

BILIRRUBINA TOTAL SET DE REACTIVOS**USO:**

Para la determinación cuantitativa de Bilirrubina total en suero.

HISTORIA DEL METODO:

Una reacción en la cual la Bilirrubina es unida con Acido Sulfanilico Diazotizado (Acido p-diazobencensulfónico) para producir un tinte Diazo, fue descrito por primera vez por Ehrlich en 1884. El color de este derivado es rosa en un medio ácido y azul en un medio alcalino. La medida del azul ha sido más popular debido a mayor sensibilidad, etc. Se pueden distinguir y cuantificar dos tipos de suero de bilirrubina por la reacción diazo. La forma directa consiste de bilirrubina libre, no conjugada, ligada a suero albúmina. Esta forma reacciona en la presencia de un agente acelerador o estabilizador. La forma indirecta consiste de bilirrubina libre, no conjugada, ligada a suero albúmina. Esta forma reacciona en la presencia de un agente acelerador. La suma de estas dos formas es llamada Bilirrubina total. La diferencia entre las formas de bilirrubina directa e indirecta es importante en el diagnóstico de las causas de hiperbilirrubinemia.

Muchas sustancias promueven el acoplamiento de los reactivos Diazo con bilirrubina no conjugada. El metanol fue el primero sugerido por Evelyn y Malloy en los 30 s. Con cafeína/benzoato de sodio de Jendrassik y Grof un poco más tarde se han reportado muchas modificaciones y mejoras a los dos métodos descritos arriba. (4,5,6)

Otros agentes solubilizadores y aceleradores también han sido tratados, incluyendo el 2-metoxietanol y la urea. El dimetilfoxido (DMSO) se investigó como un posible solvente para la bilirrubina total en 1969. El procedimiento actual usa el DMSO basado en una modificación de Walters y Gerarde. El método es sensitivo, preciso, y fácil de implementar. Tiene un nivel muy favorable comparado con el de Evelyn y Malloy y el de Jendrassik y Grof.

PRINCIPIO:

El ácido sulfanilico reacciona con el nitrito de sodio para producir ácido sulfanilico diazotizado (Diazo). La bilirrubina directa e indirecta se acopla con el Diazo para producir azobilirrubina en presencia de DMSO. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de la concentración de bilirrubina total presente en la muestra.

REACTIVOS:

1. Reactivo Bilirrubina total: Acido sulfanilico 16 mM., Acido clorhidrico 164mM., dimetilsulfonico 4.4mM Surfactante.
2. Reactivo de Nitrito de sodio: Nitrito de Sodio 0.6 mM.

PRECAUCIONES:

1. Los reactivos son tóxicos y corrosivos. No los pipetea con la boca. Evite el contacto con la piel y ropa.
2. El reactivo se usa solo para reactivo "In Vitro"

PREPARACION DEL REACTIVO:

Reactivo de trabajo de Bilirrubina total: Agregue 0.01 (10ul) de reactivo nitrito por 1.0 ml. de reactivo de bilirrubina total, mezcle. Ejemplo: 0.01 ml. de nitrito/100 ml. de reactivo de bilirrubina total ó 1 ml. de nitrito/100 de reactivo de bilirrubina total, etc.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO:

1. Los paquetes de reactivos son almacenados a temperatura ambiente.
2. Los reactivos de trabajo combinado pueden ser almacenados en una botella ámbar por más de 48 hrs. a temperatura ambiente y 30 días en refrigeración.
3. No congele los reactivos
4. Evite la exposición directa con la luz solar.

DETERIORO DE LOS REACTIVOS: NO USE SI:

1. El reactivo de nitrito de sodio tiene una decoloración amarilla oscura.
2. El reactivo de trabajo falla al comparar contra los valores saignados para el ensayo de control de sueros frescos.

NOTA:

Normalmente el reactivo de trabajo decolora un tono amarillo/naranja claro.

RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS:

1. Se recomienda suero fresco y no hemolizado
2. Las muestras deben de ser analizadas dentro de las dos horas de su recolección si se mantienen a temperatura ambiente y en la oscuridad y dentro de las doce horas si se mantiene en refrigeración de 2 a 8°C y protegido de la luz.
3. La bilirrubina en suero es estable por tres meses cuando se almacena congelada a -20°C y se protege de la luz.
4. La luz del sol directa puede causar un decremento superior al 50% en la bilirrubina en una hora.

INTERFERENCIAS:

Cierta cantidad de drogas y sustancias afectan los resultados de la Bilirrubina. Consultar a Young el al.

MATERIALES PROPORCIONADOS:

Pipetas graduadas
Cronómetro
Tubos de ensayo/Gradilla
Espectrofotómetro con capacidad para leer 555 nm (de 540 a 560nm)

PROCEDIMIENTO A (AUTOMATICO):

Consulte las instrucciones del instrumento específico.

PROCEDIMIENTO M (MANUAL):

PRUEBA BLANCO

Reactivo de bilirrubina (ml)	1.0	---
Reactivo de bilirrubina total (ml)	---	1.0
Muestra (ml)	0.05	0.05

1. Etiquete los tubos prueba, paciente, etc. Cada tubo requiere también un tubo blanco.
2. Pipetee 1.0 ml. de reactivo de bilirrubina total a todos los tubos blanco.
3. Prepare el reactivo de trabajo. Consulte "Preparación de reactivos"
4. Pipetee 1.0 ml. de reactivo de trabajo a todos los tubos prueba.
5. Agregue 0.05 ml. (50 ul) de muestra a los tubos respectivos. Mezcle.
6. Coloque todos los tubos en una gradilla por cinco minutos a temperatura ambiente (un minuto a 37°C.)
7. Calibre el espectrofotómetro a cero con el reactivo blanco en 555nm. (540-560nm)
8. Lea y registre la absorción de todos los tubos.
9. Consulte "Calculos" para obtener resultados.

NOTAS DEL PROCEDIMIENTO:

1. El color final es estable por treinta minutos.
 2. Para instrumentos que requieren un volumen superior a 1.0 ml. para lecturas exactas, use 3.0 ml. de reactivo y 0.200 ml. (200 ul) de muestra.
- Siga las instrucciones de arriba.

VOLUMENES PEDIATRICOS:

Para muestras pediátricas con bilirrubina superior a 3.0 mg/dl deben de ser diluidos en proporción 1:1 con salina isotónica. Corra de nuevo y el resultado final multiplíquelo por dos.

Los niveles de hemoglobina en el suero superiores a 1.0 g/dl no interfieren son los resultados.

CALIBRACION:

Use un standard apropiado o suero calibrador.

CONTROL DE CALIDAD:

La integridad de la reacción debe de ser monitoreada mediante el uso de sueros de control (normal y anormal) con concentraciones de bilirrubina conocidas.

CALCULOS:

ABS = Absorbancia

$$\frac{ABS \text{ de desc.} - ABS \text{ de blanco desc.}}{ABS \text{ de Calibrador} - ABS \text{ Blanco C.}} \times \text{concentración del calibrador}$$

VALORES ESPERADOS:

Total= Adultos de 0.2-1.2 mg/dl

LIMITACIONES:

Sueros con valores superiores a 20 mg/dl deben de ser diluidos en proporción 1:1 con salina Isotónica. Corra de nuevo y el resultado final multiplíquelo por dos.

Los niveles de hemoglobina en el suero superiores a 1.0 g/dl no interfieren con los resultados.

DESEMPEÑO:

1. Lineridad: 20 mg/dl
2. Comparación: La implementación entre este método y otro similar arrojó un coeficiente de correlación de 0.987 con una ecuación de regresión de $y=0.98x+0.02$

3. Precisión:

Entre Pruebas

Conc.	D.E.	C.V.%
0.9	0.05	5.6
7.7	0.05	1.8

Prueba a prueba

Conc.	DE.	C.V.%
0.9	0.05	5.6
7.7	0.14	1.8

REFERENCIAS:

1. Ehrlich, P., Zeitschr, Sur Anal. Chemie 23:275 (1884)
2. Malloy, II., Evelyn, K. A., J Biol: Chem 119:481 (1937)
3. Jendrassik, L., Grof, P., Biochem Zeitschr. 297:81 (1938)
4. Michaelson, M., Scand. J. Clin Lab. Invest. (Suppl. 49) 13:1 (1961)
5. Nosslin, B., Scand. J. J. Clin. Lab. Invest (Suppl.49) 12:1 (1960).
6. Gambino, S.R. Standard Methods of Clinical Pathol. 40:209 (1963)
7. Ferro, P.V., Ham, A.B. Amer. J. Clin. Pathol. 40:209 (1963)
8. Powell, W.N., Amer. J. Clin. Pathol. 40:209 (1963)
9. Winsten. S., Cehelyk, B., Clin. Pathol 40:209 (1963)
10. Walters, M., Gerarde, H, Microchem J. 15:231 (1970)
11. Martinek, R.G., Clin Chem Acta 13:161 (1966)
12. Tietz, N.W., Fundaments of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p 1028 (1976)
13. Young D.s et al, Clin Chem 21:11d (1975)
14. Gabino, S.R., et al Bilirubin Assay (Revised), Comision on Continuing Education, Am. Soc. of Clin. Path., Chicago (1968).
15. REV 3/90

	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.mymssupply.com email: mail@mymssupply.com