

# Bilirrubina Total y Directa

Jendrassik – Grof. Colorimétrico

## Determinación cuantitativa de bilirrubina IVD

Conservar a 2-8°C

### PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucurónido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con cafeína para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada<sup>1,2,3</sup>.

### SIGNIFICADO CLÍNICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina. Es transportada del bazo al hígado y se excreta en la bilis. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia: Bilirrubina Total: Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. Bilirrubina Directa: Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas<sup>1,6,7</sup>. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

### REACTIVOS

<b>R 1</b>	Ácido sulfanílico	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico	400 mmol/L
<b>R 2</b>	Sodio nitrito	50 mmol/L
<b>R 3</b>	Cafeína	100 mmol/L
<b>Opcional</b>	<b>BILIRUBIN CAL</b>	Ref:1002250

### PRECAUCIONES

R1: H290-Puede ser corrosivo para los metales. H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. EUH208-Contiene ácido sulfanílico. Puede provocar una reacción alérgica. Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

### PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

### CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

### Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Desarrollo de color en el R 2.

### MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador con cubeta para lecturas a 540 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

### MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis<sup>1</sup>. Proteger de la luz. Estabilidad de la muestra: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

### PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:  
 Longitud de onda: ..... 540 nm  
 Cubeta: ..... 1 cm paso de luz  
 Temperatura ..... 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	B. Total	B. Directa	Blanco
R 1 (µL)	200	200	200
R 2 (gotas)	1	1	--
CiNa 9 g/L (mL)	--	2,0	2,0
R 3 (mL)	2,0	--	--
Muestra / Calibrador (µL) <sup>(Nota 1)</sup>	200	200	200

- Mezclar e incubar exactamente **5 minutos** a 15-25°C.
- Medir la absorbancia (A) del calibrador y la muestra.

### CÁLCULOS

#### - Con Calibrador:

$$\frac{(A)Muestra - (A)Blanco Muestra}{(A)Calibrador - (A)Blanco Calibrador} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

-**Cálculo teórico:** En ausencia de un calibrador adecuado, se pueden utilizar factores teóricos, solo como orientativos. El cálculo con calibrador es el más adecuado.

Cálculo: (A) Muestra - (A) Blanco Muestra x Factor = mg/dL de bilirrubina

Factor Bilirrubina Total: 13,8

Factor Bilirrubina Directa: 10,4

**Factor de conversión:** mg/dL x 17,1 = µmol/L.

### CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

### VALORES DE REFERENCIA<sup>1</sup>

Bilirrubina Total en adultos	Hasta 1,10 mg/dL ≅ 18,81 µmol/L
Bilirrubina Total en recién nacidos	<12 mg/dL ≅ < 205,2 µmol/L
Bilirrubina Directa	Hasta 0,25 mg/dL ≅ 4,275 µmol/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

### CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

**Rango de medida:** Desde el *límite de detección* de (T) 0,0926 mg/dL (D) 0,0453 mg/dL hasta el *límite de linealidad* de 20 mg/dL (T y D).

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con NaCl 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

#### Precisión:

Bilirrubina T	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
	Media (mg/dL)	SD	Media (mg/dL)	SD
Media (mg/dL)	1,16	0,02	1,15	0,02
SD	0,02	0,04	0,02	0,13
CV (%)	2,03	1,06	1,91	3,10

Bilirrubina D	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
	Media (mg/dL)	SD	Media (mg/dL)	SD
Media (mg/dL)	0,78	0,01	0,80	0,01
SD	0,01	0,01	0,01	0,03
CV (%)	1,28	0,65	1,63	1,53

**Sensibilidad analítica:** (T) 1 mg/dL = 0,07880 (A). (D) 1 mg/dL = 0,12772 (A).

**Exactitud:** Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x). Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

#### BILIRRUBINA TOTAL

Coefficiente de correlación (r)<sup>2</sup>: 0,9894.

Ecuación de la recta de regresión: y= 0,9832x + 0,0224.

#### BILIRRUBINA DIRECTA

Coefficiente de correlación (r)<sup>2</sup>: 0,9867.

Ecuación de la recta de regresión: y= 0,9923x + 0,0048.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

### INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina<sup>1,3</sup>.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de la bilirrubina<sup>4,5</sup>.

### NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 4.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

### BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A et al. Bilirubin. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1238-1241, 436 and 650.
- Malloy H T et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J Biol Chem 1937; 112 (2): 481-491.
- Jendrassik L et al. Biochemische Zeitschrift Band 1938; 297:80-89.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

### PRESENTACIÓN

Ref: 1001041

Cont.

R 1: 1 x 60 mL  
 R 2: 1 x 10 mL  
 R 3: 1 x 150 mL

