

Determinación cuantitativa de bilirrubina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónico y bilirrubina libre ligada a la albúmina, solo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada^{1,2,3}.

SIGNIFICADO CLINICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina.

Es transportada del bazo al hígado y se excreta en la bilis.

La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia:

Bilirrubina Total: Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas.

Bilirrubina Directa: Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas^{1,6,7}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	Ácido sulfanílico (C ₆ H ₄ NO ₂ S)	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico (HCl)	50 mmol/L
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	7 mol/L
R 2	Sodio nitrato	29 mmol/L
Opcional	BILIRUBIN CAL	Ref: 1002250

PRECAUCIONES

R1: H314 - Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares.

EUH208-Contiene ácido sulfanílico (C₆H₄NO₂S). Puede provocar una reacción alérgica.

Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

PREPARACION

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Desarrollo de color en el R 2.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 555 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis¹. Proteger de la luz.

Estabilidad de la muestra: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 555 nm (530-580)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	B. Total
R 1 (mL)	1,5	1,5
R 2 (μL)	--	50
Muestra ^(Nota 1) / Calibrador (μL)	100	100

- Mezclar e incubar exactamente **5 minutos** a 15-25°C.
- Leer la absorbancia (A).

CALCULOS

- Con Calibrador:

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco Muestra}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco Calibrador}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

- Con Factor:

$$(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco Muestra} \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirrubina en la muestra}$$

$$\text{*Factor: } \frac{\text{Concentración del Calibrador}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco Calibrador}}$$

Factor de conversión: mg/dL x 17,1 = μmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Bilirrubina Total en adultos Hasta 1,10 mg/dL ≈ 18,81 μmol/L

Bilirrubina Total en recién nacidos <12 mg/dL ≈ <205,2 μmol/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,00526 mg/dL hasta el límite de linealidad de 18 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	1,53	5,06	1,53	5,02
SD	0,03	0,05	0,03	0,11
CV (%)	1,73	1,01	1,92	2,18

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,05074 A.

Exactitud: Los reactivos REACTIVA SEARCH no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r)²: 0,991.

Ecuación de la recta de regresión: y = 0,82743 x - 0,0382.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina^{1,2,3}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de la bilirrubina^{4,5}.

NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 μL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 2.
- REACTIVA SEARCH, dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241. 436 and 650.
- Malloy H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem 1937; 112, 2; 481-491.
- Martinek R. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. Clin Chim 1966; Acta 13: 61-170.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACION

Cont.

R 1: 2 x 125 mL

R 2: 1 x 10 mL

CODIGO: RS29154-2