



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecoqram@gye.satnet.net

BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA

USO DIRIGIDO

Para la determinación de la bilirrubina total y directa en suero.

INTRODUCCION

La Bilirrubina es un metabolito de la porción hemo de las hemo proteínas, en su mayor parte de la hemoglobina. Normalmente se excreta en el intestino y la bilis del hígado. El sitio del catabolismo de la hemoglobina es el sistema reticuloendotelial (SER). La bilirrubina se suelta entonces en el torrente sanguíneo donde se liga firmemente a la albúmina y se transporta al hígado. En la captación por el hígado, la bilirrubina se conjuga con ácido glucurónico para formar bilirrubina mono y diglucoronada que son metabolitos solubles en agua. Los metabolitos reaccionarán con reactivo acuoso diazo y normalmente será llamado “bilirrubina directa”.

La elevación de bilirrubina total en suero puede ocurrir debido a (1) hemólisis excesiva o destrucción de las células rojas de la sangre, Ej.: enfermedad hemolítica del recién nacido, (2) las enfermedades del hígado Ej.: hepatitis y cirrosis (3) obstrucción del tracto biliar ej. Cálculo biliar. Hay información en la literatura que indica niveles de bilirrubina total en pacientes con enfermedades del hígado o del tracto biliar aunque los niveles de bilirrubina total sean normales. Por consiguiente, el valor de diagnóstico más alto que tienen las pruebas de bilirrubina directa es su capacidad de indicar enfermedades del hígado que se encuentren ocultas.

La mayoría de los métodos químicos para la determinación de bilirrubina total están basados en la reacción entre el ácido sulfanílico diazotizado y la bilirrubina, para producir azobilirrubina, la cual se absorbe a 560 nm. Tales pruebas se corren usualmente e la presencia o ausencia de un solvente orgánico ej: metanol para distinguir la bilirrubina libre de la bilirrubina conjugada en una base diferencial de solubilidad.

PRINCIPIO

La bilirrubina reacciona con el ácido sulfanílico diazotizado para producir azobilirrubina, la cual tiene una máxima absorbancia de 560 nm en una solución acuosa. La intensidad del color que se produce es directamente proporcional a la cantidad de concentraciones de bilirrubina directa presentes en la muestra. La subsecuente adición del metanol acelera la reacción de la bilirrubina no conjugada en el suero, y se obtiene un valor para la bilirrubina total después de 5 (cinco) minutos. El valor de la bilirrubina total representa la suma de la bilirrubina glucuronide (directa) y la bilirrubina no conjugada (total). El color producido, medido a 560 nm, es proporcional a la cantidad de la concentración de bilirrubina total presente en la muestra.

REACTIVOS

1. Reactivo de Bilirrubina: Acido Sulfanílico a 32 nM, Acido hidroclicórico a 165 mM.

2. Reactivo de nitrito de Bilirrubina: Nitrito de sodio a 60 mM.
3. Calibrador de Bilirrubina: Sal N-1-naftiletylenediamina dihidrocloruro (5 mg/dl).
4. Reactivo de Metanol: Metanol Absoluto, grado de reactivo.

PRECAUCIONES

1. Para Diagnóstico In Vitro.
2. Las muestras deben ser consideradas infecciosas y deben ser manejadas apropiadamente.
3. No pipetee los reactivos con la boca. Evite el contacto del reactivo con los ojos, la piel y la ropa. No lo ingiera. Lave las manos después de su uso.

ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben ser almacenados a temperatura ambiente (15° - 30°C).
2. No congele los reactivos.
3. Evite su exposición a la luz directa del sol.

DETERIORO DEL REACTIVO

El reactivo se debe descartar si:

1. El nitrito de sodio tiene una decoloración amarilla.
2. El reactivo de trabajo no alcanza los valores asignados del ensayo en el suero fresco de control.

RECOLECCION DE SUERO Y ALMACENAMIENTO

1. La hemólisis interfiere con la prueba, por lo tanto se deben evitar las muestras hemolizadas puesto que podrían dar resultados falsamente bajos.
2. Todas las muestras que van a ser analizadas deben ser protegidas cuidadosamente de la luz solar.
3. La bilirrubina en el suero es estable por 4 – 7 días cuando se ha almacenado en un sitio oscuro a 2 – 8°C.

INTERFERENCIAS

1. Young da una lista exhaustiva de las drogas y otras sustancias que se conoce que afectan al nivel circulante de bilirrubina.
2. En este ensayo, como en todos los procedimientos de laboratorio, los materiales, que tienen contacto con las muestras, deben estar limpios y libres de contaminación de metales pesados, detergentes, y otros químicos.

MATERIALES PROVISTOS

1. Reactivo de bilirrubina.
2. Reactivo de nitrito de bilirrubina.
3. Calibrador de bilirrubina.
4. Reactivo de Metanol

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Cubetas.
2. Pipetas.
3. Cronómetros.

- Equipo apropiado automatizado para analizar químicos o espectrofotómetro capaz de medir a 560 nm.

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

PROCEDIMIENTO MANUAL DE PUNTO FINAL

NOTA: Debido al tiempo crítico de la Reacción de la Bilirrubina Directa, procese a cada paciente por separado. El blanco de suero debe ser preparado para cada paciente y control.

- Rotule los tubos de ensayo. "blanco, estándar, control, paciente".
- Dispense 2.8 de reactivo de bilirrubina a todos los tubos.
- Añada 50 µl (0.05 ml) de Reactivo de Nitrito de Bilirrubina a todos los tubos, mezcle y deje reposar por un (1) minuto.
- Transfiera 200 µl (0.2 ml) de suero a su tubo respectivo, mezcle suavemente y fije el cronómetro por un (1) minuto. (Use agua destilada para el tubo de blanco).
- Fije la longitud de onda del fotómetro a 560 nm y ponga a cero con un tubo de blanco. (Rango de la longitud de onda: 500 – 550 nm).
- Después de exactamente un (1) minuto, registre la absorbancia y use esto para calcular la Bilirrubina Directa.
- Añada 3.0 ml de Reactivo de Metanol a todos los tubos, mezcle por inversión y deje reposar por cinco (5) minutos.
- Después de cinco (5) minutos, lea y registre la absorbancia de todos los tubos.
- Use esto para calcular la Bilirrubina Total.

*USE EL CALIBRADOR TC-MULTI PROPOSITO PARA REMPLAZAR AL ESTÁNDAR.

BLANCO DEL PACIENTE

- Rotule los tubos de ensayo como "Blanco, Estándar, Control, Paciente", etc.
- Dispense 2.8 ml de Reactivo de Bilirrubina a todos los tubos.
- Añada 50 µl (0.05) de agua destilada a todos los tubos.
- Siga el procedimiento ya descrito. (pasos 4 – 8)

ESTABILIDAD DE LA REACCION DE PUNTO FINAL

La formación de color de la bilirrubina directa es estable por treinta (30) minutos, mientras que la formación de color de la bilirrubina total es estable por sesenta (60) minutos.

CÁLCULOS

Abs. = absorbancia

$\frac{\text{Abs. desconocida} - \text{Abs. de blanco}}{\text{Abs. de calibrador} - \text{Abs. del blanco de calibrador}}$ x Conc. de calibrador

Abs. de calibrador – Abs. del blanco de calibrador (mg/dl)

= Bilirrubina mg/dl

Ejemplo:

Absorbancia desconocida = 0.132
 Absorbancia del blanco desconocida = 0.120
 Absorbancia del calibrador = 0.450
 Absorbancia del blanco calibrador = 0.000
 Concentración del calibrador = 5.0 mg/dl

Entonces

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

- Los sueros con valores por encima de 20 mg/dl deben ser diluidos en 1:1 con salina isotónica, re-analizada y la respuesta final debe ser multiplicada por dos (2).
- Los niveles de hemoglobina del suero de más de 1.0 g/dl no interfieren con los resultados.

CONTROL DE CALIDAD

Los sueros de controles normales y anormales de concentraciones conocidas de bilirrubina total y directa deben ser analizados rutinariamente en cada grupo de muestras desconocidas.

VALORES ESPERADOS

Directa hasta 0.5 mg/dl
 Total hasta 1.0 mg/dl

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal, puesto que existen diferencias entre los instrumentos, los laboratorios, y poblaciones locales

CARACTERISTICAS:

- Linealidad:** 20 mg/dl.
- Sensibilidad:** Basado en la resolución de un instrumento de absorbancia 0.001, este procedimiento tiene una sensibilidad de 0.01 mg/dl.
- Comparación:** Un estudio comparativo entre esta prueba y un producto comercial disponible en el mercado usando el mismo método en veinte (20) muestras frescas de suero y dos controles de suero comerciales, de un rango de 0.20 mg/dl a 7.2 mg/dl condujo un coeficiente de 0.97 y una ecuación de regresión de $y = 0.98x + 0.001$.

4. Estudios de precisión:

Precisión día a día: Dos sueros de control comercial fueron analizados

por un período de 21 días y se obtuvo la siguiente

precisión día a día:

	Nivel I	Nivel II
Media (mg/dl) N =16	0.20	7.2
S.D.	0.02	0.42
C.V.	10.0%	5.8%

Precisión dentro de la corrida: Dos sueros comerciales de control

fueron analizados 20 veces y se obtuvo

la siguiente precisión dentro de la

corrida:

	Nivel I	Nivel II
Media (mg/dl) N=20	0.24	7.6
S.V.	0.02	0.36
C.V.	10.0%	4.7%