



# Bilirrubina Directa

AA

Método DPD para la determinación de bilirrubina directa en suero o plasma

## SIGNIFICACION CLINICA

La bilirrubina, compuesto de degradación de la hemoglobina, es captada por el hígado para su conjugación y excreción en la bilis. Las alteraciones hepatocelulares u obstrucciones biliares pueden provocar hiperbilirrubinemias.

La eritroblastosis fetal o anemia hemolítica del recién nacido es una patología provocada por incompatibilidad materno-fetal en la que se produce una destrucción excesiva de glóbulos rojos. Esto resulta en un severo aumento de la bilirrubina sérica con el consecuente riesgo de difusión del pigmento al sistema nervioso central, por lo que la determinación de la bilirrubina en estos niños recién nacidos resulta sumamente importante.

## FUNDAMENTOS DEL METODO

La bilirrubina directa reacciona con la sal de diclorofenildiazonio (DPD) formando un azocompuesto de color rojo en solución ácida.

## REACTIVOS PROVISTOS

**A. Reactivo A:** viales conteniendo sal de diclorofenildiazonio.

**B. Reactivo B:** solución acuosa conteniendo ácido sulfámico 90 mmol/l.

**C. Reactivo C** (Reactivo para Blanco de Muestra): solución acuosa conteniendo ácido sulfámico 90 mmol/l.

### Concentraciones finales

ácido sulfámico ..... 90 mmol/l  
cloruro de sodio ..... 6,6 g/l  
diclorofenildiazonio ..... 0,1 mmol/l

## REACTIVOS NO PROVISTOS

**Calibrador A plus** de Wiener lab.

## INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Reactivos B y C:** listos para usar.

**Reactivo de Trabajo:** reconstituir cada frasco de Reactivo A con 10 ml de Reactivo B. Tapar y agitar hasta disolución completa. Homogeneizar y fechar.

## PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Los Reactivos B y C son irritantes. H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 +

P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos. Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

## INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Lecturas del blanco de Reactivos superiores a 0,100 D.O. a 546 nm, son indicio de deterioro de los reactivos. Desechar. La turbidez indica deterioro de los reactivos. En tal caso, desechar.

## ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**Reactivos Provistos:** estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

**Reactivo de Trabajo:** estable 21 días en refrigerador (2-10°C).

## MUESTRA

Suero o plasma

**a) Recolección:** obtener de la manera habitual. Proteger de la luz natural o artificial envolviendo el tubo con papel negro.

**b) Aditivos:** en caso de que la muestra sea plasma, debe usarse heparina para su obtención.

**c) Sustancias interferentes conocidas:** no se observan interferencias por hemoglobina hasta 180 mg/dl, triglicéridos hasta 550 mg/dl (5,50 g/l), ni heparina hasta 20 U/ml.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

**d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** la muestra debe ser preferentemente fresca. En caso de no efectuarse el ensayo en el momento, la muestra puede conservarse hasta 48 horas en refrigerador (2-10°C) y la sangre entera no más de 24 horas en refrigerador (2-10°C) o 12 horas a temperatura ambiente (menor de 25°C).

La acción de la luz es capaz de destruir hasta un 50% de la bilirrubina presente en la muestra, por lo que debe protegerse cuidadosamente.

## MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados
- Tubos o cubetas espectrofotométricas
- Cronómetro

## CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 546 nm en espectrofotómetro o 520-550 nm

- en fotocolorímetro con filtro verde.
- Temperatura de reacción: temperatura ambiente (< 25°C)
- Tiempo de reacción: 10 minutos
- Volumen de muestra: 40 ul
- Volumen final de reacción: 0,54 ml

### PROCEDIMIENTO

En 4 tubos marcados B<sub>C</sub> (Blanco de Calibrador), C (Calibrador), B<sub>D</sub> (Blanco de Desconocido) y D (Desconocido), colocar:

	B <sub>C</sub>	C	B <sub>D</sub>	D
<b>Reactivo C</b>	0,5 ml	-	0,5 ml	-
<b>Reactivo B</b>	-	0,4 ml	-	0,4 ml
<b>Calibrador</b>	40 ul	40 ul	-	-
<b>Muestra</b>	-	-	40 ul	40 ul
<b>Reactivo de Trabajo</b>	-	0,1 ml	-	0,1 ml

Mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente (menor a 25°C). Leer en espectrofotómetro a 546 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (520-550 nm), llevando a cero el aparato con el Blanco de Reactivo (B<sub>R</sub>).

Se pueden aumentar proporcionalmente los volúmenes.

Nota: procesar un Blanco de Reactivos (B<sub>R</sub>) por cada serie de determinaciones mezclando 0,4 ml de Reactivo B + 40 ul de agua destilada + 0,1 ml de Reactivo de Trabajo.

### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

La absorbancia debe ser leída a los 10 minutos exactos.

### CALCULO DE LOS RESULTADOS

Bilirrubina directa (mg/l) = (D - B<sub>D</sub>) x f

donde:

$$f = \frac{X^* \text{ mg/l}}{C - B_C}$$

\* concentración de bilirrubina directa en el **Calibrador A plus** de Wiener lab.

Ejemplo:

B<sub>C</sub> = 0,008

C = 0,135

B<sub>D</sub> = 0,009

D = 0,029

X = 23,9 mg/l

$$f = \frac{23,9 \text{ mg/l}}{0,135 - 0,008} = 188,2 \text{ mg/l}$$

Bilirrubina directa (mg/l) = (0,029 - 0,009) x 188,2 = 3,8 mg/l

También se puede emplear el factor colorimétrico (f) calculado usando **Bilirrubina Standard** de Wiener lab. en la técnica de **Bilirrubina Total AA** de Wiener lab. (método DPD).

### METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad

(**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de bilirrubina directa, con cada determinación.

### VALORES DE REFERENCIA

#### Bilirrubina directa en suero o plasma:

Adultos: hasta 2 mg/l

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

### CONVERSION DE UNIDADES

Bilirrubina (mg/l) = Bilirrubina (mg/dl) x 10

Bilirrubina (mg/dl) x 17,1 = Bilirrubina (umol/l)

### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

La acción de la luz, tanto sobre los sueros como sobre las soluciones standard, es capaz de destruir en una hora hasta el 50% de la bilirrubina presente.

### PERFORMANCE

Los ensayos fueron realizados en analizador automático Express Plus<sup>®</sup>. Si se usa el procedimiento manual, se debe validar que se obtenga una performance similar a la siguiente:

**a) Reproducibilidad:** aplicando el protocolo EP5-A del CLSI (ex NCCLS), se obtuvieron los siguientes resultados:

#### Precisión intraensayo

Nivel	D.S.	C.V.
1,4 mg/l	± 0,05 mg/l	4,03 %
18,0 mg/l	± 0,24 mg/l	1,33 %

#### Precisión total

Nivel	D.S.	C.V.
1,4 mg/l	± 0,06 mg/l	5,09 %
18,0 mg/l	± 0,36 mg/l	2,00 %

**b) Linealidad:** aplicando el protocolo EP6-P, se obtuvo una linealidad de 140 mg/l. Para valores superiores, repetir la determinación empleando muestra diluida 1:2 ó 1:4 con solución fisiológica, multiplicando el resultado obtenido por 2 ó 4 según el caso.

**c) Sensibilidad analítica:** 1,1 mg/l.

### PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso.

Para la calibración debe emplearse **Calibrador A plus** de Wiener lab.

El equipo provee Reactivo para Blanco de Muestra (Reactivo C) que sólo es requerido en algunos analizadores automáticos. En el resto de los analizadores este Reactivo no es necesario.

Para mayor información referirse al manual de adaptaciones de Reactivos Wiener lab. de su analizador.

### PRESENTACION

200 ml (Cód. 1009306): - 4 viales Reactivo A

- 4 x 10 ml Reactivo B

- 4 x 40 ml Reactivo C


200 ml (Cód. 1120006): - 4 viales Reactivo A  
- 4 x 50 ml Reactivo B  
- 2 x 100 ml Reactivo C

## BIBLIOGRAFIA

- Bartels, H. and Boehmer, M. - Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. (1971).
- Colombo, J.; Peheim, E.; Kyburz, S. and Hoffman - Clin. Chim. Acta 51/2:217 (1974).
- Botwell, J. H. - Clin. Chem. 10/3:197 (1964).
- Watson, D. - Clin. Chem. 7/6:603 (1961).
- Ichida, T. and Nobuoka, M. - Clin. Chim. Acta 19/2:249 (1968).
- Rand and Di Pascua - Clin. Chem. 8/6 (1962).
- Zaroda, R. - Am. J. Clin. Path. 45/1:70 (1996).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 3rd ed. (1990).
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3<sup>rd</sup> ed. (1999).
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS). Document "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP6-P (1986).
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS). Document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Devices", EP5-A (1999).

## SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:


 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso


 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
Cert. N°: 4100/00



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina