



Bilirrubina Directa.

DMSO. Colorimétrico.

Para uso *In-Vitro* solamente.

Almacenar a 2-8°C

Uso previsto

Para la determinación de la Bilirrubina Directa en el suero humano o plasma.

Introducción

La **Bilirrubina** es un producto de degradación de la hemoglobina, insoluble en agua. Es transportada desde el bazo hasta el hígado y excretada por la bilis. La hiperbilirrubinemia es resultado del incremento de concentraciones de bilirrubina en el plasma.

Causas de hiperbilirrubinemia:

Bilirrubina Total: Incremento de hemólisis, errores genéticos, ictericia neonatal, eritropoyesis inefectiva y drogas.

Bilirrubina Directa: Colestasis hepática, errores genéticos, daño hepatocelular.

El diagnóstico clínico no debe ser realizado a partir de un solo resultado de una prueba; debería integrar datos clínicos y otros datos de laboratorio.

Principio del Método

La bilirrubina es convertida a azobilirrubina coloreada por el ácido sulfanílico diazotizado y medida fotométricamente. De las dos fracciones presentes en el suero, la bilirrubina-*glucuronide* y la bilirrubina libre holgadamente unida a la albumina, sólo la primera reacciona directamente en solución acuosa (bilirrubina directa), mientras la bilirrubina libre requiere solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para reaccionar (bilirrubina indirecta). En la determinación de bilirrubina indirecta, la directa es también determinada, los resultados corresponden a la bilirrubina total.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina en la muestra.

Reactivos

R2 (Bilirrubina Directa)	Ácido Sulfanílico	30mmol/L
	Ácido hidroclicórico (HCL)	150nmol/L
R3	Nitrato de sodio	29nmol/L

Precauciones

- El ácido hidroclicórico (HCL): Es irritante a los ojos, al sistema respiratorio y a la piel. En caso de contacto con los ojos, enjuagar inmediatamente con abundante agua y busque consejo médico.

Preparación

- Todos los reactivos están listos para usarse.

Almacenaje y Estabilidad

- Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de expiración en la etiqueta cuando se almacenan estrechamente cercanos a 2-8°C, protegidos de la luz y previniendo contaminación durante su uso.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de expiración.
- **Signos de deterioración del reactivo:**
 - Presencia de partículas y turbidez.
 - Desarrollo de color en R3.

Equipos Necesarios pero no Suministrados

- Espectrofotómetro o colorímetro a 555nm.
- Cubetas emparejadas a 1.0cm de espesor (entrada de luz).
- Equipo general de laboratorio.

Muestras

Suero o plasma, libre de hemólisis¹. Muestras protegidas de la luz directa. Estabilidad: La Bilirrubina es estable a 2-8°C por 4 días y 2 meses a 20°C.

Procedimiento

1. Condiciones de ensayo:

Longitud de onda.....555nm (530-580)

Cubeta.....1cm de espesor (entrada de luz).

Temperatura.....15-25°C.

2. Ajustar el instrumento a cero con agua destilada.

Pipetear en una cubeta:

	En blanco	Bilirrubina directa
R2 (ml)	1.5	1.5
R3 (µl)	--	50
Muestra (µl)	100	100

- Mezclar e incubar por exactamente **5 minutos** a temperatura ambiente.
- Leer la absorbencia (A).

Cálculos

(A) Muestra – (A) Muestra en blanco x **14** = mg/dL bilirrubina en la muestra.

Factor de conversión: mg/dL x 17.1=µmol/L.

Control de calidad

Si los valores de control son encontrados fuera del rango definido, chequear el instrumento, los reactivos y el calibrador por problemas.

Cada laboratorio debe establecer su propio esquema de Control de Calidad y acciones correctivas si los controles no cumplen las tolerancias aceptables.

Valores de referencia¹

Bilirrubina directa a 0.25 mg/dL = a 4.27 µmol/L

Estos valores tienen un propósito de orientación; cada laboratorio debe establecer su propio rango de referencia.

Características de la Ejecución

Bilirrubina Directa

Rango de medida: Desde el *límite de detección* de 0.04mg/dL al *límite de linealidad* de 25mg/dL.

Si los resultados obtenidos fueran mayores que el límite de linealidad, diluir ½ de la muestra con 9g/L de NaCl y multiplique el resultado por 2.

Precisión

	Intra-ensayo (n=20)		Inter-ensayo (n=20)	
Promedio (mg/dL)	0.64	2.28	0.68	2.53
SD	0.01	0.02	0.02	0.05
CV (%)	1.91	1.10	2.51	1.95

Sensibilidad: 1mg/dL=0.073 A.

Exactitud:

Los resultados obtenidos utilizando reactivos ATLAS (y) no muestran diferencias sistemáticas cuando son comparados con otros reactivos comerciales (x). Los resultados obtenidos utilizando 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0.996.

Ecuación de regresión: $y=0.0208 + 0.9884 x$.

Los resultados de las características de la ejecución dependen del analizador utilizado.

Interferencias.

La hemólisis provoca valores reducidos de bilirrubina^{1,2,3}.

Una lista de drogas y otras sustancias que interfieren con la bilirrubina han sido reportadas por Young et. al^{4,5}.

Notas

1. Para la determinación de bilirrubina en recién nacidos, pipetear 50µl de la muestra. Multiplicar resultados por 2.

Referencias

1. Kaplan A et al. Bilirrubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co.St. Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241. 436 y 650.
2. Malloy HT et al. The Determination of Bilirubin with the Photoelectric Colorimeter (La Determinación de la Bilirrubina con el Colorímetro Fotoeléctrico). J. Biol Chem 1937: 112, 2: 481-491.
3. Martinek R. Improved Micro-Method for Determination of Serum Bilirubin (Mejora del Micro-Método para la Determinación de la Bilirrubina Sérica). Clin Chim 1966: Acta 13:61-170.
4. Young DS. Effects on drugs on Clinical lab. Tests (Efectos de las Drogas en Pruebas de Laboratorio Clínico), 4th ed AACC Press, 1995.
5. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests (Efectos de las Enfermedades en Pruebas de Laboratorio Clínico), 4th ed AACC 2001.
6. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry (Libro de Texto de Química Clínica), 3rd ed AACC 1999.
7. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests (Guía Clínica de Pruebas de Laboratorio), 3rd ed AACC 1995.

ATLAS MEDICAL

William James House, Cowley Rd,

Cambridge, CB4 4WX, UK

Tel.: ++44 (0) 1223 858 910

Fax: ++44 (0) 1223 858 524

PPI600A01

RevC (17.05.2010)