

HISTORIA DEL METODO

En 1884 Erlich describió una reacción en la cuál la bilirrubina está acoplada con ácido sulfanílico diazotizado (ácido \square -diazobenzenesulfónico) para producir un compuesto azo. El color de este compuesto es rosa en medio ácido y azul en medio alcalino. La medición de 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 no conjugada, enlazada a albúmina sérica. Esta forma solo reacciona 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 hiperbilirrubinemia.

Muchas sustancias aceleran el acoplamiento del reactivo diazo con la bilirrubina no conjugada. El metanol fue el primero, sugerido en los años 30's por Evelyn y Malloy; con benzoato de cafeína/sodio de Jendrassik un poco después .a la fecha se han reportado muchas modificaciones e improvisaciones.

Se han intentado otros agentes aceleradores y solubilizantes, incluido el 2- metoxietanol y la urea. En 1968 fue investigado el Dimetil sulfoxido (DMSO) como un posible solvente para la bilirrubina total. El siguiente procedimiento usa DMSO basado en una modificación de Walters y Gerarde. El método es efectivo, seguro y fácil de usar.

PRINCIPIO

El ácido sulfanílico reacciona con nitrito de sodio para producir ácido sulfanílico diazotizado. La bilirrubina directa y la indirecta se acoplan con el ácido sulfanílico diazotizado para producir azobilirrubina en presencia de DMSO. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina total presente en la muestra.

REACTIVOS

Reactivo de bilirrubina total: ácido sulfanílico 16 mM; ácido clorhídrico 164 mM; dimetil sulfoxido 4.4 M; Surfactante.

Reactivo de nitrito de sodio: nitrito de sodio 0.6 M.

El reactivo se prepara con 10 μ 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 2-8 °C.

El reactivo de trabajo es estable 48 horas a temperatura ambiente 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 total

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).

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

1. Identificar los tubos: blanco, calibrador, control, muestra, etc. Cada tubo requiere un blanco.
2. Pipetee 1 mL de reactivo de bilirrubina total 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 50 μ 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 final es estable por 30 minutos.

Para instrumentos que requieren un volumen total mayor a 1 mL, utilice 3 mL de reactivo de trabajo y 200 μ 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

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

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: 0.2 – 1.2 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.
