



# Bilirrubina

**Método colorimétrico para la determinación de bilirrubina directa y total en suero y otros líquidos biológicos**

## SIGNIFICACION CLINICA

La bilirrubina, compuesto de degradación de la hemoglobina, es captada por el hígado para su conjugación y excreción en la bilis. Las alteraciones hepatocelulares u obstrucciones biliares pueden provocar hiperbilirrubinemias.

La eritroblastosis fetal o anemia hemolítica del recién nacido es una patología provocada por incompatibilidad materno-fetal en la que se produce una destrucción excesiva de glóbulos rojos. Esto resulta en un severo aumento de la bilirrubina sérica con el consecuente riesgo de difusión del pigmento al sistema nervioso central, por lo que la determinación de la bilirrubina en estos niños recién nacidos resulta sumamente importante.

## FUNDAMENTOS DEL METODO

La bilirrubina reacciona específicamente con el ácido sulfanílico diazotado produciendo un pigmento color rojo-violáceo (azobilirrubina) que se mide fotocolorimétricamente a 530 nm.

Si bien la bilirrubina conjugada (directa) reacciona directamente con el diazorreactivo, la bilirrubina no conjugada (indirecta) requiere la presencia de un desarrollador acuoso que posibilite su reacción. De forma tal que, para que reaccione la bilirrubina total (conjugada y no conjugada) presente en la muestra, debe agregarse benzoato de cafeína al medio de reacción.

## REACTIVOS PROVISTOS

**Desarrollador:** solución acuosa de benzoato de cafeína 0,13 mol/l, tamponada y estabilizada.

**Nitrito de Sodio:** solución de nitrito de sodio 0,07 mol/l.

**Reactivo Sulfanílico:** solución de ácido sulfanílico 29 mmol/l y ácido clorhídrico 0,17 mol/l.

## REACTIVOS NO PROVISTOS

- Agua destilada.

- **Bilirrubina Standard** provisto separadamente por Wiener lab. para efectuar la calibración periódica del equipo.

## INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Desarrollador:** listo para usar.

**Reactivo Sulfanílico:** listo para usar.

**Diazorreactivo:** de acuerdo al volumen de trabajo, mezclar 1 parte de Nitrito de Sodio con 21 partes de Reactivo Sulfanílico. Rotular y fechar.

## PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

## ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**Reactivos Provistos:** son estables a temperatura ambiente

(< 25°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

**Diazorreactivo:** en refrigerador (2-10°C) y en frasco de vidrio color caramelo es estable 3 meses a partir de la fecha de su preparación.

## INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

La presencia de sedimento y/o cambio de coloración de los reactivos, pueden ser indicio de deterioro de los mismos.

## MUESTRA

Suero, plasma o líquido amniótico

**a) Recolección:** obtener suero o plasma de la manera usual. Proteger de la luz natural o artificial, envolviendo el tubo con papel negro.

También es posible realizar la determinación en líquido amniótico.

**b) Aditivos:** en caso de que la muestra a emplear sea plasma, debe usarse heparina para su obtención.

**c) Sustancias interferentes conocidas:** hemólisis moderada o intensa inhibe la reacción directa, obteniéndose valores de bilirrubina total falsamente aumentados.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

**d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** la muestra debe ser preferentemente fresca. En caso de no efectuarse el ensayo en el momento, el suero debe conservarse hasta 48 horas en el refrigerador (2-10°C) y la sangre entera no más de 24 horas en refrigerador o 12 horas a temperatura ambiente. El líquido amniótico es conveniente mantenerlo congelado hasta el momento de efectuar el ensayo.

La acción de la luz es capaz de destruir en una hora hasta un 50% de la bilirrubina presente en la muestra. Es por tal motivo que debe protegerse cuidadosamente.

## MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.

- Micropipetas y pipetas capaces de medir los volúmenes indicados.

- Frasco de vidrio color caramelo.

- Tubos de fotocolorímetro.

- Reloj o timer.

## CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 530 nm en espectrofotómetro o 520-550 nm en fotocolorímetro con filtro verde.

- Temperatura de reacción: temperatura ambiente

- Tiempo de reacción: 5 minutos

- Volumen de muestra: 200 ul
- Volumen final de reacción: 2,9 ml

## PROCEDIMIENTO

### I- TECNICA PARA SUERO

En tres tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco), D (Directa) y T (Total) colocar:

|                             | B      | D      | T      |
|-----------------------------|--------|--------|--------|
| <b>Muestra (suero)</b>      | 200 ul | 200 ul | 200 ul |
| <b>Agua destilada</b>       | 2,5 ml | 2,5 ml | -      |
| <b>Desarrollador</b>        | -      | -      | 2,5 ml |
| <b>Reactivo Sulfanílico</b> | 200 ul | -      | -      |
| <b>Diazorreactivo</b>       | -      | 200 ul | 200 ul |

Mezclar de inmediato cada tubo por inversión. Luego de 5 minutos, leer en espectrofotómetro a 530 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (520-550 nm), llevando el aparato a cero con agua destilada. Las lecturas pueden efectuarse entre 4 y 15 minutos, excepto para la bilirrubina directa que debe leerse a los 5 minutos exactos. Si se lee antes, habrá subvaloración de los resultados por reacción incompleta. Si se lee después, habrá sobrevaloración porque comienza a reaccionar la bilirrubina libre.

**Sueros ictericos:** debe emplearse la técnica descrita pero con menores cantidades de muestra, de acuerdo a la severidad de la ictericia. De tal forma, en caso de ictericia moderada se usarán 50 ul de suero mientras que frente a una ictericia intensa se requieren sólo 20 ul. Multiplicar los resultados obtenidos por 3,79 y 9,38 respectivamente.

### II- TECNICA PARA LIQUIDO AMNIOTICO

Se determina bilirrubina total. En dos tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco) y T (Total) colocar:

|                                    | B      | T      |
|------------------------------------|--------|--------|
| <b>Muestra (líquido amniótico)</b> | 1 ml   | 1 ml   |
| <b>Agua destilada</b>              | 1,5 ml | -      |
| <b>Desarrollador</b>               | -      | 1,5 ml |
| <b>Reactivo Sulfanílico</b>        | 0,2 ml | -      |
| <b>Diazorreactivo</b>              | -      | 0,2 ml |

Proceder de la misma manera que en la técnica I. Dividir el resultado final por 5,37.

## CALCULO DE LOS RESULTADOS

Bilirrubina total (mg/l) = (T - B) x f

Bilirrubina directa (mg/l) = (D - B) x f

Bilirrubina libre (indirecta) = BRB total - BRB directa

El factor colorimétrico (f) debe calcularse con Bilirrubina Standard de Wiener lab.

## METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Standatrol S-E 2 niveles.

## VALORES DE REFERENCIA

### Bilirrubina en suero o plasma

- Adultos:

Directa: hasta 2 mg/l

Total: hasta 10 mg/l

- Recién nacidos:

|                  | Nacidos a término | Prematuros |
|------------------|-------------------|------------|
| Sangre de cordón | 25 mg/l           |            |
| hasta las 24 hs  | 60 mg/l           | 80 mg/l    |
| hasta las 48 hs  | 75 mg/l           | 120 mg/l   |
| del 3º al 5º día | 120 mg/l          | 240 mg/l   |

Los valores comienzan luego a disminuir para alcanzar el nivel promedio del adulto al mes del nacimiento. En los prematuros, los niveles de bilirrubina tardan más en alcanzar la normalidad, dependiendo del grado de inmadurez hepática.

### Bilirrubina en líquido amniótico

Valores menores de 1 mg/l son considerados normales, mientras que entre 1 y 2,7 mg/l sugieren la posibilidad de un feto afectado.

Los niveles por encima de 2,7 mg/l sólo se encuentran en presencia de eritroblastosis fetal. Si la cantidad de bilirrubina es superior a 4,7 mg/l el feto ya se encuentra afectado y tiene probablemente algún tipo de falla circulatoria.

Si la cantidad de bilirrubina sobrepasa los 9,5 mg/l la muerte fetal es inminente.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

La acción de la luz, tanto sobre los sueros como sobre las soluciones standard, es capaz de destruir en una hora hasta el 50% de la bilirrubina presente.

## PERFORMANCE

**a) Reproducibilidad:** procesando replicados de las mismas muestras en un mismo día, se obtuvo lo siguiente:

### Bilirrubina directa

| Nivel     | D.S.        | C.V.  |
|-----------|-------------|-------|
| 2,1 mg/l  | ± 0,18 mg/l | 8,5 % |
| 26,0 mg/l | ± 0,62 mg/l | 2,4 % |

### Bilirrubina total

| Nivel      | D.S.        | C.V.  |
|------------|-------------|-------|
| 9,8 mg/l   | ± 0,47 mg/l | 4,7 % |
| 127,7 mg/l | ± 1,45 mg/l | 1,1 % |

**b) Linealidad:** la reacción es lineal hasta 150 mg/l.

**c) Recuperación:** agregando cantidades conocidas de bilirrubina a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 100 y 106%.

## PRESENTACION

Equipo para 200 determinaciones (Cód. 1120001).

## BIBLIOGRAFIA

- Botwell, J. H. - Clin. Chem. 10/3:197 (1964).
- Watson, D. - Clin. Chem. 7/6:603 (1961).
- Ichida, T.; Nobuoka, M. - Clin. Chim. Acta 19/2:249 (1968).
- Zaroda, R. - Am. J. Clin. Path. 45/1:70 (1966).
- O'Brien, D. et al - "Laboratory manual of pediatric micro-biochemical techniques", Harper & Row Pub - 4<sup>a</sup> Ed. (1968).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4<sup>th</sup> ed., 2001.

Elaborado por:  
Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica  
Producto Inscripto M.S.  
Disp. N°: 252/75 - 5347/98



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina

864112500 / 02 Pág. 3 de 6