

# BILIRRUBINA DIRECTA

## Uso:

Para la determinación cuantitativa de la bilirrubina directa en suero humano. Para el uso de diagnóstico in vitro.

## Introducción:

La bilirrubina es un metabolito de la porción hemo de hemoproteínas, principalmente hemoglobina. Normalmente se excreta en el intestino y la bilis del hígado. El sitio del catabolismo de la hemoglobina es el sistema reticuloendotelial (RES). La bilirrubina se libera en el torrente sanguíneo donde se une fuertemente a la albúmina y se transporta al hígado. Tras la absorción por el hígado, la bilirrubina se conjuga con ácido glucurónico para formar la bilirrubina mono y diglucurónico que son metabolitos solubles en agua. Los metabolitos van a reaccionar con el reactivo diazo acuoso y se conoce comúnmente como "la bilirrubina directa".<sup>1</sup>

La elevación de la bilirrubina sérica total puede ocurrir debido a (1) una hemólisis excesiva o destrucción de las células rojas de la sangre, por ejemplo, enfermedad hemolítica del recién nacido, (2) las enfermedades del hígado, por ejemplo, hepatitis y la cirrosis (3) la obstrucción de la vía biliar, por ejemplo cálculos biliares.<sup>1</sup> Hay información en la literatura que indica niveles elevados de bilirrubina directa en pacientes con enfermedades del hígado o del tracto biliar: a pesar de que, el total de los niveles de bilirrubina son normales.<sup>2</sup> Por lo tanto, el mayor valor diagnóstico de las pruebas de bilirrubina directa se deriva de su capacidad de indicar enfermedad hepática oculta. La mayoría de los métodos químicos para la determinación de bilirrubina total se basan en la reacción entre el ácido sulfanílico diazotado y la bilirrubina para producir azobilirrubina, que absorbe al máximo a 560 nm. Tales pruebas son a menudo dirigidas en presencia y en ausencia de un disolvente orgánico por ejemplo, metanol, para distinguir la bilirrubina libre de bilirrubina conjugada en una base de solubilidad diferencial.<sup>3</sup>

## Principio:

La bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado para producir azobilirrubina, que tiene un máximo de absorbancia a 560 nm de la solución acuosa. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad presente de concentración de bilirrubina directa en la muestra.

## Reactivos:

1. Reactivo de Bilirrubina: Ácido sulfanílico 32 mM, ácido clorhídrico 165 mM.
2. Nitrito de Bilirrubina: nitrito de sodio 60 mM.
3. Calibrador de Bilirrubina: N-1-naftil sal dihidrocloruro de etilendiamina. (5 mg/dl).

## Precauciones:

1. Para uso de diagnóstico in vitro.
2. Las muestras deben ser consideradas infecciosas y manejadas apropiadamente.
3. No pipetear los reactivos con la boca. Evite el contacto con los ojos, piel y ropa. No ingerir. Lávese las manos después de su uso.

## Preparación del Reactivo:

Bilirrubina Directa: Añadir 0.005 mL (5 µL) de nitrito de sodio por 1.0 mL de bilirrubina directa y mezclar. Ejemplo: nitrito de sodio 0.05 mL /10 mL de reactivo de bilirrubina directa, 0.1mL nitrito de sodio /20 mL de reactivo de bilirrubina directa, etc.

## Almacenaje del Reactivo:

1. Todos los reactivos se almacenaron a temperatura ambiente (15-30°C).
2. Reactivo de trabajo combinado puede ser almacenado por hasta ocho (8) horas cuando se mantiene en una botella ámbar a temperatura ambiente.
3. No congele los reactivos.
4. Evite la exposición a la luz solar directa

## Deterioro del Reactivo:

El reactivo se debe desechar si:

1. El nitrito de sodio muestra descoloramiento amarillo.

2. El reactivo falla en alcanzar los valores asignados de suero de control fresco.

## Recolección y Almacenaje del Reactivo:

1. La hemólisis interfiere con la prueba, es decir, muestras hemolizadas se deben evitar ya que pueden dar valores falsamente bajos.<sup>4</sup>
2. Todas las muestras para esta prueba deben ser cuidadosamente protegidas de la luz.<sup>1</sup>
3. La bilirrubina en suero es estable de 4-7 días cuando se almacena en la oscuridad a 2-8°C.<sup>1</sup>

## Interferencias:

1. Young et al. da una lista exhaustiva de las drogas y otras sustancias que se sabe que afectan los niveles circulantes de bilirrubina.<sup>5</sup>
2. En esta prueba, como en todos los procedimientos de laboratorio, los materiales, que entran en contacto con las muestras, deben estar limpios y libres de contaminación por metales pesados, detergentes, y otros productos químicos.

## Materiales Provistos:

1. Reactivo Bilirrubina Directa.
2. Reactivo Nitrito de Sodio.
3. Calibrador de Bilirrubina.

## Materiales Requeridos pero no Provistos:

1. Cubetas
2. Pipetas
3. Cronómetro
4. Analizador químico automatizado apropiado o espectrofotómetro capaz de medir a 560 nm.

## Procedimiento (Automatizado):

Consulte las instrucciones del instrumento apropiado para la aplicación.

## Procedimiento (Manual):

1. Identifique los tubos " , blanco, estándar, control, paciente". Cada tubo requiere un tubo en blanco.
2. Dispense 1.0 mL de reactivo de bilirrubina directa a todos los tubos en blanco.
3. Prepare el reactivo de trabajo. Consulte la sección "Preparación de los reactivos".
4. Dispense 1.0 mL del reactivo de trabajo en los tubos de ensayo identificados.
5. Añadir 0.1 mL (100µL) de cada estándar de control, y de muestra a su tubo respectivo. Mezclar bien.
6. Permitir que todos los tubos estén en reposo durante cinco (5) minutos a temperatura ambiente.
7. Ajuste la longitud de onda del instrumento a 560 nm. Cero con blanco de reactivo. (Rango de longitud de onda: 500-560).
8. Leer y anotar la absorbancia de todos los tubos.

\*UN CALIBRADOR MULTIUSOS SE PUEDE UTILIZAR PARA REEMPLAZAR EL ESTÁNDAR.

## Notas del Procedimiento:

1. El color final producido es estable por 60 minutos.
2. Para muestras pediátricas sobre 3.0 mg/dL, utilice 0.05 mL (50 µL) de muestra y multiplique el resultado por dos (2).
3. Si el espectrofotómetro siendo utilizado requiere un volumen final mayor de 1.0 mL para lecturas precisas, 3 mL de reactivo y 0.2 mL (200 µL) de muestra pueden ser utilizados.

## Cálculos:

Abs. = absorbancia

$\frac{\text{Abs. de Desc.} - \text{Abs. de blanco Desc.}}{\text{mg/dL}}$

Abs. de calibrador - Abs. de blanco calibrador  
= Bilirrubina Directa (mg/dL)

Ejemplo:

Absorbancia de Desconocido = 0.132

Absorbancia de blanco Desconocido = 0.120

Absorbancia de calibrador = 0.450

Absorbancia de blanco calibrador = 0.000

Concentración de calibrador = 5.0 mg/dL

Entonces:

$$\frac{0.132 - 0.120}{0.450 - 0.000} \times 5 = \frac{0.012}{0.450} \times 5 = 0.13 \text{ mg/dL}$$

## Limitaciones del Procedimiento:

1. Los sueros con valores por encima de 20 mg/dL se deben diluir 1:1 con solución salina isotónica, volverse a analizar y la respuesta final multiplicarla por dos (2).
2. Los niveles séricos de hemoglobina de hasta 1.0 g/dL no interfieren con los resultados.

## Control de Calidad:

Sueros de control con concentraciones normales y anormales conocidas de bilirrubina directa deberán ser analizados rutinariamente con cada grupo de muestras desconocidas.

## Valores Esperados<sup>1,6</sup>

Infantes (después de un mes) y adultos: 0.0 - 0.5 mg/dL.

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio establezca su propio rango normal.

## Desempeño:

1. Linealidad: 20 mg/dL
2. Sensibilidad: Basado en un instrumento con resolución 0.001 de absorbancia, el presente procedimiento tiene una sensibilidad de 0.01 mg/dL.
3. Comparación: Un estudio de comparación entre el presente método con un producto comercial disponible utilizando un método idéntico en cuarenta (40) muestras de suero nuevas y dos controles de suero comerciales, que van desde 0.10 mg/dL a 0.67 mg/dL se obtuvo un coeficiente de 0.98 y una ecuación de regresión de  $y = 0.99x + 0.01$ .
4. Estudios de Precisión:

## Precisión Día a Día:

Dos sueros control comercial fueron probados durante un período de 21 días y la siguiente precisión día a día se obtuvo.

	Nivel I	Nivel II
Promedio (mg/dL) N=16	0.13	0.33
S.D.	0.01	0.04
C.V.	7.0%	12.0%

## Precisión Entre Corridas:

Dos sueros control comercial fueron probados durante un período de 20 días y la siguiente precisión entre corridas se obtuvo.

	Nivel I	Nivel II
Promedio (mg/dL) N = 20	0.10	0.23
S.D.	0.01	0.03
C.V.	10.0%	13.0%

## Referencias:

1. Tietz, N.W.: Fundamentals of Clinical Chemistry. W. B Saunders Co., Philadelphia, p. 1208 (1976).
2. Gambino, S.R., et al., JAMA 201:1047 (1967).
3. Walters, M. Gerand, H., Microchem J. 15: 231 (1970).
4. Michaelson, M.: Scand. J., J. Clin. Lab. Invest. (Suppl. 49) 13, 1 (1961).
5. Young, D.S., et al.: Clin. Chem. 21, 10 (1975).
6. Gambino, S.R., et al.: Bilirubin Assay (Revised), Commission on Continuing Education. Am. Soc. of Clin. Path., Chicago (1968).

