

## Uso previsto

Para la determinación cuantitativa de bilirrubina directa en suero, utilizando los analizadores Yumizen C230 y Yumizen C240. Sólo para diagnóstico *in vitro*. **Rx Only**.

## Historia del método

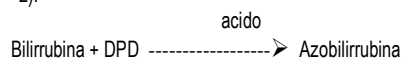
Desde que, en 1883, Ehrlich introdujera el método diazo para la determinación de bilirrubina<sup>1</sup> se han propuesto diversas modificaciones para mejorar la reacción. El método de Malloy y Evelyn<sup>2</sup> emplea metanol para catalizar la reacción de acoplamiento azoico de la bilirrubina indirecta, así como para mantener la azobilirrubina en solución. Una seria desventaja de este método es el hecho de que la proteína puede ser precipitada por la solución de metanol para producir falsos resultados bajos.

En 1938, Jendrassik y Grof.<sup>3</sup> presentaron un ensayo que dio resultados fiables. Sin embargo, el método es engorroso e implica varios pasos de pipeteo.

El método presentado aquí fue desarrollado por Wahlefeld et al.<sup>4</sup> El reactivo diazo es tetrafluoroborato de 2,5-diclorofenildiazonio (DPD) que reacciona muy rápidamente al acoplarse con la bilirrubina en condiciones ácidas. El procedimiento resultante es simple, pero muestra una buena correlación en comparación con el método de Jendrassik y Grof.

## Principio

La bilirrubina directa se combina con una sal de diazonio (DPD) en un medio fuertemente ácido (pH 1 – 2).



La intensidad del color de la azobilirrubina producida es proporcional a la concentración de bilirrubina directa y puede medirse fotométricamente.

## Reactivos

1. Reactivo de bilirrubina directa R1: disolución amortiguadora ácida 50 mmol/L.
2. Reactivo de bilirrubina directa R2: disolución amortiguadora ácida >30 mmol/L, >2,0 mmol/L DPD y estabilizadores

## Precauciones

1. Los reactivos son tóxicos y corrosivos. No pipetee con la boca. Evite el contacto con la piel y la ropa.
2. Este reactivo está indicado exclusivamente para el diagnóstico *in vitro*.

## Preparación de los reactivos

Los reactivos se suministran listos para usar.

## Almacenamiento de reactivos

1. Los reactivos envasados pueden almacenarse a una temperatura de 2-8°C. El reactivo es estable hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta cuando se almacena según las instrucciones.
2. No congele los reactivos.
3. Evite la exposición a la luz solar directa.

## Deterioro de los reactivos

1. No usar si los reactivos muestran evidencia de contaminación microbiana (turbidez).
2. Si el R2 desarrolla una precipitación muy ligera que se vuelve a disolver cuando el R2 se calienta despacio, se puede usar el reactivo.
3. No se debe utilizar el reactivo R2 que contiene un precipitado que no se vuelve a disolver y provoca la decoloración del producto.
4. No lo use si el reactivo no logra alcanzar los valores de ensayo asignados de los sueros de control nuevos.

## Extracción y almacenamiento de muestras

1. Se recomienda suero nuevo y sin hemolizar.<sup>5</sup>
2. Las muestras deben analizarse dentro de las dos horas posteriores a la extracción si se mantienen a temperatura ambiente y en la oscuridad y dentro de las doce horas si se mantienen refrigeradas (2-8°C) y protegidas de la luz.<sup>6</sup>
3. La bilirrubina en suero es estable durante tres meses cuando se almacena congelada (-20°C) y protegida de la luz.<sup>6</sup>
4. La luz solar directa puede causar una disminución de la bilirrubina de hasta un 50% en una hora.<sup>7</sup>

5. La extracción de muestras debe realizarse de conformidad con NCCLS M29-T2. Ningún método puede ofrecer una garantía total de que las muestras de sangre humana no transmitan infecciones. Por tanto, todas las muestras de sangre deben considerarse potencialmente infecciosas.

## Interferencias

1. Todos los estudios de interferencia se realizaron de conformidad con los procedimientos recomendados en la directriz NCCLS N° EP7-P para pruebas de interferencia en química clínica.<sup>8</sup>
2. Los niveles de hemoglobina sérica de hasta 100 mg/dL no interfieren con los resultados.
3. Los triglicéridos séricos hasta 500 mg/dL no interfieren con los resultados.
4. Una serie de fármacos y sustancias afectan a los resultados de la bilirrubina. Véase Young, et al.<sup>9</sup>

## Materiales suministrados

Reactivos de bilirrubina directa R1 y R2

## Materiales necesarios, pero no suministrados

1. Analizador Yumizen C230 / Yumizen C240.
2. Manual de instrucciones de Yumizen C230 / Yumizen C240.
3. Calibrador químico Pointe, número de catálogo C7506-50
4. Control químico Pointe, número de catálogo C7592-100

## Parámetros de prueba

|                   |             |                        |                     |
|-------------------|-------------|------------------------|---------------------|
| Test:             | DBIL        | Química:               | Bilirrubina directa |
| Nº. de química    | 205         | Imprimir nombre:       | Bilirrubina directa |
| Tipo de reacción: | Punto final | Detección de reacción: | Positivo            |
| Onda Pri.:        | 546 nm      | Onda Onda              | 670 nm              |
| Decimal.:         | 0,1         | Muestra Tipo:          | Suero               |
| Tiempo de blanco: | -2 -1       | Tiempo de reacción:    | 3 4                 |
| Unidad:           | mg/dL       | Tiempo de incubación:  | 3                   |

|            | Vol. de muestra | Aspirado | Diluyente | Vol. de reactivo | Diluyente |
|------------|-----------------|----------|-----------|------------------|-----------|
| Estándar;  | 4               | uL       | uL        | 180              | uL uL     |
| Reducido;  |                 | uL       | uL        | 47               |           |
| Aumentado; |                 | uL       | uL        |                  |           |

|                                  |               |                                |               |
|----------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| Rango de linealidad (Estándar);  | 0.1-10        | Límite de linealidad:          |               |
| Rango de linealidad (Reducido):  |               | Agotamiento del sustrato:      |               |
| Rango de linealidad (aumentado): |               | Abs. de blanco mezclado:       | - 40000 40000 |
| Abs. de blanco de R1:            | - 40000 40000 | Estabilidad en el equipo:      | 30 Día(s)     |
| Respuesta de blanco              | - 40000 40000 | Límite de alarma del reactivo: | 5             |
| Química idéntica:                |               |                                |               |

|                          |     |      |
|--------------------------|-----|------|
| Comprobación de prozona: |     |      |
| Q1:                      | Q2: | Q3:  |
| Q4:                      | PC: | ABS: |

|                             |        |
|-----------------------------|--------|
| Usar resultado cualitativo: |        |
| Rango:                      | Aviso: |

|                            |              |        |
|----------------------------|--------------|--------|
| Compensación de pendiente: |              |        |
| Pendiente                  | Compensación | Unidad |
| 1                          | 0            | mg/dL  |

# Conjunto de reactivos Bilirrubina directa Pointe

Pretratamiento:

Vol. de muestra de pretratamiento: uL Vol. de reactivo de pretratamiento: uL

Rango de ref.:

Tipo de muestra: Género: Rango de edad: Rango de ref.: Rango crítico: Unidad:

## Parámetros de configuración de calibración

Quím: Bili D.

Config. calibración

Modelo mat: Lineal de dos puntos

Factor: Réplicas: 2

Límites de aceptación

Tiempo Cal: 336 hr.

Dif. Pendiente: SD:

Sensibilidad: Repetibilidad: \* Definido por el usuario

Coef. Deter:

Auto Calib.

Tiempo cal

| Calibrador | Conc. | Pos. | N° lote |
|------------|-------|------|---------|
| Agua       | 0,0   | W    |         |
| Cal quím   | *     | *    |         |

4. Precisión: Los estudios de precisión se realizaron, utilizando los analizadores de la serie Yumizen 200 siguiendo una modificación de las pautas del documento NCCLS EP5-T2.<sup>10</sup>

| Intraserial |      |       | Día a Día |      |       |
|-------------|------|-------|-----------|------|-------|
| Media       | S.D  | % C.V | Media     | S.D  | % C.V |
| 0,48        | 0,05 | 10,1  | 0,39      | 0,05 | 12,8  |
| 1,92        | 0,09 | 4,5   | 1,91      | 0,11 | 5,8   |

## Referencias

- Ehrlich, P., Charite Ann. 8:140(1883).
- Malloy, H.T., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481 (1937).
- Jendrassik, L., Grof, P., Biochem. Zeitschr. 297:81 (1938).
- Wahlefeld AW, et al. Scand J Clin Lab Invest. 29 Supplement 126(1972).
- Michaelsson, M. Scand. J. Clin. Lab. Invest (Suppl. 49) 13:1 (1961)
- Martinek, R.G., Clin. Chem. Acta 13:161 (1966).
- Tietz, N.W. Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, P. 1028 (1976).
- NCCLS document, "National Evaluation Protocols for Interference Testing", Evaluation Protocol Number 7, Vol. 4, No. 8, (June 1984).
- Young, D.S., Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests, Washington DC, AACCPress, (1997)
- NCCLS document, "Evaluations of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2<sup>nd</sup> Ed. (1992)
- Gambino, S.R., et al, Bilirubin Assay (Revised), Commission on Continuing Education, Am. Soc. of Clin. Path., Chicago, (1968).

## Calibración

Utilice un calibrador de suero identificable en NIST. Siga las instrucciones de aplicación del instrumento para la calibración. Consulte las instrucciones del manual del instrumento para conocer los procedimientos y la frecuencia de calibración. Se recomienda que cada laboratorio determine su propia frecuencia de calibración.

## Control de calidad

La validez de la reacción debe controlarse mediante el uso de sueros de control con valores de bilirrubina directa normales y anormales conocidos. Estos controles deben realizarse, al menos, con cada turno de trabajo en el que se realicen análisis de bilirrubina directa. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propia frecuencia de determinación de control. Los requisitos de control de calidad deben realizarse de conformidad con la normativa local, estatal y/o nacional o con los requisitos de acreditación.

## Cálculos (Ejemplo)

Abs. = Absorbancia

Desc. = Desconocido

Cal. = Calibrador

$\frac{\text{Abs. Desc.} - \text{Abs. Desc. Blanco}}{\text{Abs. Cal.} - \text{Abs. Cal. Blanco}} \times \text{Conc. de Cal. (mg/dL)} = \text{Bilirrubina Directa (mg/dL)}$

Abs. Cal. - Abs. Cal. Blanco

Muestra: Si Abs. de Desconocido = 0,35, Abs. de Blanco Desconocido = 0,01, Abs. de Calibrador = 0,25, Abs. de calibrador en blanco = 0,01, Concentración de calibrador = 4,0 mg/dL

Por tanto:  $\frac{0,35 - 0,01}{0,25 - 0,01} \times 4 = \frac{0,34}{0,24} \times 4 = 5,7 \text{ mg/dL}$

## Valores esperados (Directa)<sup>7,11</sup>

Adultos y bebés (de más de un mes): 0 – 0,5 mg/dL

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

## Limitaciones

- Las muestras con valores superiores a 10 mg/dL deben diluirse 1:1 con solución salina isotónica, volver a analizarse y el resultado final multiplicarse por dos.
- Los niveles séricos de hemoglobina de hasta 100 mg/dL y triglicéridos de hasta 500 mg/dL no interfieren con los resultados.

## Rendimiento

- Linealidad: 10,0 mg/dL
- Límite de detección (Sensibilidad): 0,1 mg/dL
- Comparación: Se realizó un estudio entre los analizadores de la serie Yumizen 200 y un analizador similar, usando este método, que dio como resultado un coeficiente de correlación de 0,999 con una ecuación de regresión de  $y=0,985x - 0,12$ .

## Clave de símbolo

|  |   |
|--|---|
| Usar antes de (AAAA-MM-DD)                                   | <b>LOT</b> Lote y código de lote                  |
| <b>REF</b> Número de catálogo                                | Fabricante  |
| <b>IVD</b> Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i> | Limitación de temperatura                         |
| Consultar instrucciones de uso                               | <b>Rx Only:</b> Venta exclusiva con receta médica |
| Marca CE   | Representante autorizado en la Comunidad Europea  |

**REF** 12-HB936-156

Fabricado por  
HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand  
5449 Research Drive Canton, MI 48188



**IVD**

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Representante Europeo Autorizado:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BÉLGICA

Tel.: (+32)2.732.59.54 Fax: (+32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



## Certificado para emplear reactivos

Los reactivos Pointe están certificados para ser fabricados de acuerdo con los parámetros especificados. Cualquier producto de reactivo Pointe que no cumpla con las especificaciones hasta la fecha de vencimiento indicada se reparará de inmediato sin cargo.