

BILIRRUBINA (TOTAL Y DIRECTA)		BILIRRUBINA (TOTAL)		BILIRRUBINA (DIRECTA)	
COD 11515 2x50+2x50mL	COD 11555 500 + 500 mL	COD 11510 4 x 50 mL	COD 11544 2 x 500 mL	COD 11511 4 x 50 mL	COD 11545 2 x 500 mL
CONSERVAR A 15-30°C					
Reactivos para medir la concentración de bilirrubina Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico					

## BILIRUBIN (TOTAL AND DIRECT) BILIRUBIN (TOTAL) BILIRUBIN (DIRECT)



## BILIRRUBINA SULFANÍLICO DIAZOADO

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La bilirrubina directa presente en la muestra reacciona con el ácido sulfanílico diazoado, originando un complejo coloreado que puede determinarse espectrofotométricamente. La cetrimida solubiliza la bilirrubina indirecta permitiendo su reacción junto con la fracción directa<sup>1,2</sup>. Los términos "directa" y "total" se refieren a las características de reacción en presencia o ausencia de solubilizantes (aceleradores). La bilirrubina "directa" e "indirecta" equivale sólo de forma aproximada a las fracciones conjugada y no conjugada.

### CONTENIDO

	Reactivo AT	Reactivo AD	Reactivo BT	Reactivo BD
COD 11515	2 x 40 mL	2 x 40 mL	2 x 10 mL	2 x 10 mL
COD 11555	400 mL	400 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
COD 11510	4 x 40 mL	—	4 x 10 mL	—
COD 11544	2 x 400 mL	—	2 x 100 mL	—
COD 11511	—	4 x 40 mL	—	4 x 10 mL
COD 11545	—	2 x 400 mL	—	2 x 100 mL

### COMPOSICIÓN

#### BILIRRUBINA (TOTAL)

AT. Reactivo. Ácido sulfanílico 29 mmol/L, ácido clorhídrico 0,2 mol/L, cetrimida 50 mmol/L.

BT. Reactivo. Nitrato sódico 11,6 mmol/L.

#### BILIRRUBINA (DIRECTA)

AD. Reactivo. Ácido sulfanílico 35 mmol/L, ácido clorhídrico 0,24 mol/L.

BD. Reactivo. Nitrato sódico 3,5 mmol/L.

### CONSERVACIÓN

Conservar a 15-30°C.

Los Reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez, absorbancia del blanco superior a 0,05 a 540 nm (cubeta de 1 cm).

### REACTIVOS AUXILIARES

S. Patrón de Bilirrubina (cod 11513). Reconstituir con 5,0 mL de agua destilada (Nota 1). La concentración viene indicada en la etiqueta del vial. El valor de concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 916a (National Institute of Standards and Technology, USA). Proteger el Patrón reconstituido de la luz. Estable 4 horas a 15-30°C o bien durante 2 meses a -18°C congelado en alícuotas.

### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Reactivo de Trabajo:** Vaciar el contenido de un vial de Reactivo BT en un frasco de Reactivo AT para la determinación de bilirrubina total, o el contenido de un vial de Reactivo BD en un frasco de Reactivo AD para la determinación de bilirrubina directa (Nota 2).

Agitar suavemente. Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 1 mL de Reactivo BT + 4 mL de Reactivo AT o 1 mL de Reactivo BD + 4 mL de Reactivo AD. Estable 20 días a 2-8°C.

### EQUIPO ADICIONAL

- Analizador, espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostabilizable a 37°C para lecturas a 540 ± 20 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz (si se utiliza el factor en los cálculos).

### MUESTRAS

Suero recogido mediante procedimientos estándar.

La bilirrubina en suero es estable 2 días a 2-8°C si se protege de la luz.

### PROCEDIMIENTO PARA BILIRRUBINA TOTAL

- Pipetear en tubos de ensayo: (Notas 1, 3)

	Blanco Reactivo	Blanco Muestra	Muestra	Patrón
Agua destilada	100 µL	—	—	—
Muestra	—	100 µL	100 µL	—
Patrón (S)	—	—	—	100 µL
Reactivo (AT)	—	1,0 mL	—	—
Reactivo de Trabajo	1,0 mL	—	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien y dejar durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia (A) de los Blancos de Muestra a 540 nm frente a agua destilada.
- Leer la absorbancia (A) de las Muestras y del Patrón a 540 nm frente al Blanco de Reactivos.

### PROCEDIMIENTO PARA BILIRRUBINA DIRECTA

- Pipetear en tubos de ensayo: (Notas 1, 3)

	Blanco Reactivo	Blanco Muestra	Muestra
Agua destilada	100 µL	—	—
Muestra	—	100 µL	100 µL
Reactivo (AD)	—	1,0 mL	—
Reactivo de Trabajo	1,0 mL	—	1,0 mL

- Agitar bien y dejar reaccionar durante exactamente 5 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) de los Blancos de Muestra a 540 nm frente a agua destilada.
- Leer la absorbancia (A) de las Muestras a 540 nm frente al Blanco de Reactivos.

### CÁLCULOS

La concentración de bilirrubina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Blanco Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

En los cálculos de bilirrubina directa, se debe utilizar el valor de absorbancia obtenido para el patrón en el procedimiento de bilirrubina total (Nota 4).

Concentración masa (mg/dL) x 17,1 = concentración sustancia (µmol/L)

### VALORES DE REFERENCIA

Adultos<sup>3</sup>:

Total:	Hasta 1,0 mg/dL = 17 µmol/L
Directa:	Hasta 0,2 mg/dL = 3,4 µmol/L

Recién nacidos<sup>3</sup> (bilirrubina total):

Edad	Prematuros	No prematuros
Hasta 24 h	1,0-8,0 mg/dL = 17-137 µmol/L	2,0-6,0 mg/dL = 34-103 µmol/L
Hasta 48 h	6,0-12,0 mg/dL = 103-205 µmol/L	6,0-10 mg/dL = 103-171 µmol/L
3-5 días	10-14 mg/dL = 171-239 µmol/L	4,0-8,0 mg/dL = 68-137 µmol/L

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

### CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los Sueros Control Bioquímica niveles I (cod. 18005, 18009 y 18042) y II (cod. 18007, 18010 y 18043), para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

### CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección (bilirrubina total): 0,03 mg/dL = 0,51 µmol/L
- Límite de detección (bilirrubina directa): 0,02 mg/dL = 0,34 µmol/L
- Límite de linealidad: 15 mg/dL = 257 µmol/L. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/3 con agua destilada y repetir la medición.
- Repetibilidad (intraserie):

Bilirrubina total	CV	n	Bilirrubina directa	CV	n
0,59 mg/dL = 10,1 µmol/L	3,0 %	20	0,77 mg/dL = 13,2 µmol/L	1,2 %	20
6,74 mg/dL = 115,2 µmol/L	1,0 %	20	1,36 mg/dL = 23,2 µmol/L	0,5 %	20

- Reproducibilidad (interserie):

Bilirrubina total	CV	n	Bilirrubina directa	CV	n
0,59 mg/dL = 10,1 µmol/L	3,6 %	25	0,77 mg/dL = 13,2 µmol/L	2,3 %	25
6,74 mg/dL = 115,2 µmol/L	3,3 %	25	1,36 mg/dL = 23,2 µmol/L	0,9 %	25

- Sensibilidad (bilirrubina total): 88 mA·dL/mg = 5,15 mA·L/µmol
- Sensibilidad (bilirrubina directa): 100 mA·dL/mg = 5,85 mA·L/µmol
- Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con reactivos de referencia (Nota 4). Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.
- Interferencias: La hemólisis no interfiere (hemoglobina 10 g/L). La lipemia (triglicéridos > 15 g/L) interfiere. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir<sup>4</sup>.

Estos datos han sido obtenidos utilizando un analizador. Los resultados pueden variar al cambiar de instrumento o realizar el procedimiento manualmente.

### CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La bilirrubina es un producto de desecho derivado del grupo hemo de la hemoglobina de los eritrocitos dañados o senescentes, que son destruidos en las células retículoendoteliales. Una vez producida, la bilirrubina se transporta al hígado en asociación con la albúmina. La bilirrubina en el hepatocito se conjuga con el ácido glucurónico y se excreta en la bilis. Existen una serie de enfermedades heredadas o adquiridas que afectan a la producción, captación, metabolismo y excreción de bilirrubina, resultando en una hiperbilirrubinemia<sup>3,5</sup>.

Se observa hiperbilirrubinemia no conjugada en recién nacidos (ictericia fisiológica), en un aumento de la destrucción de eritrocitos (anemia hemolítica, hematoma extenso), en eritropoyesis defectuosa así como en algunas enfermedades genéticas poco frecuentes (síndrome de Gilbert, síndrome de Crigler-Najjar).

La hiperbilirrubinemia conjugada se asocia a una disminución en la excreción de bilis debida a enfermedades hepáticas (hepatitis o cirrosis) o bien a una colestasis intra o extrahepática.

La ictericia es una manifestación clínica de la hiperbilirrubinemia, que consiste en una deposición de los pigmentos biliares en la piel, originando coloración amarillenta de la piel y mucosas.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

### NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en recién nacidos, reconstituir el Patrón con 1,0 mL de agua destilada. La concentración en este caso será la indicada en la etiqueta multiplicada por 5. Reducir el volumen de muestra (agua, patrón, suero) a 50 µL y utilizar el Patrón concentrado. Se duplica así la linealidad del método (hasta 30 mg/dL = 514 µmol/L).
- Es conveniente lavar el vial de Reactivo B con una pequeña cantidad de la mezcla preparada, con el fin de arrastrar los restos que mojan las paredes del frasco.
- Estos reactivos pueden utilizarse en la mayoría de analizadores automáticos. Solicite información a su distribuidor.
- La calibración con el patrón acuoso suministrado puede causar sesgos, especialmente en algunos analizadores. En estos casos, se recomienda calibrar usando un patrón de base sérica (Calibrador Bioquímica, cod. 18011 y 18044).

### BIBLIOGRAFÍA

- Pearlman FC and Lee RTY. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents. Clin Chem 1974; 20: 447-453.
- Zoppi F, Peracino A, Fenili D, Marcovina S and Ramella C. Metodo per la determinazione della bilirubina totale e coniugata. Uso di un tensioattivo cationico come agente solubilizzante. Giorn It Chim Cl 1976; 1:343-359.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACCPress, 2000.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACCPress, 2001.