

**REACTIVO PARA BILIRRUBINA DIRECTA****USO:**

Para determinación cuantitativa de bilirrubina directa en suero.

HISTORIA DEL METODO:

Se describió en 1884 por Ehrlich como una reacción en la cual la bilirrubina se une con Acido Sulfanilico Diazotizado (ácido-p-Diazobenzensulfónico) para producir un tinte de color rosa en medio ácido y azul en medio alcalino. La medición de la forma azul ha sido la más popular a mayor sensibilidad.

Se puede distinguir y cuantificar dos tipos de bilirrubina con esta reacción. La forma directa, que consiste en un conjugado de derivados solubles en agua y la ausencia de algún acelerador o solubilizador. La forma directa, que consiste en un conjugado de bilirrubina libre unida a Albumina de suero. Esta forma se le llama Bilirrubina Total. La diferenciación entre directa e indirecta es importante en diagnósticos de hiperbilirrubinemia.

PRINCIPIO:

El ácido sulfanilico reacciona con nitrato de sodio para producir Acido Sulfanilico Diazotizado. La Bilirrubina directa se une con el Diazo para formar Azobilirrubina. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de Bilirrubina presente en la muestra.

REACTIVOS:

1. Reactivo de Bilirrubina Directa: Acido Sulfanilico 32 mM en Acido Clorhídrico diluido.
2. Reactivo de Nitrito de Sodio 60 mM.
3. Calibrador de Bilirrubina: N-1-Naftiletildiamina solución Dihidrocólida. Valor en la etiqueta.

PRECAUCION:

Los reactivos son tóxicos y corrosivos. No pipetee con la boca. Evite contacto con la piel y la ropa.

Este reactivo es para diagnóstico "In Vitro".

PREPARACION:

Reactivo de trabajo de bilirrubina directa: Agregue 0.005 ml. (5ul) de reactivo de Nitrito por 1.0 ml. de reactivo de Bilirrubina; Mezcle. Ejemplo: 0.05 ml. Nitrito en 10 ml. de reactivo de Bilirrubina.

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS:

1. Los reactivos empaquetados deben almacenarse a temperatura ambiente.

2. El calibrador debe de ser almacenado a 2-8°C.
3. El reactivo de trabajo combinado puede ser almacenado en una botella ámbar y 10 días o más a 2-8°C.
4. No congele los reactivos
5. Evite la luz solar directa.

DETERIORO: NO SE USE SI:

1. El reactivo de Nitrito de Sodio tiene un color amarillo descolorido.
2. El reactivo de trabajo no da al comparar contra los valores asignados para el ensayo de control de sueros frescos.

COLECCION Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA:

1. Se recomienda usar suero No hemolizado.
2. Las muestras deben de ser analizadas en las dos horas de la toma si se mantiene a temperatura ambiente en la obscuridad y en 12 horas si se mantiene en la temperatura 2-8°C. y protegida de la luz.
3. La Bilirrubina en suero es estable 3 meses cuando se mantiene congelada (-20°C) y protegida de la luz.
4. La luz solar directa puede causar un descenso del 50% en la Bilirrubina en una hora.

MATERIALES PROVISTOS:

1. Reactivo Bilirrubina directa
2. Reactivo Nitrito de Sodio
3. Calibrador Bilirrubina

MATERIALES REQUERIDOS NO PROVISTOS:

1. Instrumentos de pipeteo precisos.
2. Reloj
3. Tubos y/o gradilla
4. Espectrofotómetro 555 nm (540-560 nm)

PROCEDIMIENTO AUTOMATIZADO:

Ver instrucciones específicas del instrumento.

PROCEDIMIENTO MANUAL:

	PRUEBA	
BLANCO		
Reactivo de trabajo (ml)	1.0	-
React. bilirrubina directa (ml)	-	1.0
Muestra (ml)	0.10	0.10

1. Etiquete los tubos: Blanco, standard, control, paciente, etc. cada tubo requiere un blanco.

- Pipetee 1.0 ml. de reactivo de Bilirrubina en todos los tubos blanco.
- Prepare el reactivo de trabajo.
- Pipeteé 1.0 ml. de reactivo de trabajo en todos los tubos.
- A intervalos de tiempo medidos agregue 0.1 ml. (100 ul) de muestra a los tubos respectivos.
- Permita que reaccionen 5 minutos a temperatura ambiente (1 minuto a 37°C).
- Ponga el espectrofotómetro en ceros con reactivo blanco a 555 nm.
- Lea y anote la absorbancia en todos los tubos.
- Cálculos.

NOTA:

El color seguirá aumentando por la presencia de la fracción indirecta, el conteo de tiempo debe ser exacto.

VOLUMEN PEDIATRICO:

Para muestras pediátricas con Bilirrubina arriba de 3.0 mg. diluya 1:1 con solución salina y multiplique el resultado por 2.

VOLUMEN ALTERNATIVO:

Para instrumentos que requieren un volumen total de 1.0 utilice 3.0 ml. de reactivo y 0.200ml. (20ul) de muestra siga las indicaciones.

CALIBRACION:

La reacción debe de ser monitoreada con el uso de suero normal y anormal.

CALCULOS:

Abs: Absorbancia.

$$\frac{\text{Abs. desconocida} - \text{Abs desc. del blanco}}{\text{Abs. del Calibrador} - \text{Abs del blanco Calibrador}} \times$$

$$\text{Conc. del Calibrador (mg / dl)} = \text{Bilirrubina Directa (mg / dl)}$$

Ejemplo:

Abs. desconocida= 0.35

Abs. desc. del blanco= 0.01

Abs. del calibrador= 0.25

Abs. del blanco Cal.= 4.0 mg/dl

Entonces:

$$\frac{0.35 - 0.01}{0.25 - 0.01} \times 4 = \frac{0.34}{0.24} \times 4 = 5.7 \text{ mg / dl}$$

VALORES ESPERADOS (DIRECTA):

Adultos y niños de mas de un mes: 0-0.5 mg/dl.

LIMITANTES:

- Sueros con valores sobre 20mg/dl deben de ser diluidos 1:1 con salina isotónica, corra de nuevo y el resultado final multipliquelo por 2.

- Los niveles de hemoglobina en suero de mas de 1.0 g/dl no interfieren con los resultados.

DESEMPEÑO:

- Linearidad: 20 mg/dl.
- Comparación: Coeficiente 0.998 Ecs.
Y=1.04X+0.07
- Precision:

Entre Prueba

Conc.	D.E.	C.V.%
.98	.025	2.6

Prueba a prueba

Conc.	D.E.	C.V.%
0.96	.028	2.9

REFERENCIAS:

- Elrich, P., Zeitchr, Sur Anal Chem 23:275 (1884)
- Michaelson, M., Scand, J Clin. Lab. Invest (suppl. 49) 13:1 (1966)
- Martinek, R.G. Clin Chem. Acta 13:16 (1966).
- Tietz, N.W. Fundamentals of clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p. 1028 (1976).
- Young D.S., el al Clin. Chem. 21ID (1975)
- Gambino, S.R., el al Bilirrubin Asay (revised) Chicago (1968).

REV 2/91



DISTRIBUOTOR:
MYM Laboratory & Medical Supply, Inc.
 8684 Ave. de la Fuente Ste. 14
 San Diego CA. 92154
 Tel. (619) 710-0126 Fax. (619) 710-0297
 www.mymSupply.com
 email: mail@mymSupply.com