

---

### **HISTORIA DEL METODO**

En 1884 Erlich describió una reacción en la cual la bilirrubina está acoplada con ácido sulfanílico diazotizado (ácido  $\alpha$  diazobenzenesulfónico ) para producir un compuesto azo. El color de este compuesto es rosa en medio ácido y azul en medio alcalino. La determinación en la forma azul se ha vuelto más popular por su gran sensibilidad.

Se pueden identificar 2 tipos de bilirrubina sérica y cuantificarlos por reacción diazo. La forma directa consiste de un conjugado, derivados solubles en agua y reacciona en ausencia de un agente acelerador o solubilizante. La forma indirecta, consiste de bilirrubina libre no conjugada, enlazada a albúmina sérica. Esta forma reacciona rápidamente en presencia de un agente acelerador. A la suma de las 2 formas se le llama bilirrubina total. La diferenciación entre directa e indirecta es importante cuando se trata de hallar las causas de hiperbilirubinemia.

### **PRINCIPIO**

El ácido sulfanílico reacciona con nitrito de sodio para producir ácido sulfanílico diazotizado. La bilirrubina directa se acopla con el ácido sulfanílico diazotizado para producir azo-bilirrubina.

La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina directa presente en la muestra.

### **REACTIVOS**

Reactivo de bilirrubina directa: ácido sulfanílico 32 mM en ácido clorhídrico diluido.

Reactivo de nitrito de sodio: nitrito de sodio 60mM.

El reactivo se prepara con 5  $\mu$ L de nitrito de sodio por cada 1 mL de reactivo de bilirrubina.

Los reactivos por separado son estables hasta su fecha de caducidad si se guardan a la temperatura establecida en la etiqueta del kit.

El reactivo de trabajo es estable 24 horas a temperatura ambiente, guardado en frasco ámbar y 30 días refrigerado.

Los reactivos no se deben congelar ni exponer a la luz solar.

Los reactivos no deben usarse si:

El nitrito de sodio tiene una decoloración amarillo oscuro.

### **MATERIAL**

Reactivo de bilirrubina directa

Reactivo de nitrito de sodio

### **MATERIAL REQUERIDO, NO SUMINISTRADO**

Pipetas automatizadas

Cronómetro

Tubos de ensaye

Espectrofotómetro con capacidad de leer a 555 nm (540- 560 nm).

Calibrador de bilirrubina

### **PROCEDIMIENTO (MANUAL)**

1. Identificar los tubos: blanco, calibrador, control, muestra, etc. Cada tubo requiere un blanco.
2. Pipetee 1 mL de reactivo de bilirrubina directa en todos los blancos.
3. Prepare reactivo de trabajo.
4. Pipetee 1 mL de reactivo de trabajo en todos los tubos de prueba.
5. A intervalos de tiempo, agregue 100  $\mu$ L de suero a los tubos respectivos. Mezclar.
6. Incube 5 minutos a temperatura ambiente o 1 minuto a 37 °C.
7. Ajustar el espectrofotómetro a 0 con blanco de reactivo a 555 nm (540- 560 nm).
8. Leer y anotar la absorbancia.
9. Ver cálculos para obtener resultados.

### **NOTAS**

- El color continuará incrementándose lentamente debido a la presencia de la fracción indirecta. El tiempo debe ser exacto para una determinación exacta de la fracción directa.
- Para instrumentos que requieren un volumen total mayor a 1 mL, utilice 3 mL de reactivo de trabajo y 200  $\mu$ L de muestra.

### **VOLÚMENES PEDIÁTRICOS**

Para muestras pediátricas arriba de 3.0 mg / dL correr una dilución 1:1 con solución salina. Multiplicar el resultado por 2.

---

**CALIBRACIÓN**

Use un estándar apropiado o suero calibrador.

**CALCULOS**

Abs. = absorbancia

$$\frac{\text{Abs. (desconocido)} - \text{Abs. (blanco desconocido)}}{\text{Abs. (calibrador)} - \text{Abs. (blanco calibrador)}} * \text{conc. calibrador mg/dL} = \text{bilirrubina directa mg/dL}$$

**CONTROL DE CALIDAD**

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

**VALORES ESPERADOS**

Adultos: 0 – 0.5 mg/dL

**LIMITACIONES**

- Sueros con valores arriba de 20 mg / dL deben ser diluidos 1:1 con solución salina isotónica, reensayados, y el resultado final multiplicarlo por 2.
- Los niveles de hemoglobina sérica mayores de 1.0 mg / dL no interfieren con los resultados.

**LINEARIDAD**

20 mg / dL

FABRICADO POR:

POINTE SCIENTIFIC, INC.  
E.E.U.U.

---