

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



<p>REF 1110005 BD 2 x 50 mL CONTENIDO RD.Reactivo 2 x 40 mL RN.Reactivo 1 x 20 mL</p>	<p>REF 1111010 BT 2 x 100 mL CONTENIDO RT.Reactivo 2 x 80 mL RN.Reactivo 2 x 20 mL</p>	<p>REF 1112005 B (T+D) 2 x 100 mL CONTENIDO RT.Reactivo 1 x 80 mL RD.Reactivo 1 x 80 mL RN.Reactivo 2 x 20 mL</p>	<p>BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA Método colorimétrico PUNTO FINAL</p>
<p>Sólo para uso diagnóstico <i>in vitro</i></p>			

FUNDAMENTO

El ácido sulfanílico diazotado transforma la bilirrubina en azobilirrubina coloreada que se determina fotométricamente. De las dos fracciones de bilirrubina presentes en suero, glucuronato de bilirrubina y bilirrubina libre asociada a albúmina, sólo reacciona directamente la primera, mientras que la bilirrubina libre precisa ser disociada de la proteína por un acelerador para que reaccione. La bilirrubina indirecta se calcula por diferencia entre la bilirrubina total (con acelerador) y la directa (sin acelerador). Los conceptos «directa» e «indirecta» se refieren exclusivamente a las características de reacción en presencia o ausencia de aceleradores o solubilizantes y equivalen sólo de forma aproximada a las dos fracciones de bilirrubina citadas.^{1,2}

COMPOSICION DE LOS REACTIVOS

- RT** Acido sulfanílico 29 mmol/L, ácido clorhídrico 0,24 mol/L, Duposol® 3% (p/v).
- RD** Acido sulfanílico 29 mmol/L, ácido clorhídrico 0,24 mol/L
- RN** Nitrito sódico 11,6 mmol/L.

Kit auxiliar:

- CAL** **Calibrador de Bilirrubina. REF. 1912005**
Bilirrubina liofilizada en matriz proteica. El valor de concentración es trazable al Material de Referencia Certificado 916a. La concentración de Bilirrubina **T** y **D** indicada en la etiqueta es específica del lote. Los valores se han obtenido con reactivos LINEAR en un Cobas Mira.®

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Conservar a la temperatura indicada en la etiqueta. Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Mantener los frascos cerrados, protegidos de la luz y evitar la contaminación durante su uso.

Descartar si se observan signos de deterioro:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia del Blanco (A) a 540 nm > 0,050 en cubeta de 1 cm.
- El reactivo **RN** si desarrolla una coloración amarilla.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Reactivos de trabajo. Mezclar 1 mL **RN** + 4 mL **RT** (Total) ó 1 mL **RN** + 4 mL **RD** (Directa). Estable durante 8 días a 2-8°C.

Calibrador. Reconstituir el vial añadiendo exactamente 1,0 mL de agua destilada. Mezclar y dejar reposar 5-10 minutos. Estabilidad de la bilirrubina protegida de la luz es de: 8 horas 16-25°C, 2 días 2-8°C y 28 días -20°C, congelada una vez.

MUESTRAS

Suero reciente libre de hemólisis. Proteger de la luz hasta su ensayo. En estas condiciones es estable 2 días a 2-8°C. Las muestras pueden congelarse a una temperatura de -15°C o inferior, en cuyo caso la bilirrubina es estable durante 2 meses.

INTERFERENCIAS

- Lipemia (intralipid < 5 g/L) no interfiere.
- Bilirrubina Directa. (Hemoglobina 2 g/L) puede afectar los resultados.
- Bilirrubina Total. (Hemoglobina 16 g/L) no interfiere.
- Otros medicamentos y sustancias pueden interferir³.
- Muestras altamente lipémicas interfieren en el ensayo. La interferencia puede corregirse preparando un blanco de muestra antes de aplicar la fórmula general de cálculo.

EQUIPO ADICIONAL

- Fotómetro o colorímetro para mediciones a 540 ± 20 nm.
- Unidad termostatazada ajustable a 37°C. Realizar el ensayo a la misma temperatura para el calibrador, controles y muestras.
- Pipetas de volumen variable para reactivos y muestras.

TECNICA

BILIRRUBINA TOTAL

1. Pipetear en tubos rotulados:

TUBOS	Blanco de reactivo	Blanco de muestra	Muestra	CAL
Agua destilada	100 µL	-	-	-
Muestra	-	100 µL	100 µL	-
CAL	-	-	-	100 µL
RT	-	1,0 mL	-	-
Reactivo de trabajo	1,0 mL	-	1,0 mL	1,0 mL

2. Mezclar por completo y dejar reposar los tubos a temperatura ambiente durante 2 minutos.
3. Leer la absorbancia (A) de los blancos de muestra a 540 nm frente a agua destilada.
4. Leer la absorbancia (A) de las muestras a 540 nm frente al blanco de reactivo.

El color es estable como mínimo 60 minutos a temperatura ambiente.

BILIRRUBINA DIRECTA

1. Pipetear en tubos rotulados:

TUBOS	Blanco de reactivo	Blanco de muestra	Muestra	CAL
Agua destilada	100 µL	-	-	-
Muestra	-	100 µL	100 µL	-
CAL	-	-	-	100 µL
RD	-	1,0 mL	-	-
Reactivo de trabajo	1,0 mL	-	1,0 mL	1,0 mL



- Mezclar por completo y dejar reposar los tubos 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 reactivo.

CALCULOS

$$\frac{A_{\text{Muestra}} - A_{\text{Blanco muestra}}}{A_{\text{Cal}}} \times C_{\text{Cal}} = \text{mg/dL bilirrubina total / directa}$$

Muestras con concentraciones superiores a 20 mg/dL deben diluirse 1:2 con solución salina y repetir el ensayo. Multiplicar los resultados por 2.

Para expresar los resultados en unidades SI aplicar:
mg/dL x 17,1 = μmol/L

VALORES DE REFERENCIA⁴

ADULTOS

Total	Hasta 1,0 mg/dL
Directa	Hasta 0,2 mg/dL

RECIEN NACIDOS (BILIRRUBINA TOTAL)

Edad	Prematuros	A término
Hasta 24 h	1,0 - 6,0 mg/dL	2,0 - 6,0 mg/dL
hasta 48 h	6,0 - 8,0 mg/dL	6,0 - 7,0 mg/dL
3-5 días	10,0 - 15,0 mg/dL	4,0 - 12,0 mg/dL

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia.

CONTROL DE CALIDAD

El empleo de un calibrador para calcular los resultados permite obtener una exactitud independiente del sistema o instrumento empleado.

Para un control de calidad adecuado se incluirán en cada serie controles valorados (normales y elevados) que se tratarán como muestras problema.

REF 1980005 HUMAN MULTISERA NORMAL
Valorado. Nivel normal de bilirrubina.

REF 1985005 HUMAN MULTISERA ABNORMAL
Valorado. Nivel elevado de bilirrubina.

Si los resultados obtenidos se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y la técnica usada. Cada laboratorio debe establecer su propio Control de Calidad y sus medidas correctoras cuando los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

SIGNIFICADO CLINICO

La *hiperbilirrubinemia* (una elevación anormal de la bilirrubina tanto conjugada como no conjugada) en plasma es indicativa de una alteración fisiológica de la bilirrubina. Esta condición está originada por una sobreproducción de bilirrubina o por una alteración de su ciclo metabólico. El aumento de la producción de bilirrubina se origina generalmente por una destrucción rápida de los hematíes como resultado de alteraciones sanguíneas tales como la anemia hemolítica.

En recién nacidos el aumento del nivel de bilirrubina puede deberse a una incompatibilidad de grupos sanguíneos (Rh, ABO u otros), sepsis, inmadurez hepática, o a diversos defectos hereditarios ligados a la conjugación de la bilirrubina.

La alteración del metabolismo de la bilirrubina está causada por una deficiencia enzimática o por una obstrucción física en el conducto biliar. La hiperbilirrubinemia ocasiona *kernicterus* (deposición de bilirrubina libre en el cerebro y células nerviosas) o *ictericia* (pigmentación de membranas, mucosas, esclera y piel, causada por la deposición de pigmento bilirrubínico).

NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en recién nacidos, reducir el volumen de muestra y estándar a 50 μL y continuar con la técnica descrita.
- Este ensayo permite ser adaptado a distintos instrumentos automáticos. Cualquier adaptación a un instrumento deberá ser validada con el fin de demostrar que se cumplen las características analíticas del método. Se recomienda validar periódicamente el instrumento. Consultar con su distribuidor para cualquier dificultad en la adaptación del método.
- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

CARACTERISTICAS ANALITICAS

- Limite detección (Bilirrubina Directa)** : 0,09 mg/dL
- Limite detección (Bilirrubina Total)** : 0,03 mg/dL
- Linealidad** : Hasta 20 mg/dL
- Precisión**

mg/dL	Bilirrubina Directa				Bilirrubina Total			
	Intraserial		Interserial		Intraserial		Interserial	
Media	0,79	1,82	0,79	1,82	1,61	4,85	1,61	4,85
DE	0,03	0,06	0,03	0,07	0,03	0,05	0,05	0,11
CV%	4,23	3,02	4,28	4,11	2,00	1,13	3,28	2,32
N	10	10	10	10	10	10	10	10

- Sensibilidad (Bilirrubina Directa)** : 0,171 A / mg/dL
- Sensibilidad (Bilirrubina Total)** : 0,073 A / mg/dL
- Correlación (Bilirrubina Total)** : Este ensayo (y) fue comparado con un método comercial similar (x). Los resultados fueron los siguientes:
N = 52 r = 0,96 y = 0,99x + 0,113

Las características analíticas han sido generadas usando un instrumento automático. Los resultados pueden variar según el instrumento utilizado.

REFERENCIAS

- Walters, M.I. y Gerarde, H.W. Microchemical Journal. 15, 231 (1970).
- Pearlman, F.C. y Lee, R.T.Y. Clin. Chem. 20/4, 447 (1974).
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AAC Press, 2000.
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, p.940. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1987.

B1112-4/1011
RI.cas

