dil.ratio	Std value	O.D.	Reagent ...
<input type="text"/>	*	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Factor	Factor Min	Factor Max	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

\* entered by the user

KR10082-85-1/0907

