

BILIRRUBINA TOTAL

Uso:

Para la determinación cuantitativa de la bilirrubina total en suero humano.

Introducción:

La bilirrubina es un metabolito de la porción hemo de las proteínas hemo, principalmente la hemoglobina. La bilirrubina se excreta en el intestino y la bilis desde el hígado. El sitio del catabolismo de la hemoglobina es el sistema reticuloendotelial (RES). La bilirrubina se libera en el torrente sanguíneo donde se une fuertemente a la albúmina y se transporta al hígado. Tras la captación por el hígado, la bilirrubina se conjuga con ácido glucurónico para formar bilirrubina mono y diglucurónico, que son metabolitos solubles en agua. Los metabolitos se excretan a continuación, en la bilis.¹

La elevación de la bilirrubina sérica total puede ocurrir debido a (1) la hemólisis excesiva o destrucción de las células rojas de la sangre (por ejemplo, enfermedad hemolítica del recién nacido), (2) las enfermedades del hígado (por ejemplo, la hepatitis y la cirrosis), (3) la obstrucción de las vías biliares (ej. cálculos biliares).¹ La mayoría de los métodos químicos para la determinación de bilirrubina total se basan en la reacción entre el ácido sulfanílico diazotizado y bilirrubina para producir azobilirrubina, que absorbe al máximo a 560 nm. Tales pruebas son a menudo procesadas en la presencia o ausencia de un disolvente orgánico, por ejemplo, metanol para distinguir bilirrubina libre de bilirrubina conjugada en una base de solubilidad diferencial.²

Principio La bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado para producir azobilirrubina, que tiene un máximo de absorbancia a 560 nm en el sulfóxido de dimetilo (DMSO) disolvente. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de total de la concentración de bilirrubina presente en la muestra.

Reactivos:

1. Bilirrubina Total: ácido sulfanílico 32 mM, ácido clorhídrico 165 mM, DMSO 7 M
2. Nitrito de Sodio: nitrito de sodio 60 mM
3. Calibrador Bilirrubina: sal de dihidrocloruro de N-1- nftil etilendiamina (5 mg/dL).

Precauciones:

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Las muestras deben ser consideradas infecciosas y manejadas adecuadamente.
3. No pipetear los reactivos con la boca. Evite el contacto con reactivos con los ojos, piel y ropa. No ingerir. Lávese las manos después de su uso.

Preparación de los Reactivos:

Total de reactivo de trabajo bilirrubina: Añadir 0.05 mL (50 µL) de nitrito de sodio reactivo por 1.0 mL de reactivo de bilirrubina total de reactivos y mezcla.

Ejemplo: 0.5 mL nitrito de sodio/10 mL total de reactivo de bilirrubina, 1 mL de nitrito de sodio/20 mL de bilirrubina total, etc.

Almacenamiento del Reactivo:

1. Mantenga el reactivo a la temperatura del refrigerador (2-8°C).
2. Reactivo de trabajo combinado se puede almacenar durante un máximo de ocho (8) horas cuando se mantienen en una botella ámbar a temperatura ambiente.
3. No congelar los reactivos.
4. Evite la exposición a la luz solar directa.

Deterioro del Reactivo:

El reactivo debe desecharse si:

1. Reactivo de nitrito de sodio tiene una coloración amarilla.
2. Reactivo de trabajo no alcanza los valores de ensayo asignados de suero de control fresco.

Recolección y Almacenamiento de la Muestra:

1. La hemólisis interfiere con la prueba, es decir, muestras hemolizadas deben evitarse ya que pueden dar valores falsamente bajos.³
2. Todas las muestras de este ensayo deben ser cuidadosamente protegidos de la luz.¹
3. La bilirrubina en suero es estable por 4-7 días si se almacena en un lugar oscuro a 2-8°C.¹

Interferencias:

1. Young et al., da una lista exhaustiva de las drogas y otras sustancias que se sabe afectan el nivel circulante de bilirrubin.⁴
2. En este ensayo, como en todos los procedimientos de laboratorio, materiales que entran en contacto con las muestras, deben estar limpias y libres de contaminación por metales pesados, detergentes y otros productos químicos.

Materiales Suministrados:

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

Materiales Necesarios Pero No Suministrados:

1. Tubos de ensayo, gradilla.
2. Pipetas.
3. Cronómetro.
4. Analizador químico automatizado adecuado o espectrofotómetro capaz de medir a 560 nm.

Procedimiento de Bilirrubina Total (Automatizado):

Consulte las instrucciones del instrumento para la aplicación adecuada.

Procedimiento de Bilirrubina Total (Manual):

1. Identifique los tubos, "en blanco, estándar, control, paciente". Cada tubo requiere un tubo en blanco.
2. Dispensar 1.0 mL de reactivo de bilirrubina total a todos los tubos en blanco.
3. Preparar un reactivo de trabajo. Consulte la sección "Preparación de los reactivos."
4. Dispense 1.0 mL del reactivo de trabajo en los tubos de ensayo etiquetados, excepto los tubos vacíos.
5. Añadir 0.1 mL (100 µL) de cada estándar, control y muestra a su tubo respectivo. Mezclar bien.
6. Permitir que todos los tubos en reposo durante cinco (5) minutos a temperatura ambiente.
7. Ajuste la longitud de onda del instrumento a 560 nm. Cero con blanco de reactivo. (Rango de longitud de onda: 500 – 550 nm).
8. Lea y registre la absorbancia de todos los tubos.

* Un calibrador multiuso puede ser usado para reemplazar el estándar.

Notas de Procedimiento:

1. El color final producido es estable durante 60 minutos.
2. Para las muestras pediátricas con bilirrubinas de más de 3.0 mg/dL, utilice 0.05 mL (50 µL) de la muestra y luego se multiplica el resultado por dos (2).
3. Si el espectrofotómetro utilizado requiere un volumen final mayor que 1.0 ml para lecturas precisas, 3 mL de reactivo y 0.2 mL (200 µL) de la muestra podría ser utilizado.

Cálculos:

Abs. = absorbancia

Bilirrubina Total (mg/dL):

Abs. de desconocido - Abs. de blanco x Conc. del calibrador

Abs. del calibrador - Abs. del blanco de calibrador

Ejemplo:

Desconocido = 0.565

Absorbancia del blanco desconocido = 0.024

Absorbancia del calibrador = 0.480

Absorbancia del blanco calibrador = 0.004

Concentración de calibrador = 5.0 mg/dL

$\frac{0.565 - 0.024}{0.480 - 0.004} \times 5 = 0.541 \times 5 = 5.68 \text{ mg/dl}$

0.476

Limitaciones del Procedimiento:

1. Suero con valores por encima de 20 mg/dL deben diluirse 1:1 con solución salina isotónica, y volverse a analizar el resultado final multiplicado por dos (2).
2. Los niveles de hemoglobina en suero de hasta 1.0 g/dL no interfieren con los resultados.

Control de Calidad:

Se recomienda que el material de control disponible comercialmente con los valores totales de bilirrubina conocidos se incluya en cada serie de ensayos.

Valores Esperados:

Bebés (después de un mes) y adultos: 0.2 a 1.0 mg/dL

1. **Rendimiento** Linealidad: 20 mg/dL
2. Sensibilidad: Basado en un instrumento de resolución de A = 0.001, este procedimiento tiene una sensibilidad de 0.01 mg/dL.
3. Comparación: Estudios entre el presente método y un método similar produjeron una correlación de R² = 0.99 y una ecuación de regresión de y = 1.13x - 0.09.
4. Precisión:

Corrida-a-Corrida: Dos sueros control comercial se ensayaron durante un período de 30 días y se obtuvo la siguiente precisión del día a día.

	Nivel I	Nivel II
Promedio (mg/dL), N=22	0.68	6.41
S. D.	0.05	0.63
C. V.	7.3%	9.7%

Entre Corridas: Dos sueros control comercial fueron ensayados 20 veces y la siguiente precisión dentro del ensayo se obtuvo.

	Nivel I	Nivel II
Promedio (mg/dL),	0.67	6.28
S. D.	0.02	0.15
C. V.	2.9%	2.3%

