



## BILIRRUBINA-SL (DIRECTA)

**Números de catálogo:** 247-10  
247-30  
247-50A  
247-50B

**Presentaciones:** R1: 1 x 100 mL, R2: 1 x 25 mL  
R1: 3 x 100 mL, R2: 1 x 75 mL  
R1: 1 x 1000 mL  
R2: 1 x 300 mL

### USO

Equipo diagnóstico para la determinación cuantitativa *in vitro* de bilirrubina directa en suero.

### PRECAUCION

Evitar la ingestión y el contacto con la piel y los ojos. Véase la Hoja de Seguridad del Producto.

### REACTIVOS

**R1: Reactivo DBili-SL:** contiene 0.1 mmol/L de EDTA-Na<sub>2</sub>, 154 mmol/L de NaCl y 100 mmol/L de ácido sulfámico

**R2: Reactivo DBili-SL Diazo:** contiene 0.5 mmol/L de sal de 2,4 diclorofenil diazonio, 0.9 mol/L de HCl y 0.13 mmol/L de EDTA-Na<sub>2</sub>.

### ANTECEDENTES

La bilirrubina es un producto de la degradación de la hemoglobina por el sistema reticuloendotelial y existe en dos formas. La bilirrubina no conjugada (indirecta) es transportada hacia el hígado fijada a la albúmina donde luego es conjugada (directa) con ácido glucurónico y excretada.

La bilirrubina sérica elevada indica afección hepática, hemólisis excesiva u obstrucción de vías biliares.

La determinación de la bilirrubina se basa generalmente en la reacción de ésta con el ácido sulfanílico diazotado, como lo describió Ehrlich (1). En este método, la bilirrubina directa (conjugada) se acopla a la sal de diazonio en presencia de ácido sulfámico para formar el compuesto colorido azo-bilirrubina.

### PRINCIPIO

Bilirrubina Directa + Sal de 2,4-diclorofenil diazonio → Azobilirrubina

La bilirrubina (conjugada y no conjugada) se acopla con el reactivo diazo en presencia del tensoactivo para formar azo-bilirrubina.

El aumento en la absorbancia a 546 nm es directamente proporcional a la concentración de bilirrubina total en la muestra.

Direct bilirubin reacts with a diazonium salt forming azobilirubin. The increase in absorbance at 546 nm due to azobilirubin formation is proportional to the direct bilirubin concentration.

### PREPARACION DEL REACTIVO

Los reactivos son suministrados listos para usarse.

### ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

Los reactivos incluidos son estables hasta la fecha de caducidad especificada en las etiquetas a 2-8°C.

## DETERIORO DEL REACTIVO

Las soluciones de reactivos deben ser claras. Una turbidez indica deterioro.

## INSTRUMENTOS

Puede usarse cualquier analizador con control de temperatura de  $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$  que sea capaz de leer la absorbancia con exactitud, con una sensibilidad de 0.001 de absorbancia a 546 nm. El ancho de banda deberá ser de 10 nm o menos, la desviación de la luz de 0.5% o menos y la exactitud de longitud de onda dentro de 2 nm.

## RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

La muestra de elección debe ser suero fresco, claro y no hemolizado. La muestra debe protegerse de la luz. Las muestras para los análisis deben almacenarse a  $2-8^{\circ}\text{C}$  y son estables durante 3 días. Pueden conservarse por periodos más largos a temperaturas de  $-20^{\circ}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ .(5)

## INTERFERENCIAS

Se evaluaron las interferencias por hemólisis y lipemia para este método en un analizador Hitachi utilizando un criterio de significancia de varianza  $>10\%$  a partir del control.

No se observó interferencia lipémica importante para este método. Se estudiaron las concentraciones de intralípidos de 0-1000 mg/dL (equivalente a 0 -33.9 mmol/L [0-3000 mg/dL] de triglicéridos) en una muestra de bilirrubina total de 9.5 :mol/L (0.56 m g/dL).

La hemoglobina produce una interferencia importante con este método; por tanto, no deben utilizarse muestras hemolizadas. Puede encontrar un resumen de la influencia de drogas en las pruebas de laboratorio clínico consultando a Young, D.S. (6).

## PROCEDIMIENTO

### Materiales Proporcionados

Se proporcionan los reactivos necesarios para la determinación de bilirrubina total.

### Materiales Requeridos

1. Un analizador que reúna los requisitos mencionados en la sección de Instrumentos.
2. Cubetas de 1 cm o una celda de flujo capaz de transmitir luz a 546 nm.
3. Tubos de ensayo con capacidad para 3 mL.
4. Pipetas con capacidad para dispensar 2.5 mL y 25  $\mu\text{L}$
5. Un cronómetro adecuado para medir el tiempo de incubación a 5 y 20 minutos
6. Un calibrador de bilirrubina

### Condiciones

	Genéricas	Analizador Automatizado
Longitud de onda .....	546 nm	546 nm
Temperatura .....	18-26°C ó 37°C	37°C
Paso de luz .....	1 cm	
Tipo de reacción .....	Punto final	Punto final
Tiempo de reacción .....	5 min a 18-26°C ó 1 min a 37°C	5 minutos
Volumen de la muestra .....	25 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$
Volumen de reactivo .....	R1: 1.0 mL	R1: 320 $\mu\text{L}$
.....	R2: 250 $\mu\text{L}$	R2: 80 $\mu\text{L}$
Volumen total .....	1.275 mL	400 $\mu\text{L}$
Relación muestra/reactivo .....	1/50	1/40

### Procedimiento

1. Para cada calibrador y muestra desconocida, etiquete dos tubos de ensayo; blanco y muestra. En cada tubo pipete 1.0 mL de Reactivo TBili-SL Acelerador (R1).

2. Agregue 250 µL de Reactivo TBili-SL Diazo (R2) a todos los tubos de ensayo etiquetados con "muestra". Mezcle bien. NO agregue el Reactivo TBili-SL Diazo a los tubos etiquetados como blanco.
3. Incube por 5 minutos a 18-26°C o 1 minuto a 37°C.
4. Determine la absorbancia de cada blanco y de la muestra a 546 nm utilizando agua desionizada como blanco de reactivo.

### ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la mezcla de reacción final es estable por 10 minutos.

### CALIBRACION

El procedimiento puede calibrarse de la siguiente manera:

1. Puede usarse un solo calibrador de bilirrubina conforme instrucciones para calibrar el procedimiento.
2. Puede prepararse una curva de calibración con cuatro o cinco niveles de calibrador de bilirrubina, que oscilen desde 2 µmol/L (0.1 mg/dL) hasta el límite de linealidad de 513 µmol/L (30 mg/dL). Los calibradores debe analizarse de acuerdo al procedimiento dado y trazarse la absorbancia neta contra sus valores conocidos a fin de formar una curva de la cual puedan leerse directamente los valores desconocidos.

Los análisis no automatizados deben calibrarse con cad corrida. la frecuencia de calibración en los sistemas automatizados dependerá del sistema en sí y de los parámetros empleados.

### CONTROL DE CALIDAD

Se debe analizar un suero u orina control con nivel normal y anormal en cada serie de muestras y los resultados deberán caer dentro de ± 2 desviaciones estándar del valor establecido.

### CALCULO Y RESULTADOS

#### Resultados

La bilirrubina total en suero se expresa en µmol/L (mg/dL).

#### Cálculo

$$\text{Bilirrubina total } \mu\text{mol/L (mg/dL)} = \frac{A_2 - A_1}{A_2 - A_1} \times \text{concentración del calibrador}$$

$A_2$  desconocida = absorbancia final de la muestra desconocida

$A_1$  desconocida = absorbancia del blanco desconocido

$A_2$  calibrador = absorbancia final del calibrador

$A_1$  calibrador = absorbancia del blanco de calibración

Ejemplo

$$\begin{aligned} \text{Bilirrubina total } \mu\text{mol/L (mg/dL)} &= \frac{0.166 - 0.023}{0.363 - 0.019} \times 304.4 \mu\text{mol/L (17.8 mg/dL)} \\ &= 126.5 \mu\text{mol/L (7.40 mg/dL)} \end{aligned}$$

0.166 = absorbancia final de la muestra desconocida

0.023 = absorbancia del blanco desconocido

0.363 = absorbancia final del calibrador

0.019 = absorbancia del blanco de calibración

304.4 µmol/L (17.8 mg/dL) = concentración del calibrador

#### Limitaciones

Una muestra con una concentración de bilirrubina total que exceda el límite de linealidad debe diluirse con solución salina a 0.9% y volverse a analizar incorporando el factor de dilución en el cálculo del resultado.

## VALORES ESPERADOS (7)

3.4-17.0  $\mu\text{mol/L}$  (0.2-1.0 mg/dL)

Se sugieren estos valores como referencia. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal para el área donde está localizado.

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Estas características de rendimiento se obtuvieron en los laboratorios de DCL usando procedimientos automatizados a menos que se indique lo contrario.

### Estudio de Recuperación

Se añadió bilirrubina a un grupo de sueros humanos para aumentar la concentración de bilirrubina en 157.3 y 314.4  $\mu\text{mol/L}$  (9.25 y 18.49 mg/dL). La recuperación de la bilirrubina agregada promedió 99.5%.

### Rango Reportable (NCCLS EP6-P)

El procedimiento automatizado descrito dio un rango reportable de 0 a 513  $\mu\text{mol/L}$  (0.00 a 30.00 mg/dL). El rango reportable dependerá de la proporción muestra/ reactivo utilizada.

### Estudios de Precisión (NCCLS EP5-T2)

Se recopilaron los datos de 2 sueros control, usando un solo lote de reactivo en 40 corridas durante 20 días.

Nivel		DE Total		CV Total %	DE dentro de la corrida		CV dentro de la corrida %
$\mu\text{mol/L}$	mg/dL	$\mu\text{mol/L}$	mg/dL		$\mu\text{mol/L}$	mg/dL	
14	0.8	0.5	0.03	4.2	0.5	0.03	3.7
152	8.9	6.3	0.37	4.2	2.6	0.15	1.7

### Exactitud (NCCLS EP9-P)

El rendimiento de este método (y) se comparó con el de un método similar (x) en un analizador Hitachi. 65 muestras que oscilador desde 2  $\mu\text{mol/L}$  a 181  $\mu\text{mol/L}$  (0.1 mg/dL a 1 0.6 mg/dL) dieron un coeficiente de correlación de 0.9985. El análisis de regresión lineal dio la siguiente ecuación:

$$\text{Este método} = 0.97 (\text{método de referencia}) + 2 \mu\text{mol/L.}$$

## REFERENCIAS

1. Malloy H.T. and Evelyn, K.A., The Determination of Bilirubin with the Photoelectro Colorimeter., J. Biol. Chem. 119: 481-490 (1973).
2. Jendrassik, L and Grof. P. Vereinfachte, Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blubilirubins, Biochem. A. 297: 81-89 (1938).
3. Walters, M. and Gerarde, H., An Ultramicromethod for the Determination of Conjugated and Total Bilirubin in Serum or Plasma, Microchem. J. 15: 231-243 (1970).
4. Winsten, J. and Cehelyk, B., A Rapid Micro Diazo Technique for Measuring Total Bilirubin., Clin. Chem. Acta 25: 441-446 (1969).
5. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds), Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
6. Young, D.S., Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, AACC Press, Washington, 1990.