

BILIRUBINA

TOTALA SI DIRECTA

Metoda colorimetrica

PUNCT FINAL

REF	1110005	Bbilirubina D
	1111010	Bilirubina T
	1112005	Bilirubina T + D

PRINCIPIUL

Bilirubina este convertita intr-o azobilirubina colorata de catre acidul sulfanilic diazotizat iar reactia este monitorizata fotometric. Dintre cele doua functii ale fractiei de bilirubina din ser – glucuronida de bilirubina si bilirubina libera ce lare legatura cu albumina – doar bilirubina libera reactioneaza in mod direct, in timp ce albumina libera reactioneaza dupa ce a fost separata de proteina cu un accelerator. Diferenta dintre cele doua masuratori totale de bilirubina (cu accelerator) si bilirubina directa (fara accelerator) permite calculul bilirubinei indirecte. Termenii "direct" si "indirect" se refera exclusiv la caracteristicile reactiei ce au loc in prezenta sau absenta unui accelerator sau solubizator si sunt doar echivalenti aproximativi ale celor doua fractiuni de bilirubina

CONSTITUENTI SI COMPOZITIE

RT Acid sulfalinic 29 mmol/L, acid hidrocloric 0.24 mol/L, Duposol® 3% (w/v). **Xi R:36/37/38 S:26**
RD Acid sulfalinic 29 mmol/L, acid hidrocloric 0.24 mol/L.
Xi R:36/37/38 S:26
RN Nitrat de sodiu 11.6 mmol/L.

Reactiv auxiliar **REF 1912005** - se achizitioneaza separat

CAL Calibrator Total de Bilirubina (1 X1 ml)

Bilirubina liofilizata intr-o matrice proteica care poate fi urmarita cu ajutorul SRM-ului 916a. Concentratia mentionata pe eticheta dupa reconstructie este lot-specifica. Valoarea tintita a fost obtinuta folosind reactivii LINEAR pe un analizor Cobas Mira®.

CONSERVARE SI STABILITATE

Se pastreaza la temperaturi de 2-8°C.

Reactivii sunt stabili pana la data de valabilitate scrisa pe eticheta.

Pastrati flacoanel bine inchise si ferite de lumina solara directa.

Reactivii sunt improprii utilizarii daca:

- Prezinta particule sau turbiditate
- Absorbanta blankului este mai mare de 0.050 la 450nm in cuveta cu drum optic de 1cm.
- reactivul **RN** dezvolta o coloratura galbuie.

PREPARAREA REACTIVULUI

Reactiv de lucru. Amestecati 1 mL **RN** + 4 mL **RT** (total) sau 1 mL **RN** + 4 mL **RD** (direct). Este stabile timp de 8 zile la o temperatura de 2-8°C.

Calibrator. Reconstituiti amestecul din fiola adaugand exact 1.0 mL de apa distilata. Agitati usor si lasati sa se linisteasca amestecul timp de 5-10 minute inainte de a fi utilizat. Stabilitatea bilirubinei in intuneric este de: 8 ore la 16-25°C, 2 zile la 2-8°C si 28 de zile la - 20°C inghetata o data.

PROBE

Ser proaspat si nehemolizat. Se pastreaza in intuneric pana la utilizare.

Probele pot fi inghetate la -15°C sau mai putin iar in acest caz bilirubina este stabila timp de 2 luni.

INTERFERENTE

Probele lipemice intervin in analiza. Interventia poate fi corectata prin prepararea unei probe blank inainte de a aplica formula generala de calcul. La intralipide < 5 g/l nu aapr modificari notabile.

- BB Directa Efectul hemoglobinei poate fi neglijat pana la un nivel de 2 g/L.
- BB Totala Efectul hemoglobinei poate fi neglijat pana la un nivel de 16 g/L.
- Un numar de droguri si substante se stie ca afecteaza valorile bilirubinei sunt prezentate in sursa bibliografica 3.

MATERIALE DE LUCRU

- Fotometru sau colorimetru cu capacitatea de a masura absorbanta la 540 ± 20 nm;
- Pipete cu varfuri de plastic de unica folosinta utilizate in masurarea reactivilor si mostrelor;
- Tuburi de plastic de unica folosinta utilizate in testare.

METODA DE LUCRU

BILIRUBINA TOTALA

1. Pipetati in tuburile de test cu eticheta;

TUBURI	Reactiv Blanc	Proba Blanc	Proba	CAL
Apa distilata	100 µL	-	-	-
Proba	-	100 µL	100 µL	-
CAL	-	-	-	100 µL
RT	-	1.0 mL	-	-
Reactiv de lucru	1.0 mL	-	1.0 mL	1.0 mL

2. Amestecati cu grija si lasati tuburile sa stea timp de 2 minute la temperatura camerei

3. Cititi absorbanta (A) probelor blanc la 540 nm fata de apa distilata.

4. Cititi absorbanta (A) probelor la 540 nm faat de reactivul blank

Culoarea este stabila timp de aproximativ 60 minute la temperatura camerei

BILIRUBINA DIRECTA

1. Pipetati in tuburile de test etichetate.

TUBURI	Reactiv Blanc	Proba Blanc	Proba	Cal
Apa distilata	100 µL	-	-	-
Proba	-	100 µL	100 µL	-
Calibrator				100 µL
RD	-	1.0 mL	-	-
Reactiv de lucru	1.0 mL	-	1.0 mL	1.0 mL

2. Amestecati cu grija si lasati tuburile test sa stea timp de exact 5 minute la o temperatura de 37°C

3. Cititi absorbanta (A) probei blanc la 540 nm fata de apa distilata.

4. Cititi absorbanta (A) probelor la 540 nm fata de reactivul blanc.

METODA DE CALCUL

Aproba – A proba blanc

$$\frac{\text{Aproba} - \text{A proba blanc}}{\text{Acal}} \times \text{Ccal} = \text{mg/dL bilirubina totala}$$

In calcularea bilirubinei directe folositi factorul (Ccal / Acal) obtinut in procedura bilirubinei totale.

Probele cu o concentratie mai mare de 20 mg/dL ar trebui sa fie diluate cu 1:2 solutie salina si analizate din nou. Rezultatele se inmultesc cu 2.

In cazul in care rezultatele trebuie sa fie exprimate in unitati SI se aplica:

$$\text{mg/dL} \times 17.1 = \mu\text{mol/L}$$

VALORI DE REFERINTA

ADULTI

Totala	Pana la 1.0 mg/dL
Directa	Pana la 0.2 mg/dL

NOU NASCUTI

Varsta	Prematur	La termen
Pana la 24 ore	1.0-6.0 mg/dL	2.0-6.0 mg/dL
Pana la 48 ore	6.0-8.0 mg/dL	6.0-7.0 mg/dL
3-5 zile	10.0-15.0 mg/dL	4.0-12.0 mg/dL

Se recomanda ca fiecare laborator sa-si stabileasca propriile referinte.

CONTROL DE CALITATE

Folosirea unui standard pentru a calcula rezultatele permit obtinerea o acuratete a rezultatelor independenta de sistem sau de instrumental folosit.

Pentru a asigura calitatea de control adecvata (QC), fiecare rulare ar trebui sa include un set de controale (normale sau anormale) cu valorile de analiza tratate ca necunoscute.

REF 1980005 MULTISER UMAN NORMAL NIVEL DE BILIRUBINA SCAZUT.

REF 1985005 MULTISER UMAN SCAZUT NIVEL DE BILIRUBINA CRESCUT.

SEMNIFICATIA MEDICALA

Hiperbilirubinemia (o crestere anormala de bilirubina, fie conjugata sau neconjugata) in plasma este un indicator al neregulilor existente in metabolismul bilirubinei. Aceasta stare este cauzata fie de un surplus de productie de bilirubina fie de o deteriorare a caili metabolice. Cresterea productiei de bilirubina in metabolism este cauzata de obicei de o rapida distrugere a eritrocitelor, rezultate de boli ale sangelui asa cum ar fi anemia hemolitica. In cazul nou nascutilor cresterea de bilirubina poate sa fie cauzata de Rh, ABO, sau alte grupe de sange incompatibile, de septicemie, insuficienta hepatica, sau de o varietate de afectiuni ereditare ale conjugatilor de bilirubina.

O deteriorare a bilirubinei in metabolism este cauzata fie de o deficienta enzimara fie de o obstructie a canalului de scurgere a bilirubinei cum ar fi obstructia ductului biliar. Hiperbilirubinemia duce la chernicterus (sedimentarea bilirubinei neconjugate la creier si celulele nervoase) sau icter (decolorarea mucusului membranelor, sclera si pielii cauzata de depunerea de pigment a bilirubinei)

NOTA

- Pentru determinarea de bilirubina la nou nascuti pipetati daor 50 µL de proba, si urmariti desfasurarea procedurii descrise
- Acest reactivi pot fi folositi si pe sistem eautomate. Modul de folosire in cazul a mai multor analizatori de acest tip sunt disponibili la cerere.
- Diagnosticul clinic un trebuie pus daor pe baza unei singure determinari de laborator, trebuie sa integreze ata datele de laborator cat si datele clinice.

PERFORMANTELE ANALIZEI

Limita de detectie (Bilirubina Directa) : 0.09 mg/dL
Limita de detectie (Bilirubina Totala) : 0.03 mg/dL

- **Linearitate.** Pana la 20 mg/dL
- **Precizie**

mg/dL	BB Directa				BB Totala			
	intratest		Intre teste		intratest		Intre teste	
Mean	0.79	1.82	0.79	1.82	1.61	4.85	1.61	4.85
SD	0.03	0.06	0.03	0.07	0.03	0.05	0.05	0.11
CV%	4.23	3.02	4.28	4.11	2.00	1.13	3.28	2.32
N	10	10	10	10	10	10	10	10

Sensibilitatea (Bilirubina Directa) : 0.171 A / mg/dL
Sensibilitatea (Bilirubina Totala) : 0.073 A / mg/dL

-**Corelatia** : Aceasta analiza (y) a fost comparata cu o metoda similara comerciala (x). Rezultate obtinute:

$$N = 52 \quad r = 0.96 \quad y = 0.993 + 0.113x$$

Performantele analitice au fost geenerate utilizand un aparat automat. Rezultatele pot varia in functie de instrumentul utilizat.

REFERINTE

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.

