

# BILIRRUBINA DIRECTA

## MÉTODO DE JENDRASSIK – GROF

Para la determinación "in vitro" de Bilirrubina directa en suero o plasma



### PRINCIPIO

La Bilirrubina Total se determina por reacción con el ácido sulfanílico diazoado, en presencia de cafeína, que da lugar a la formación de un azopigmento. La Bilirrubina Directa se determina mediante la reacción anterior, en ausencia de cafeína.

### UTILIDAD DIAGNÓSTICA

La bilirrubina es un producto del metabolismo de la hemoglobina que se transporta al hígado, allí se conjuga con ácido glucorónico y el hígado la segrega a través de la bilis. Esta bilirrubina conjugada es la llamada bilirrubina directa, mientras que la bilirrubina no conjugada se denomina bilirrubina indirecta. La bilirrubina total en el suero equivale a la bilirrubina directa más la bilirrubina indirecta.

La bilirrubina directa aumenta en la obstrucción de vías biliares, cirrosis y hepatitis.

El aumento de la bilirrubina indirecta o de la total puede indicar enfermedades hemolíticas, ictericia neonatal fisiológica, enfermedad Gilbert o intolerancia a la fructosa.

Una única prueba de laboratorio no permite establecer un diagnóstico. Los resultados se han de evaluar en el contexto de todos los datos clínicos y de laboratorio obtenidos.

### REACTIVOS

Kit 1 x 250 ml. (Ref. 99 02 08). Contiene:

- A. 1 x 50 ml. Ac. Sulfanílico. Ref. 99 90 11
- B. 2 x 100 ml. Disolución salina. Ref. 99 01 99
- C. 1 x 2 ml. Nitrito sódico. Ref. 99 90 94

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE TRABAJO

Preparación del reactivo Diazo: Mezclar 1 parte de la disolución C con 50 partes de la disolución A.

### COMPOSICIÓN DE LOS REACTIVOS

Las concentraciones en las disoluciones reactivas son:

A.	Ac. Sulfanílico.	6 mM
	HCl	0,17 M
B	NaCl	0,9% <sup>a</sup>
C.	Nitrito sódico.	0,4 M

### CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los componentes del kit almacenados a temperatura ambiente ( $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ) son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

El reactivo Diazo es estable 15 días a temperatura ambiente ( $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ).

Indicaciones de alteración de los reactivos:

Presencia de partículas o turbidez. Blanco del reactivo de trabajo  $> 0,100$ .

### MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Material común de laboratorio.

Espectrofotómetro, analizador automático o fotómetro. Cubeta de 1 cm de paso de luz.

### MUESTRA

Suero o plasma exento de hemólisis.

La bilirrubina sérica disminuye en un 50 % después de 1 hora a temperatura ambiente ( $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ), y expuesta a la luz solar directa. Las muestras mantenidas a 2-8°C en la oscuridad son estables aproximadamente 3 días.

### PRECAUCIONES

Los reactivos contienen Azida sódica al 0,09%. Manipular con precaución.

Las indicaciones de seguridad se encuentran en la etiqueta de los productos

Se aconseja consultar la ficha de datos de seguridad antes de la manipulación del reactivo.

La eliminación de residuos debe hacerse según la normativa legal vigente.

### PROCEDIMIENTO

Técnica	BL M ml	PR ml
Dis. Salina	1,0	1,0
Reactivo Diazo	--	0,1
Dis. Salina	0,1	--
Muestra	0,1	0,1

Mezclar e incubar a temperatura ambiente (20 - 25°C).

**Leer exactamente a los 5 min.**

### Lectura

Longitud de onda: 546 nm

Blanco: H<sub>2</sub>O

Cubeta: 1 cm de paso de luz

### CÁLCULOS

$\Delta \text{Abs} = \text{Abs PR} - \text{Abs BL M}$

Donde:

Abs. PR: Absorción de la muestra

Abs BLM: Absorción del blanco de muestra

$\Delta \text{Abs} \times 12,8 = \text{mg Bilirrubina directa} / \text{dL}$

### Unidades SI

$\text{mg} / \text{dL} \times 17,1 = \mu\text{mol} / \text{L}$

### VALORES DE REFERENCIA

Adultos: hasta 0,25 mg/dl de Bilirrubina directa

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

### PRESTACIONES. CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO.

Las características de funcionamiento de un producto dependen tanto del reactivo como del sistema de lectura empleado.

Los resultados siguientes se han obtenido con un analizador automático.

Sensibilidad, como límite de detección: 0,1 mg/dl

Margen de reacción: Hasta 15 mg/dl. Para concentraciones superiores a 15 mg/dl, el desarrollo de color obtenido (Abs  $>$  a 1,500 aprox.) puede resultar de difícil lectura en espectrofotómetros no digitales. Se aconseja diluir 1/10 la muestra con salina (Na Cl 0,9%). Multiplicar el resultado final por 10.

Exactitud, como % de recuperación: 96,3%

Precisión en la serie, como CV%: 1,8%

Precisión entre series, como CV%: 2,7%

Veracidad. Los resultados obtenidos con el reactivo no presentan diferencias significativas al compararlo con el reactivo considerado de referencia.

Los datos detallados del estudio de las prestaciones del reactivo están disponibles bajo demanda.

### INTERFERENCIAS

Para evitar errores al determinar Bilirrubina Directa, es muy importante efectuar la lectura exactamente a los 5 minutos de haber añadido el último reactivo.

La presencia de hemólisis puede interferir en el resultado.

### CONTROL DE CALIDAD

Es recomendable la inclusión de sueros control, Seriscann Normal (Ref. 99 41 48) y Seriscann Anormal (Ref. 99 46 85), en cada proceso de medida para verificar los resultados.

Se aconseja que cada laboratorio establezca su propio programa de control de calidad y los procedimientos de corrección de las desviaciones en las medidas.

### AUTOANALIZADORES

Adaptaciones a distintos analizadores automáticos, disponibles bajo demanda.

### BIBLIOGRAFÍA

Jendrassik, L., Gróf, P. (1938). Biochem. Z., 297, 81-89.

Doumas, B.T., Perry, B.W., Sasse, E.A., Straumjord Jr. J.V. (1973). Clin.Chem., 19, 984-993.



# DIRECT BILIRUBIN

## JENDRASSIK – GROF METHOD



For "in vitro" determination of direct Bilirubin in serum or plasma

### PRINCIPLE

Total Bilirubin is determined by reaction with diazotized sulfanilic acid, in the presence of caffeine, with the final production of an azopigment. The same reaction, but in the absence of caffeine, is used to measure Direct Bilirubin.

### DIAGNOSTIC USE

Bilirubin is a metabolic hemoglobin product which is transported to the liver, where there is conjugated with glucuronic acid and it is secreted through bile. This conjugated bilirubin is the direct bilirubin, while unconjugated bilirubin is called indirect bilirubin. The total serum bilirubin is direct bilirubin plus indirect bilirubin.

Direct bilirubin increases in biliary obstruction, cirrhosis and hepatitis. High level of indirect or total bilirubin may indicate hemolytic diseases, physiological neonatal jaundice, Gilbert's disease or fructose intolerance.

Single test result could not be used to make a clinical diagnosis. It should integrate clinical and laboratory data.

### REAGENTS

Kit 1 x 250 ml. (Ref. 99 02 08). Contents:

- A. 1 x 50 ml. Sulfanilic Acid. Ref. 99 90 11
- B. 2 x 100 ml. Saline Solution. Ref. 99 01 99
- C. 1 x 2 ml. Sodium Nitrite. Ref. 99 90 94

### WORKING REAGENT PREPARATION

Preparation of the Diazo reagent: Mix 1 part of solution C with 50 parts of solution A.

### REAGENTS COMPOSITION

The concentrations in the reagent solutions are:

<b>A.</b>	Sulfanilic Acid HCl	6 mM 0.17 M
<b>B</b>	NaCl	0,9%
<b>C.</b>	Sodium Nitrite	0.4 M

### STORAGE AND STABILITY

The components of the kit, when stored at room temperature ( $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ), will remain stable until the expiration date stated on the label.

Diazo reagent is stable for 15 days at room temperature ( $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ).

Signs of reagent deterioration:

Presence of particles or turbidity in the reagent. Working reagent blank  $>0.100$

### ADDITIONAL EQUIPMENT

General laboratory equipment.

Spectrophotometer or photometer. Cuvette: 1 cm light-path

### SAMPLE

Serum or plasma free from haemolysis.

Serum bilirubin will decrease 50% in 1 hour if kept at room temperature ( $\leq 25^{\circ}\text{C}$ ), and at direct sunlight. Samples kept in the dark at  $2-8^{\circ}\text{C}$  will remain stable for up to 3 days.

### CAUTION

The reagents contains Sodium azide at 0.09%. Handle with care. The security statements are on the label. We advise to read MSDS before reagent handling. Waste products must be handled as per local regulations.

### PROCEDURE

Technique	BLS ml	SA ml
Saline	1.0	1.0
Diazo Reagent	--	0.1
Saline	0.1	--
Sample	0.1	0.1

Mix and let stand at room temperature ( $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ).

**Read exactly at 5 minutes.**

### Reading

Wavelength: 546 nm

Blank:  $\text{H}_2\text{O}$

Cuvette: 1 cm light-path

### CALCULATIONS

$\Delta \text{Abs} = \text{Abs SA} - \text{Abs BL S}$

Where:

Abs SA: Sample Absorption

Abs BLS: Sample blank Absorption

$\Delta \text{Abs} \times 12.8 = \text{mg Direct Bilirubin} / \text{dL}$

### SI Units

$\text{mg} / \text{dL} \times 17.1 = \mu\text{mol} / \text{L}$

### REFERENCE VALUES

Adults: up to 0.25 mg/dl. Direct bilirubin

The stated values are for guidance. Each particular laboratory should establish its own normal range, using its own instrumentation, blood collection methods and test procedures

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The performance characteristics depend on the method used. It is recommended to calculate these data for each particular test protocol. These results have been obtained using an automated analyzer.

Sensitivity, as detection limit: 0.1 mg/dl

Reaction range: Up to 15 mg/dl. Concentrations higher than 15 mg/dl may produce an absorbance value ( $\Delta \text{Abs} > 1.500$ ) that can hardly be read in non-digital photometers. It is recommended in such a case, to carry out a 1/10 dilution of the sample with saline, (NaCl 0.9%) and then to multiply the final result by 10.

Accuracy: 96.3%

Repeatability, as CV%: 1.8%

Reproducibility, as CV%: 2.7%

Trueness: Results obtained with this reagent did not show systematic differences when compared with reference reagent.

Details of the comparison experiments are available on request.

### INTERFERENCES

To avoid possible errors, it is very important, when assaying for Direct Bilirubin, to read the corresponding absorbance exactly 5 min. after the reagents have been added.

Avoid hemolysed samples.

### QUALITY CONTROL

Control serum, Seriscann Normal (Ref. 99 41 48) and Seriscann Abnormal (Ref. 99 46 85) should be included in each test series. Each particular laboratory should establish its own control program.

### AUTOANALYZERS

Adaptations to different autoanalyzers are available on request.

### REFERENCES

Jendrassik, L., Gróf, P. (1938). Biochem Z., 297, 81-89.

Doumas, B.T., Perry, B.W., Sasse, E.A., Straumjord Jr. J.V. (1973). Clin.Chem., 19, 984-993.



---

---

# BILIRUBINE DIRECTE

## MÉTHODE DE JENDRASSIK – GROF

Pour la détermination in vitro de la bilirubine directe dans le sérum ou le plasma

### PRINCIPE

La Bilirubine Totale est déterminée par réaction avec l'acide sulfanilique diazoté en présence de la caféine, ce qui conduit à la formation d'un pigment azoïque. La détermination de la Bilirubine Directe est obtenue par la réaction précédent, en absence de caféine.

### UTILITÉ DE DIAGNOSTIC

La bilirubine est un produit du métabolisme de l'hémoglobine ; elle est transportée vers le foie, où elle est conjuguée avec l'acide glucoronique, et le foie la sécrète à travers la bile. Cette bilirubine conjuguée est appelé bilirubine directe, tandis que la bilirubine non conjuguée est appelé bilirubine indirecte.

La bilirubine sérique totale équivaut à la bilirubine directe plus la bilirubine indirecte.

La bilirubine directe augmente en cas d'obstruction des voies biliaires, de cirrhose et d'hépatite.

L'augmentation de la bilirubine indirecte ou totale peut indiquer maladies hémolytiques, ictère néonatal physiologique, maladie de Gilbert ou une intolérance au fructose.

Un test de laboratoire unique ne peut pas établir un diagnostic. Les résultats doivent être évalués dans le contexte de toutes les données cliniques et de laboratoire obtenus.

### RÉACTIFS

**Kit 1 x 250 ml (Réf. 99 02 08).** Contenu:

- |                               |               |
|-------------------------------|---------------|
| A. 1 x 50 ml Ac. sulfanilique | Réf. 99 90 11 |
| B. 2 x 100 ml Solution Saline | Réf. 99 01 99 |
| C. 1 x 2 ml Nitrite de sodium | Réf. 99 90 94 |

### PRÉPARATION DU RÉACTIF DE TRAVAIL

Préparation du diazoréactif: mélanger 1 volume de la solution **C** avec 50 volumes de la solution **A**.

### COMPOSITION DES RÉACTIFS

Les concentrations dans les solutions réactives sont les suivantes:

<b>A.</b>	Ac. sulfanilique HCl	6 mM 0,17 M
<b>B</b>	NaCl	0,9%
<b>C.</b>	Nitrite de sodium	0,4 M

### CONSERVATION ET STABILITÉ

Conservés à température ambiante ( $\leq 25^\circ\text{C}$ ), les composants du kit sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Le diazoréactif est stable pendant 15 jours à température ambiante ( $\leq 25^\circ\text{C}$ ).

Indications d'altération du réactif:

Présence de particules ou de turbidité. Blanc du réactif de travail  $> 0,100$ .

### MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Matériel courant de laboratoire.

Spectrophotomètre, analyseur automatique ou photomètre. Cuvette: 1 cm de trajet optique.

### ÉCHANTILLON

Sérum ou plasma non hémolysé. La bilirubine sérique diminue de 50 % après une heure à température ambiante ( $\leq 25^\circ\text{C}$ ), et une exposition directe au soleil.

Conservés entre 2 et 8  $^\circ\text{C}$  à l'abri de la lumière, les échantillons sont stables pendant environ 3 jours.

### PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Le réactif contient de l'azide de sodium (0,09 %) comme conservateur. Manipuler avec précaution.

Les indications de sécurité sont sur l'étiquette des produits. On conseille de consulter la fiche des données de sécurité avant de manipuler le réactif. L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux normes en vigueur.

### TECHNIQUE

Technique	BL E ml	ESSAI ml
Solution saline	1,0	1,0
Diazoréactif	--	0,1
Solution saline	0,1	--
Échantillon	0,1	0,1

Mélanger puis incuber à température ambiante (20 – 25 $^\circ\text{C}$ ).

**Lire exactement au bout de 5 minutes.**

### Lecture

Longueur d'onde: 546 nm

Blanc:  $\text{H}_2\text{O}$

Cuvette: 1 cm de trajet optique.

### CALCULS

$\Delta \text{Abs.} = \text{Abs. Essai} - \text{Abs. BL E}$

Où:

Abs. ESSAI= Absorption de l'essai.

Abs. BL E = Absorption de Blanc de l'échantillon.

$\Delta \text{Abs.} \times 12,8 = \text{mg Bilirubine directe} / \text{dL}$

### Unités SI

$(\text{mg} / \text{dL}) \times 17,1 = \mu\text{mol} / \text{L}$

### VALEURS DE RÉFÉRENCE

Adultes: jusqu'à 0,25 mg/dl.

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

### PERFORMANCE. CARACTÉRISTIQUES DE FONCTIONNEMENT

Le fonctionnement du produit dépend tant du réactif que du système de lecture manuel ou automatique utilisé. Les données suivantes ont été obtenues à une analyseur automatique.

Sensibilité comme limite de détection: 0,1 mg/dl

Marge de la réaction: jusqu'à 15 mg/dl. Pour des concentrations supérieures à 15 mg/dl, la lecture de la coloration obtenue (Abs  $>$  environ 1,500) peut être difficile avec de spectrophotomètres non numériques. Il est conseillé de diluer au 1/10 l'échantillon avec la solution saline (NaCl 0,9 %). Multiplier le résultat final par 10.

Exactitude: le pourcentage de récupération est de 96,3 %.

Coefficient de variation dans la série: 1,8 %

Coefficient de variation entre les séries: 2,7 %

Justesse. Les résultats obtenus avec le réactif ne sont pas significativement différents par rapport au réactif de référence considéré.

L'étude détaillée de la performance du réactif est disponible sur demande.

### INTERFÉRENCES

Pour éviter des erreurs dans la détermination de la bilirubine directe, il est très important de faire la lecture exactement 5 minutes après avoir ajouté le dernier réactif.

Les sérums très hémolysés interfèrent avec l'essai.

### CONTRÔLE DE QUALITÉ

Nous recommandons l'inclusion de sérums de contrôle Seriscann normale (Réf. 99 41 48) et Seriscann anormale (Réf 99 46 85) dans chaque processus de mesure pour vérifier les résultats.

Nous suggérons que chaque laboratoire d'établir son propre programme et les procédures de correction des écarts dans les mesures de contrôle qualité.

### ANALYSEURS AUTOMATIQUES

Des adaptations à différents analyseurs automatiques sont disponibles sur demande.

### BIBLIOGRAPHIE

Jendrassik, L., Gróf, P. (1938). Biochem Z., 297, 81-89.

Dumas, B.T., Perry, B.W., Sasse, E.A., Straumjord Jr. J.V. (1973). Clin.Chem., 19, 984-993.