

اليرقان Jaundice:



Jaundice اليرقان :

هو ارتفاع مستوى صبغات الصفراء بالدم و بالتالي هروبها الى الانسجة و اصطباغ الاخيرة باللون الاصفر.



كيف تتكون الصبغات الصفراء؟

تنشأ الصبغات الصفراء في الخلايا الأندوثيلية الشبكية للكبد Reticuloendothelial cell و المتمثلة بـ Kupffer حيث تتحطم كريات الدم الحمر و اثناء تجزء الهيموغلوبين تبقى حلقة البروتوبورفيرين لتكون صبغة صفراء مسماة Bilirubin و من ثم تتحول الى Bilirubin حيث ان كل 1 غم من الهيموغلوبين يعطي 35 ملغم من البليروبين و يوضح المخطط التالي تكوين صبغات الصفراء



Hemoglobin ---Hydrolysis→ Heme+Globin → Biliredin

C₃₃H₃₄O₆N₄+ Iron



Bilirubin C₃₃H₃₆N₄

<-----

يرتبط مع **Glucuric acid** و يطرح مع الامعاء و يختزل بواسطة البكتريا ↓

→ Hrobilinogen (Stercobilinogen stool)—Antioxidation--→



Urobi (stercobilin in stool)



يوجد البليروبين في مصل الدم للاشخاص الطبيعيين بنسبة (0.5-1) ملغم/100مل في الحالات المرضية الناتجة عن فشل الكبد في انتاج الكميات الطبيعية ترتفع النسبة الى اكثر من 40 من ملغم/100مل حيث يكون معظم Bilirubin النوع المرتبط و تعرف هذه الحالى باليرقان و يظهر اللون الاصفر على الجلد و في العين.



يقسم Bilirubin الى نوعين:

1- المرتبط Conjugated: يرتبط مع حامض Glucuronic في الكبد و يكون ذو تفاعل مباشر لانه يذوب بالاوساط المائية.

2- الحر Free (او يسمى غير المرتبط Inconjugated) : و يكون ذو تفاعل غير مباشر و هو لا يذوب في الماء.

في الحالات الطبيعية يجب ان يحتوي مصل الدم على Bilirubin حر فقط اما ال Bilirubin المطروح للصفراء في خلايا الكبد يجب ان يكون مرتبط في الحالات المرضية يمكن ملاحظة العكس اي ظهور Bilirubin المرتبط في مصل الدم.



انواع اليرقان:-

1-اليرقان الانحلالي Hemolytic jaundice

ان اي سبب يزيد من تحطم RBC سوف يزيد من تكوين صبغات الصفراء حيث ان تحطم RBC اسرع من معدل تكوينها و انتاجها سوف يزيد نسبة ال Bilirubin في المصل.

2-اليرقان الكبدي Hepatic jaundice:

ينتج عن فقدان الكبد لوظيفته بسبب تحطم الخلايا البرنكيمية للكبد و يحدث بسبب فايروسات الكبد و التسمم بالكلوروفورم و الفسفور و غيرها.



3-اليرقان الانسدادي Obstructive jaundice

بسبب انسداد قناة الصفراء او القناة الكبدية بسبب السرطان او حصاة الصفراء و بهذا يمنع مرور صبغات الصفراء الى الامعاء و الدم و بالتالي انحباسه الى اللف و الاوردة الكبدية و يصبح Bilirubin الحر داخل الخلايا مرتبط لكنه لا يستطيع العبور من الدم الى الأمعاء. هنالك نوع آخر من اليرقان و المسمى اليرقان الفسلجي حيث يزداد Bilirubin في الايام الاولى للولادة بنسبة 10ملغم/100 مل و يحدث بسبب سرعة تكسر RBC مقابل فترة تصريف ال Bilirubin حيث يزداد في المصل و يظهر على الجلد و مقلة العين و يتم التخلص منه بزيادة عدد الرضعات التي تسبب زيادة خروج الفضلات مع خروج ال Bilirubin. كما تعزى زيادة Bilirubin في المصل هو بسبب عدم نضوج نظام الكبد لتحويله الى مرتبط اما اذا تجمع في انسجة الدماغ فانه سوف يؤثر على الوظيفة.



كما استنتج العلماء ان التغذية او الرضاعة الطبيعية تسهل عملية التخلص من البلروبين الزائد مقارنة بالرضاعة الصناعية حيث لوحظ ان مصل الام الحامل سوف يعزز مواد مثبطة للبلروبين المرتبط. هذا الهرمون الستيرويدي يوجد بنسبة 1 ملغم/يوم في حليب الام المرضعة و الذي يثبط ظهور حالة ارتفاع البلروبين Hyperbilirubinemia



تقدير كمية البليروبين Estimation of Bilirubin

يسمى الاختبار التفريقي بين نوعي البليروبين ب

Eihrichs test

يتم الكشف في الادرار او المصل على 1913 Van-den-Bergh الذي اكتشفه العالم

لينتج مركب يسمى Bilirubin مع diazotizd sulfanilic acid اساس اتحاد حامض

ذو لون احمر الى بنفسجي Azocompound



Direct Reaction

ويعني ظهور اللون مباشرة بعد اضافة الكاشف بدون اضافة الميثانول للكشف عن البليروبين المرتبط بتفاعل الاخير مع الحامض مباشرة



Indirect Reaction

لتقدير كمية البليروبين الحر والذي يكون ذائب بالماء لهذا يحتاج الى مركب يسمى المعجل يعمل على اذابته لتسهيل اتحاده مع الكاشف ويستخدم لهذا الغرض الميثانول accelerator



الفحص المختبري

1--يوضع قطرات من الادرار على المربع الخاص بالفحص

2-توضع حبه محتوية على مركبات هي para-nitrobenzen dia zonium

Salrcyl sulphonic acid Para-toluene sulphate

Sodium hydrogen carbonate

3--توضع قطرتين من الماء على مكان الحبة التي وضعت سابقا على قطرات البول

4--يلاحظ اللون خلال 30 ثانية حيث تكون النتائج كما يلي:

النتيجة سالبة— عدم تغير اللون او يبدا يتحول بشكل بطئ الى لون احمر وردي

النتيجة موجبة---

يتحول الى اللون البنفسجي حيث ان وجود البليروبين في البول يجعله يرتبط مع

diazi compound بوجود الحامض ويعطي اللون البنفسجي.



QUALITY CONTROL

EXATROL-N (level I) REF 95010.
 EXATROL-P (level II) REF 95011.
 BIOLABO PAEDIATRIC CONTROL (valeurs pédiatriques) REF 95403

- Other assayed control sera referring to the same method and selected procedure.
 External quality control program.
 It is recommended to control in the following cases :
 • At least once a run.
 • At least once within 24 hours.
 • When changing vial of reagent.
 • After maintenance operations on the instrument.
 If control is out of range, apply following actions :
 1. Repeat the test with the same control.
 2. If control is still out of range, prepare a fresh control serum and repeat the test.
 3. **With factor :** Verify analysis parameters (Wavelength, temperature, specimen/reagent ratio, time counting, calibration factor).
 4. Use a new vial of reagent and repeat the test.
 5. **With a calibrator :** If control is still out of range, use a new vial of calibrator or a fresh calibrator and repeat the test.
 6. If control is still out of range, calibrate again with a new vial of reagent and repeat the test.
 7. If control is still out of range, please contact BIOLABO technical support or your local Agent.

EXPECTED VALUES (2)

Total Bilirubin	mg/dL				[µmol/L]	
	Premature	Full-term	Premature	Full-term		
Newborn						
In cord	< 2.0	< 2.0	< 34	< 34		
0-1 day	< 8.0	1.4-8.7	[< 137]	[24-149]		
1-2 days	< 12.0	3.4-11.5	[< 205]	[58-197]		
3-5 days	< 16.0	1.5-12.0	[< 274]	[26-205]		
Adult (and child > 5 days)						
> 5 days-60 years	0.3-1.2	[5-21]	< 0.2	[< 3.4]		
60-90 years	0.2-1.1	[3-19]	< 0.2	[< 3.4]		
> 90 years	0.2-0.9	[3-15]	< 0.2	[< 3.4]		

Each laboratory should establish its own normal ranges for the population that it serves.

LINEARITY

- Procedure n°1 : up to 20 mg/dL (342 µmol/L).
 Above, do not dilute specimen : perform procedure n°2.
 Procedure n°2 : up to 100 mg/dL (1710 µmol/L)
 Pediatric specimen : perform procedure n°2

PERFORMANCES CHARACTERISTICS (PROCEDURE N°1)

TOTAL BILIRUBIN			Between run		
Within run	Normal level	High level	N = 20	Normal level	High level
N = 23					
Mean mg/dL	0.68	4.13	Mean mg/dL	0.67	3.85
S.D. mg/dL	0.02	0.104	S.D. mg/dL	0.022	0.07
C.V. %	2.94	2.52	C.V. %	3.27	1.78
DIRECT BILIRUBIN			Between run		
Within run	Medium level	High level	N = 20	Medium level	High level
N = 20					
Mean mg/dL	1.15	2.79	Mean mg/dL	1.09	2.74
S.D. mg/dL	0.022	0.015	S.D. mg/dL	0.028	0.19
C.V. %	1.94	0.53	C.V. %	2.6	3.3

Detection limit : TB : approximately 0.13 mg/dL
 DB : approximately 0.18 mg/dL
 0.8 mAbs at 550 nm.

Sensitivity for 1 mg/dL :
 Comparison study with commercially available reagent :
 TB : y = 1.0145 x + 0.00513 r = 0.9976
 DB : y = 1.0002 x - 0.00796 r = 0.9972

MANUAL PROCEDURE

Let stand reagents and specimens at room temperature.

Procedure n°1 :

Pipette into well identified test tubes :	TOTAL BILIRUBIN		DIRECT BILIRUBIN	
	Blank	Assay	Blank	Assay
Reagent R1	1 mL	1 mL		
Reagent R2			1 mL	1 mL
Distilled water	50 µL		50 µL	
Reagent R3 (Nitrite)		50 µL		50 µL
Mix				
Specimen	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

Mix well and start a timer when adding specimen.
 Read absorbances at 550 nm (530-580) against blanks.
 TB : reading after ≥ 3 minutes at 37°C or ≥ 5 minutes at room temperature.
 DB : reading at exactly 3 minutes at 37°C or 5 minutes at room temperature.

Procedure n°2 : Icteric or Pediatric Specimens

Pipette into well identified test tubes	TOTAL BILIRUBIN		DIRECT BILIRUBIN	
	Blank	Assay	Blank	Assay
Reagent R1	1 mL	1 mL		
Reagent R2			1 mL	1 mL
Distilled water	50 µL		50 µL	
Reagent R3 (Nitrite)		50 µL		50 µL
Mix				
Specimen	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Well mix and start a timer when adding specimen.
 Read absorbances at 550 nm (530-580) against blanks.
 TB : reading after ≥ 3 minutes at 37°C or ≥ 5 minutes at room temperature.
 DB : reading at exactly 3 minutes at 37°C or 5 minutes at room temperature.

- Notes :**
 1. Zero on distilled water and drain well the cuvette. Read first all blanks of one run then all the assays, well draining cuvette between each tubes. But **DO NOT RINSE WITH WATER** as it could produce streaks on the cuvette and lead to false results.
 2. Specific procedures are available upon request for automated instruments. Please contact BIOLABO technical support.

CALCULATION

Calculate the result as follows :

With calibrator (Procedure n°1 only) :
 Result = $\frac{\text{Abs (Assay - Blank) Specimen}}{\text{Abs (Assay - Blank) Calibrator}} \times \text{calibrator concentration}$

With factor :
 Procedure n°1 : mg/dL = [Abs. assay - Abs. Blank] x 11.4
 µmol/L = [Abs. assay - Abs. Blank] x 195

Procedure n°2 : mg/dL = [Abs. assay - Abs. Blank] x 53.0
 µmol/L = [Abs. assay - Abs. Blank] x 906

*This factors should be used as a guide only and may vary with instrument and the batch of reagent used. It is recommended to verify with elevated control serum
 (Procedure n°1: Use BIOLABO EXATROL-P, Procedure n°2: Use BIOLABO PAEDIATRIC CONTROL).

REFERENCES

(1) TIETZ N.W. Text book of clinical chemistry, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.P. Ashwood, W.B. Saunders (1998) p. 1133-1137.
 (2) Clinical Guide to Laboratory Test, 3rd Ed. N.W. TIETZ (1995) p. 88-91.
 (3) YOUNG D.S., Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests, 4th Ed. (1995) p. 3-90 to 3-110.
 (4) MALLOY H.T., EVELYN K., J Biol. Chem. (1937), 119, p. 481-490
 (5) WALTERS M., GERARDE H., Microchem J (1970) 15 p. 231-243
 (6) BERNARD S., Biochimie clinique, 2^{ème} ed Maloine, (1989), p.127-129 et p.280-282
 (7) Henry RJ, Clin Chem: Principles and technics. Harper and Row. p.892(1985).



BIOLABO REAGENTS
www.biolabo.fr

MANUFACTURER:
BIOLABO SA,
02160, Maizy, France

Total and Direct Bilirubin Sulfanilic acid method

Reagents for quantitative determination of total (DMSO as accelerator) and direct bilirubin in human serum and plasma

REF 80403 :	R1 1 x 200 mL R2 1 x 200 mL R3 1 x 20 mL	Total bilirubin Direct bilirubin Nitrite Solution
REF 80443 :	R1 2 x 200 mL R3 1 x 20 mL	Total bilirubin Nitrite Solution
REF 80553 :	R2 2 x 200 mL R3 1 x 20 mL	Bilirubine Directe Solution Nitrite



IVD IN VITRO DIAGNOSTIC USE

TECHNICAL SUPPORT AND ORDERS
Tel : (33) 03 23 25 15 50
Fax : (33) 03 23 256 256

CLINICAL SIGNIFICANCE (1) (5)

At least four distinct bilirubin species exist in the serum: Direct-reacting bilirubin (DB) consists of mono and diconjugated bilirubin (β and γ -bilirubin) and the δ -fraction which is bilirubin tightly bound to albumin; unconjugated α -bilirubin which is water soluble and bound to albumin. Total bilirubin (TB) is the sum of these different species. There are icteruses in which unconjugated bilirubin predominates (hemolytic icteruses, Biermer disease, Thalassemia...); icteruses in which conjugated bilirubin predominates (extra or intra-hepatic bile duct obstruction, viral hepatitis...); finally icteruses in which both species of bilirubin are present without any predominance (cirrhosis, Dubin-Johnson disease).

PRINCIPLE (4) (5)

Reaction between bilirubin and diazotised sulfanilic acid which leads to a compound, the azobilirubin, coloured in very acid or basic medium. Malloy-Evelyn principle modified by Walters and al: in an aqueous solution, only DB reacts. To enable the assay of TB, it is necessary to break the link between unconjugated bilirubin and albumin. This step is done by adding dimethylsulfoxide (DMSO). The absorbance of azobilirubin thus produced is proportional to the concentration of bilirubin and is measured at 550 nm (530-580).

REAGENTS COMPOSITION

Vial R1	TOTAL BILIRUBIN
Sulfanilic acid	30 mmol/L
DMSO	4 mmol/L
Hydrochloric acid	130 mmol/L
Vial R2	DIRECT BILIRUBIN
Sulfanilic acid	30 mmol/L
Hydrochloric acid	130 mmol/L
Vial R3	NITRITE SOLUTION
Sodium Nitrite	0.74 mmol/L

SAFETY CAUTIONS

- BIOLABO reagents are designated for professional, in vitro diagnostic use.
- Verify the integrity of the contents before use.
 - Use adequate protections (overall, gloves, glasses).
 - Do not pipette by mouth.
 - In case of contact with skin and eyes, thoroughly wash affected areas with plenty of water and seek medical advice.
 - Material Safety Data Sheet is available upon request.
 - Waste disposal: Respect legislation in force in the country.
- All specimens should be handled as potentially infectious, in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions. Respect legislation in force in the country.

REAGENTS PREPARATION

Reagents are ready for use. In case of important runs or automated system one can prepare single vial working reagent as follows: R1 or R2 (20 volumes)+R3 (1 volume).

STABILITY AND STORAGE

- Store at 2-8°C, in well capped original vial and away from light.
- When used and stored as described in the insert, reagents (vial R1, R2, R3) are stable, without contamination, until expiry date stated on the label.
 - Working reagent TB is stable for 2 days at 2-8°C.
 - Working reagent DB is stable for 7 days at 2-8°C.
- Discard any reagent if cloudy or if absorbance at 550 nm > 0.100. Don't use working reagents after expiry date stated on the label of the kit.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING (2) (7)

- Unhemolysed serum or plasma. Bilirubin is photolabile. Store the specimen away from light.
- Stability in the specimen: 4 to 7 days at 2-8°C, 2 days at room temperature.
- Icteric or pediatric specimens: see 5 MANUAL PROCEDURE.

INTERFERENCES (3)

- Hemoglobin: under-evaluation above 100 μ mol/L (160 mg/dL) of hemoglobin.
- Turbidity: No significant interference with TB. No significant interference with DB up to triglycerides concentration equivalent to 4.6 mmol/L.
- The bilirubin diazo reaction is temperature sensitive and should be carried out at a constant temperature. For a more comprehensive review of factors affecting this assay refer to the publication of Young D.S.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Basic medical analysis laboratory equipment.
2. Normal and pathological control sera.

CALIBRATION

1. Use the experimental factor (see 5 CALCULATION)
 2. Or a calibrator traceable to a reference method or material. BIOLABO-Multicalibrator REF 95015.
- The calibration frequency depends on proper instrument functions and on preservation of reagents.
- It is recommended to calibrate in the following cases:
1. When using a new batch of reagent.
 2. After maintenance operations on the instrument.
 3. When control values obtained are out of ranges, even after using a new vial of fresh serum.

Version : AT 80403 28 06 2008