



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*. Apto para usar en autoanalizador.

## 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 directa utilizan ácido sulfanílico diazotizado, formándose azobilirrubina coloreada.

En medio acuoso sólo reacciona la bilirrubina conjugada o directa. En presencia de ácido sulfanílico diazotizado, los glucurónidos 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 1 (R1): solución estabilizada de ácido sulfanílico 29 mM en HCl 0.170 M
- Reactivo 2 (R2): solución estabilizada de nitrito de sodio 72m M.

Conservados entre 2º y 8ºC., protegidos de la luz, sin abrir, estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez abiertos son estables 40 días conservados entre 2º y 8ºC si permanece refrigerada en el analizador o en un frigorífico.

## PREPARACIÓN REACTIVO DE TRABAJO:

R1 y R2 Están listos para su utilización.

Evite la contaminación de los reactivos. No congelar.

## MUESTRAS

Utilizar suero o plasma (EDTA) libre de hemólisis. Utilice preferentemente suero recién extraído. Mantener las muestras protegidas de la luz.

Centrifugue las muestras que contienen precipitados antes de realizar el ensayo.

## MATERIAL NECESARIO NO INCLUIDO

Analizador automático capaz de medir absorbancia a 546 nm (rango 520-550 nm), suero fisiológico, calibrador y sueros controles.

## TECNICA

Llevar el reactivo a 37º C antes de realizar el ensayo.

	Desconocido	Blanco reactivo
Muestra o Calibrador (µL)	16	----
R1 (µL)	160	160
Agua destilada (µL)	----	16
Mezclar, incubar durante 5 minutos a 37º C, leer la absorbancia del blanco y, a continuación, añadir:		
R2 (µL)	40	40
Mezclar en profundidad, incubar durante 5 minutos a 37º C y volver a leer la absorbancia. Calcule la absorbancia de la muestra restando el blanco reactivo.		

La absorbancia del blanco del reactivo a 546 nm debe ser < 0.2 A.

Adaptaciones para la aplicación de este reactivo en autoanalizadores están disponibles a solicitud. Es responsabilidad del laboratorio validar esta aplicación.

## CALIBRACION

- En la calibración se recomienda utilizar calibrador sérico VALTROL-C (código 210-130) y suero fisiológico para realizar calibración de 2 puntos. 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 del equipo.
  - Los valores de control han cambiado o se encuentran fuera de rango.

## CALCULOS

Factor = $\frac{\text{Concentración Calibrador (mg/dL)}}{\text{Abs. Calibrador}}$
Bilirrubina Directa (mg/dL) = Factor x Abs. Muestra

El autoanalizador calcula automáticamente la concentración de bilirrubina directa de cada muestra.

Factor de conversión: mg/dL \* 17.1 = µmol/l

## 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:

- Proteger las muestras de la luz directa, ya que puede ocasionar un descenso de hasta un 50% de la bilirrubina presente en la muestra en 1 hora (4).
- 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.

#### ESPECIFICACIONES DE DESEMPEÑO:

ESTUDIOS DE PRECISIÓN (de acuerdo a CLSI EP05-A2)

Los resultados se muestran en la siguiente tabla. U:  $\mu\text{mol/l}$

Tipo de imprecisión	Nivel I		Nivel II			
	Media	DE	CV%	Media	DE	CV%
En secuencia	13.08	0.01	0.75	59.04	0.45	0.77
Entre secuencias		0.15	1.14		0.64	1.09
Entre días		0.16	1.23		0.75	1.26
En dispositivo		0.24	1.84		1.08	1.83

#### LINEALIDAD

La linealidad de este método es de 0.06 a 15.2 mg/dl

Para valores superiores a 15.2 mg/dl diluir la muestra por ejemplo 1:5 con suero fisiológico y el resultado obtenido se multiplica por cinco.

#### INTERFERENCIAS

Para este método de análisis de la bilirrubina directa, se evaluó la interferencia producida por el ácido ascórbico en un analizador de la serie Mindray, aplicando un límite de aceptabilidad de un 10% de desviación de la media de control.

Concentración del analito	Substancia analizada	Efecto observado
20 mg/dl	Ácido Ascórbico	Sin interferencia significativa (dentro de $\pm 10\%$ )

Muestras altamente lipémicas (Triglicéridos  $\geq 500$  mg/dl) interfieren en el ensayo. La interferencia puede corregirse preparando un blanco de muestra antes de aplicar la fórmula general de cálculo

#### COMPARACIÓN DE MÉTODOS

Los resultados de este método (y) se compararon con los de un método de referencia (x) empleando un analizador de la serie Mindray. Con 40 muestras se obtuvo la siguiente correlación ( $\mu\text{mol/l}$ ):

$$y = 0.9342x + 2.437, R^2 = 0.9984$$

Todas las marcas de fábrica, nombres de productos y nombres comerciales son de propiedad de sus respectivas empresas.

#### LÍMITES DE DETECCIÓN

La concentración de Bilirrubina Directa mínima detectable con un aceptable nivel de precisión (99.7%) es de 0.06 mg/dl

Todos los datos de desempeño 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 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 ( $\leq 5.13 \mu\text{mol/l}$ )

#### PRESENTACIONES DISPONIBLES

CODIGO	CONTENIDO
DBI0102 R1	4 x 20 ml
R2	1 x 20ml
DBI0103 R1	4 x 32 ml
R2	4 x 8ml

#### BIBLIOGRAFIA

1. Malloy H.T. & Evelyn K.A., J. Biol. Chem. 119(481),1937.
2. Jendrassik 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, 4<sup>th</sup> ed. AACC Press,1995.
5. Tholen, D; Kallner, A; Kennedy, J; Krouwer, J; Meier, K. EP5-A2. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition. Vol 24 N° 25.
6. Tholen, D; Kroll, M; Astles, J; Krouwer, J; Lasky, F. EP6-A. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Methods: A Statistical Approach; Approved Guideline. Vol. 23 N° 16.
7. McEnroe, R; Burritt, M; Powers, D; Rheinheimer, D; Wallace, B. EP7-A2. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline. Vol. 25 N° 27.
8. Krouwer, J; Tholen, D; Garber, C; Glodschmidt, H; Kroll, M; Linnet, K; Meier, K. Robinowitz, M; Kennedy, J. EP9-A2. Methods Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline. Vol. 22 N° 19.
9. Tholen, D; Linnet, K; Kondratovich, M; Armbruster, D; Garret, P; Jones, R; Kroll, M; Lequin, R; Pankratz, T; Scasselati, G; Schimmel, H; Tsai, J. EP17-A. Protocols for determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline.
10. Jing Zhang Ji, Qing H. Meng, Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. Clinica Chimica Acta 412 (2011) 1550–1553
11. R.. Rubén Gómez Riojaa,b,, , M.J.. María Jesús Alsina Kirchnera,c, Virtudes Álvarez Funesa,d, Nuria Barba Meseguera,e, Mariano Cortés Riusa,f, M.A.. María Antonia Llopis Díaza,c, Cecilia Martínez Brua,f. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. Revista del Laboratorio Clínico Vol. 2 Núm.4; 2009.

Fabricado por Mindray

REV N° 3