

Bilirrubina Directa

DPD. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de bilirrubina directa IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina directa (conjugada) se combina con la sal de diazonio en presencia de un ácido sulfámico para formar el compuesto coloreado, azobilirrubina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada. El aumento de la absorbancia a 546 nm es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina directa.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina y existe en dos formas. La bilirrubina no conjugada se transporta al hígado, unida por la albúmina, donde se convierte en conjugada (directa) con el ácido glucurónico y se excreta. 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.

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

REACTIVOS

R 1	Ácido sulfámico	100 mM
R 2	2,4-DPD Ácido clorhídrico (HCl)	0,5 mM 0,3 M

PRECAUCIONES

R1/R2: H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares. Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Los reactivos 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.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador capaz de medir la absorbancia a 546 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis. 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:546 nm (530-580)
Cubeta:.....1 cm paso de luz
Temperatura:37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco Calibrador	Blanco Muestra
R 1 (μL)	800	800
Calibrador (μL)	50	-
Muestra (μL)	-	50

- Mezclar e incubar exactamente **5 minutos** a 37°C.
- Leer la absorbancia (A1) del calibrador y la muestra.

Añadir:

	Calibrador	Muestra
R 2 (μL)	200	200

- Mezclar e incubar exactamente **5 minutos** a 37°C.
- Leer la absorbancia (A2) del calibrador y la muestra frente al blanco de reactivo.
- Calcular el incremento de absorbancia: $\Delta A = A2 - A1$.

CÁLCULOS

– **Con Calibrador:**

$$\frac{(\Delta A) \text{ Muestra}}{(\Delta A) \text{ Calibrador}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina en la muestra}$$

– **Con Factor:** $(\Delta A) \text{ Muestra} \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirrubina en la muestra}$

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

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 REFERENCIA

Bilirrubina Directa 0- 0,2 mg/dL (0 -3,42 μmol/L)

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

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el *límite de detección* de 0,03 mg/dL hasta el *límite de linealidad* de 9 mg/dL.

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

Precisión:

	Interserie (n= 40)		Intraserie (n= 80)	
Media (mg/dL)	0,7458	2,444	0,7458	2,444
SD	0,05868	0,0550	0,0276	0,024
CV (%)	7,9	2,2	3,7	1,0

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,040 Abs.

Exactitud: Los resultados obtenidos usando reactivos REACTIVA SEARCH (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x) con el analizador Spintech 240. Los resultados obtenidos con 53 muestras con valores de entre 0,06 a 9 mg/dL (1,02 a 153,9 μmol/L) fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,9986.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 1,0056x - 0,1046$

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Las interferencias debidas a la hemólisis, lipemia y a. ascórbico se evaluaron para este método de bilirrubina directa en un analizador Spintech 240. Se evaluaron dos concentraciones de la bilirrubina directa. No se observaron interferencias para la lipemia (Intralipid) hasta 350 mg /dL y ácido ascórbico hasta 40 mg/L. La hemólisis produce una interferencia considerable, por lo que no se deben emplear muestras hemolizadas.

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

NOTAS

- Reactiva Search, dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFÍA

- David G Levitt and Michael D Levitt. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. Clin Exp Gastroenterol. 2014; 7: 307–328.
- 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.

PRESENTACIÓN

CODIGO: 1001047

Cont.

R 1: 1 x 240 mL
R 2: 1 x 60 mL