



valtek

diagnostics

BILIRRUBINA DIRECTA (DIAZO ÁCIDO)

Reactivo líquido para la determinación fotométrica de Bilirrubina Directa en suero o plasma.

Para uso en el diagnóstico *in Vitro*.

SIGNIFICANCIA CLINICA

La bilirrubina es producto de la degradación de la hemoglobina en el sistema retículo endotelial, la cual es transportada al hígado unida a albúmina. Esta bilirrubina, conocida como bilirrubina indirecta o libre, es insoluble en agua y es conjugada en el hígado con ácido glucurónico, siendo excretada hacia el intestino por vía biliar, donde es metabolizada por la flora bacteriana. La bilirrubina total corresponde a la suma de la bilirrubina indirecta o libre, y la bilirrubina conjugada o directa. Un aumento en la bilirrubina total es producto de una obstrucción en la vía biliar; hepatitis; cirrosis; enfermedad hemolítica y algunas deficiencias enzimáticas hereditarias. La bilirrubina indirecta o libre, se encuentra elevada por causas pre-hepáticas, tales como enfermedades hemolíticas, o bien problemas metabólicos intra-hepáticos que involucran el proceso de conjugación. En neonatos es importante el control de la bilirrubinemia, ya que la bilirrubina indirecta o libre es neurotóxica.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La mayoría de los métodos utilizados para la determinación de bilirrubina utilizan ácido sulfanílico diazotizado, formándose azobilirrubina coloreada.

En medio acuoso sólo reacciona la bilirrubina conjugada o directa. En presencia de ácido sulfanílico diazotizado, los glucuronidos de bilirrubina y la bilirrubina-delta reaccionan, formándose azobilirrubina que en pH ácido presenta un peak de absorción a 560 nm.

La azobilirrubina formada es medida fotométricamente entre 540 y 600 nm, siendo la intensidad del color formado directamente proporcional a la cantidad de bilirrubina directa presente en la muestra.

REACTIVOS

Reactivo Sulfanílico: Conservado entre 2° y 30°C. y protegidos de la luz, estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Reactivo nitrito de sodio: Conservado entre 2° y 8°C. y protegido de la luz, estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Preparación reactivo de trabajo: Agregar al momento de utilizar, por cada 1 mL. de reactivo Sulfanílico, 1 gota de reactivo nitrito de sodio (o 0.05 mL.), mezclar. Estable por 24 horas protegido de la luz.

Composición reactivo de trabajo:

Acido sulfanílico	30 mM
HCl	165 mM
Nitrito de sodio	0.50 mM

MUESTRA

Utilizar suero o plasma libre de hemólisis. Realizar el ensayo dentro de un plazo no mayor a las 2 horas, en caso contrario refrigerar la muestra entre 2° y 8°C., o bien congelar a -20°C. para períodos más largos. Mantener protegidas de la luz.

MATERIAL NECESARIO NO INCLUIDO

Espectrofotómetro manual o automático o fotocolorímetro de filtros con cubeta termoestable, capaz de medir absorbancia a 560 nm (rango 540 a 600 nm), baño termoregulado, cronómetro, pipetas, calibrador y sueros controles.

TECNICA

Llevar el reactivo a la temperatura que se realizará el ensayo. Las pipetas a utilizar deben estar limpias y libres de residuos para no contaminar el reactivo.

		Desconocido	Blanco reactivo
Muestra	(mL)	0.10	----
Reactivo trabajo	(mL)	1.00	1.00
Agua destilada	(mL)	----	0.10
Mezclar e incubar EXACTAMENTE 3 minutos a temperatura ambiente (20° a 25°C.) o 1 minuto a 37°C., llevando a cero el instrumento con el blanco reactivo.			
$\Delta \text{ Abs.} = (\text{Abs. Muestra}) - (\text{Abs. Blanco})$			

CALIBRACION

- En la calibración se recomienda utilizar calibrador sérico VALTROL-C (código 210-130), proceder de igual forma que con las muestras.
- Se recomienda recalibrar en cualquier momento que se evidencie alguno de estos acontecimientos:
 - El lote de reactivo cambia
 - Se realiza un mantenimiento preventivo del equipo
 - Los valores de control han cambiado o se encuentran fuera de escala.

CALCULOS

Para obtener las concentraciones de bilirrubina directa, debe realizarse una curva de calibración o bien utilizar un factor a partir de un standard o calibrador de concentración conocida, con el cual se procede en la forma descrita para las muestras en la técnica especificada. El factor o la curva obtenida con el reactivo para determinación de bilirrubina total son válidos para la determinación de bilirrubina directa, se recomienda verificar su validez con cada nuevo kit de bilirrubina total.

$\text{FACTOR} = \frac{\text{Concentración Standard o Calibrador}}{\Delta \text{ Abs. Standard o Calibrador}}$
$\text{Concentración muestra (mg/dL)} = \text{FACTOR} \times \Delta \text{ Abs. Muestra}$

CONTROL DE CALIDAD

- Es conveniente analizar junto con las muestras sueros controles valorados para Bilirrubina Directa por este método. Se recomienda la utilización de los sueros controles VALTROL-N (código 210-100) y VALTROL-P (código 210-110).
- Si los valores obtenidos para los controles se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, el reactivo y el calibrador.
- Cada laboratorio debe disponer de su propio Control de Calidad y establecer las correcciones necesarias en caso de que no se cumpla con las tolerancias permitidas para los controles.

ADVERTENCIAS Y MEDIDAS DE PRECAUCION:

- Sueros ictericos: Debe emplearse la técnica descrita con la muestra diluida en suero fisiológico, de acuerdo a la severidad de la ictericia. El resultado obtenido se multiplica por la dilución utilizada.
- Es recomendable el realizar un blanco para cada muestra, en tal caso se utiliza solamente reactivo Sulfanílico.
- Proteger las muestras de la luz directa.
- Consultar en nuestra página WEB la ficha de seguridad de este reactivo y observar todas las medidas de precaución necesarias para la manipulación y eliminación de residuos.
- Para técnica en autoanalizadores se recomienda utilizar kit específico (código 300040).

ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO:

-Linealidad: hasta 6,0 mg/dL

Para valores superiores a 6,0 mg/dL, diluir la muestra con suero fisiológico y el resultado obtenido se multiplica por el factor de dilución.

-Límite de detección: 0.05 mg/dL

- Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0.105 A

-Interferencias: Hemoglobina sobre 1,0gr/dL y la lipemia (triglicéridos sobre 500 mg/dL) podrían interferir en la técnica. Otros medicamentos y sustancias podrían interferir (4).

-Exactitud: Los reactivos VALTEK no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

-Repetibilidad intraserie: n = 20

<u>Nivel</u>	<u>Media (mg/dl)</u>	<u>C.V.</u>
Normal	0,75	1,05%
Patológico	1,4	0,56

-Reproducibilidad interserie: n = 20

<u>Nivel</u>	<u>Media (mg/dl)</u>	<u>C.V.</u>
Normal	0,61	1,17%
Patológico	1,1	1,15%

Estos datos han sido obtenidos utilizando un autoanalizador MINDRAY de la serie BS. Los resultados pueden variar al cambiar de instrumento o al realizar el procedimiento manualmente.

-Certificado de Conformidad y Trazabilidad disponible a solicitud

RANGOS DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia en función de la población de pacientes. Los rangos de referencia que se enumeran a continuación están tomados de la bibliografía existente.

Bilirrubina Directa: 0 a 0.3 mg/dL

PRESENTACIONES DISPONIBLES

CODIGO	CONTENIDO	
040-110	Reactivo Sulfanílico	2 x 250 mL
	Reactivo Nitrito de Sodio	2 x 12.5 mL
040-115	Reactivo Sulfanílico	2 x 100 mL
	Reactivo Nitrito de Sodio	1 x 12.5 mL
040-130	Reactivo DMSO	1 x 250 mL
	Reactivo Sulfanílico	1 x 250 mL
	Reactivo Nitrito de Sodio	2 x 12.5 mL
040-135	Reactivo DMSO	1 x 100 mL
	Reactivo Sulfanílico	1 x 100 mL
	Reactivo Nitrito de Sodio	1 x 12.5 mL

BIBLIOGRAFIA

1. Malloy H.T. & Evelyn K.A., J. Biol. Chem. 119(481),1937.
2. Jendrassic L. & Grof P., Biochem Z. 291(81),1938.
3. Walters M. I. & Gerarde H. W., Micro J. 15(231)1970.
4. Young D.S., effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press,1995.

REV Nº 2