



Vol. 3, N° 2. Año 1999

## PREPARACIÓN DE UN SUERO CONTROL DE BILIRRUBINA

*Cordero, Priscila; González, Norelis (1); Marrero, Sharim;*

*González, Julio C. (2); González Dora; Pelayo Tibusay (3).*

### RESUMEN

Esta investigación planteó preparar un suero control de bilirrubina liofilizado de excelente calidad y a menor costo, a partir de la extracción y purificación de dicho pigmento de la bilis del cerdo. Una vez preparados, en diferentes concentraciones y liofilizados, los controles fueron distribuidos a dos laboratorios del Estado Carabobo, para ser evaluados en su rutina durante 16 días consecutivos como la muestra de un paciente. Los resultados se evaluaron por el coeficiente de variación (C.V.) alcanzando en estos laboratorios clínicos de acuerdo a los métodos de análisis empleados para así establecer la precisión. Los valores del C.V. encontrados, utilizando métodos automatizados fueron de 33,4% y 33,6% (kit comercial Dimensión y Vitros, respectivamente), mientras que para el método manual fue de 11,1% (kit comercial WIENER). Los valores resultantes por los métodos automatizados son superiores a los niveles aceptables, este hecho podría explicarse por la manipulación de la muestra y a una posible diferencia de concentración entre vial, debido a factores que influyeron en el proceso de liofilización empleado, a pesar que el mismo garantiza mayor estabilidad de la molécula de bilirrubina que la congelación.

Al analizar los resultados empleando t student se observó una diferencia estadísticamente significativamente (al 95% de confiabilidad), entre los valores promedio reportados por los diferentes laboratorios participantes en el estudio. Se concluye que el C.V. encontrado para el método manual es aceptable al compararlo con criterios expuestos por diversos autores; sin embargo, se recomienda continuar evaluando la diferencia de los viales por un período mayor antes de recomendarlo como suero control para este parámetro bioquímico

**Palabras claves:** Bilirrubina, Control de Calidad, Suero Control.

## ABSTRACT

### PREPARATION OF A SERUM CONTROL DE BILIRRUBINA

This investigation outlined to prepare a serum control of bilirrubina liofilizado of excellence quality and at smaller cost, starting from the extraction and purification of this pigment of the bile of the pig. Once prepared, in different concentrations and liofilizados, the controls were distributed to two laboratories of the Estado Carabobo, to be evaluated in their routine during 16 serial days as the sample of a patient. The results were evaluated by the variation coefficient (C.V.) reaching in these clinical laboratories according to the methods of used analysis stops this way to establish the precision. The values of the C.V. opposing using automated methods was of 33,4% and 33,6% (kit commercial Dimension and Vitros, respectively), while for the manual method it was of 11,1% (commercial kit WIENER). The resulting values for the automated methods are superior at the acceptable levels, this fact could be explained by the manipulation of the sample and to a possible concentration difference among vial due to factors that influenced in the process of used liofilización, to weigh that the same one guarantees bigger stability of the bilirrubina molecule that the freezing.

When analyzing the results using t student a difference it was observed statistically significantly (to 95% of dependability), among the values average reported by the different participant laboratories in the study. We concludes that the C.V. opposing for the manual method it is acceptable when comparing it with approaches exposed by diverse authors; however, it is recommended to continue evaluating the difference of the viales for a bigger period before recommending it as serum control for this biochemical parameter

**Key words:** Bilirrubin, Quality Control, Serum Control.

(1) (2) (3) Laboratorio de Fisiología de la Escuela de Bioanálisis U.C.

Valencia Edo. Carabobo-Venezuela

Apartado postal 3649 - Código 2001-Valencia. E-mail: [labrefgm@telcel.net.ve](mailto:labrefgm@telcel.net.ve)

**Fecha de recibido:** Mayo 1999 - **Fecha de aprobado:** Julio 1999

## INTRODUCCIÓN

La adopción de nuevos parámetros de laboratorio de utilidad clínica, así como los respectivos métodos, equipos e instrumentos para determinarlos, hacen que el requerimiento de los mismos, día a día sea mayor, con el fin de poder orientar y confirmar el diagnóstico y planificar el tratamiento adecuado a cada paciente; de igual forma, en la medida que aumenta la utilidad del ensayo y la confiabilidad de sus resultados, el número de análisis realizados por el laboratorio también se incrementa.

Estos factores hacen que cada procedimiento dirigido a generar un resultado esté constituido por una serie de pasos o fases. La comprensión adecuada de cada fase, permite al profesional del Bioanálisis alcanzar condiciones próximas al nivel óptimo, y en consecuencia mejorar la precisión y exactitud de cada determinación.

La mayoría de las técnicas analíticas cuantitativas implican diversos pasos sujetos a cierto grado de imprecisión o a una cierta posibilidad de error, de allí que garantizar su calidad permanentemente, sea indispensable. La confiabilidad de la información provista descansa en los procedimientos de control de calidad. El objetivo inmediato de este control, radica en asegurar que los valores analíticos regularmente producidos por un laboratorio clínico, correspondan exactamente a los valores correctos, es decir; sean suficientemente fiables y adecuados a la finalidad que persiguen. Un propósito más amplio del control de calidad, consiste en asegurar que todos los laboratorios produzcan valores analíticos que cumplan en todo momento los estándares de producción y exactitud aceptables.

Para lograr estos fines dentro y fuera del laboratorio, se requiere que todo el personal del laboratorio esté consciente de las causas de las imprecisiones analíticas y de las técnicas disponibles para detectarlas, corregirlas y controlarlas; además de conocer los grados de inexactitud e imprecisión permitidos, para que los valores analíticos sean clínicamente admisibles; es así, que el uso de sueros controles específicos para cada una de las determinaciones bioquímicas que se realicen y la adopción general de sistemas de control de calidad analítica, permitan garantizar la exactitud y precisión del trabajo de los bioanalistas.

Las investigaciones en cuanto a la realización de programas de control en los laboratorios clínicos, están orientadas a la estandarización de un suero control humano que sin perder ninguna de sus características físicas y químicas, tenga valor absoluto independiente de la metodología analítica, es decir; un suero humano con su estructura

proteica intacta, que pueda dar una migración electroforética similar a la del suero humano fresco (4).

Este tipo de suero no solamente servirá para la estandarización de las técnicas, como patrones de calibración, sino también para el control de calidad como suero patrón de referencia, que permite observar los efectos del envejecimiento de los reactivos, el comportamiento de los blancos y de los patrones, describir los límites dentro de los cuales las respuestas a los cambios de concentración continúan siendo lineales, conocer cuál es la concentración del suero de referencia que permite descubrir rápidamente las deficiencias en la técnica, determinar si el tiempo de desarrollo del color es igual en el patrón y en la muestra paciente y por último, descubrir si se está usando la correcta absorción máxima en el espectrofotómetro o los filtros adecuados en el colorímetro.

Actualmente en Venezuela, el costo de 10 ml de suero control para varios parámetros bioquímicos normales y anormales, se encuentra alrededor de los Bs.18.000, dependiendo del laboratorio fabricante, por lo que la preparación de sueros controles de excelente calidad a costos mas económicos, se hace necesario, y además, permitiría obtener una evaluación de los procedimientos llevados a cabo en un laboratorio y servirían como referencia permanente en los programas de Control de Calidad.

Para garantizar la calidad de los sueros patrones de referencia se suministran liofilizados; sin embargo, la conservación por largo tiempo depende del grado de humedad del mismo. Estos deben reconstituirse antes del uso añadiendo una cantidad precisa de agua destilada, pues de lo contrario, varían las concentraciones de los parámetros bioquímicos que se están evaluando.

Al analizar conscientemente el avance tecnológico que se ha logrado en el laboratorio, el Bioanálisis en Venezuela sigue huérfano del control y supervisión oficial, a esta realidad se suman las dificultades económicas del país que se reflejan en los programas de mantenimiento y suministro de insumos para el trabajo de los laboratorios. Si se facilitara la adquisición de sueros controles, los laboratorios tendrían a su disposición más herramientas para garantizar la calidad de los resultados provenientes de sus valores analíticos reportados, a la vez que ese instrumento también podría utilizarse para la eficiencia de los laboratorios.

Entre los distintos parámetros bioquímicos, la determinación de bilirrubina, es uno de los exámenes esenciales que se realizan desde un laboratorio de rutina hasta en los de referencia, para medir funcionamiento hepático. La bilirrubina conjugada o no conjugada sufre fotooxidación ó deshidrogenación transformándose en biliverdina o algún producto intermediario cuando son expuestas a la acción de la luz blanca, tanto si es artificial como si es de la luz. Las longitudes de onda entre 400 y 600 nm son más destructivas que la luz ultravioleta (U.V.), no teniendo ningún efecto en este sentido la luz roja (600nm). Se ha demostrado que el efecto in vitro depende del pH, de la presencia de albúmina, de metales y de agentes quelantes (3).

La bilirrubina del suero puede disminuir incluso en un 50%, al cabo de una hora de exposición a la luz del sol; incluso conservando las muestras en una zona sombría, se produce un deterioro significativo al cabo de 12 horas. Para conseguir una estabilidad óptima, es aconsejable simultáneamente la oscuridad y una baja temperatura (8, 9, y 14)

Existen varias técnicas para el aislamiento de la bilirrubina que pueden ser empleadas para la preparación de sueros patrones de dicha sustancia, entre las que se mencionan:

1. Aislamiento de bilirrubina de la bilis del cerdo (6)
2. La separación de pigmentos biliares del suero, bilis y orina (2).
3. Aislamiento de cristales de bilirrubina utilizando para ello carbono 14 (radioactivo) (12).
4. La separación de especies de bilirrubina en suero y bilis por cromatografía líquida en fase reversa (10, 11).

Uno de los métodos más utilizados es la extracción de bilirrubina utilizando bilis de cerdo, debido a que la producción y excreción de bilirrubina en el cerdo, debido a que la producción y excreción de bilirrubina en el cerdo son iguales a la del hombre. La actividad de la secreción biliar se manifiesta en el cerdo recién nacido por el hecho de que el volumen de bilis medido al sacrificar este animal es de 1-2ml. El volumen tiende a aumentar con la edad de forma que a las cinco semanas es mayor. La concentración de bilirrubina conjugada presente en hígado del cerdo es de 32 –61,5 mg/dl, en cambio la

concentración de la bilirrubina unida a las proteínas plasmáticas en el mismo es de 0,4 a 1,17 mg/dl (16).

En vista de que varios autores han logrado aislar bilirrubina a partir de bilis de cerdo, y tomando en consideración, que la determinación de bilirrubina es uno de los exámenes que se realiza con frecuencia y tiene menos control en el laboratorio clínico, se planteó la preparación del suero patrón de referencia para este parámetro, a partir de la bilis de cerdo, con el fin de utilizarlo como un suero de referencia para el control de calidad en el laboratorio clínico.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Evaluar la estabilidad de un suero control de bilirrubina preparado a partir del aislamiento de la misma de los pigmentos biliares del cerdo.

### **Objetivos Específicos**

1. Aislar pigmentos biliares de bilis porcina.
2. Purificar la bilirrubina extraída.
3. Preparar sueros controles de diferentes concentraciones para bilirrubina.
4. Evaluar la estabilidad del suero control mediante el estudio de su precisión.

## **METODOLOGIA**

### **Muestra**

Bilis de cerdo proveniente de la vesícula biliar del animal.

### **Procesamiento**

El proceso se llevó a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad de la Escuela de Bioanálisis en el Pabellón N°3.

### **Método de Extracción**

Siguiendo la técnica de Cole y Lathe (1953), los pigmentos se separan de muestras de bilis de cerdo por la adición de 70g de sulfato de amonio por cada 100 ml de bilis; la mezcla se agita vigorosamente, se centrifuga y se descarta el sobrenadante; luego los pigmentos y lípidos se separan de las proteínas y sales del sedimento por extracción con n-butanol:metanol (1:1 v/v), se re-extrae varias veces hasta obtener un sedimento casi incoloro. Al extracto se le aplica una corriente de nitrógeno a fin de eliminar el exceso de solvente, obteniéndose al final un rendimiento de 19,2 mg/dL de bilirrubina.

### **Método de Purificación**

El procedimiento empleado para la purificación, según Henry, Jacobs y Chiamori (1960), es como sigue: 19,2 mg/dl se disuelven en 38,4 ml de cloroformo, se mezclan durante 30 min, el material insoluble se remueve por filtración. La solución se lava 2 veces con porciones de 3,8 ml de bicarbonato de sodio al 5%. La fase cloroformica se filtra y la bilirrubina se extrae 2 veces con 3,8 ml de carbonato de sodio el cual contiene una pizca de hidrosulfito de sodio. La fase acuosa combinada con la emulsión que algunas veces aparece en la interfase de la capa de solventes se lava con 9,6 mL de cloroformo. Aproximadamente se le agregan 4,8 ml de agua para ayudar a la separación de las fases, y la porción acuosa se filtra. Después se diseca con sulfato de sodio y la solución se evapora con ayuda de una corriente de nitrógeno. Con este procedimiento se obtuvo un rendimiento de 8,9 mg/dl de bilirrubina.

Para conocer si el producto obtenido por los investigadores corresponde con el pigmento bilirrubina, se procedió a la realización de un espectro de absorción.

### **Utilización de una Matriz de Suero**

Se empleó suero humano libre de bilirrubina y de hemólisis. Se utilizó un pool de sueros en donde se eliminó la bilirrubina utilizando ondas U.V. (13).

### **Preparación del Suero Control**

Se utilizó la bilirrubina extraída y purificada, la cual se agregó por análisis a una matriz de suero, obteniendo así controles con concentraciones de 1,2 y 4 mg/dl. Por último,

esta preparación se liofilizó. Para el resultado final de los controles hay que tomar en cuenta ciertos parámetros como la humedad y los componentes de la matriz del suero.

### **Liofilización**

El proceso de liofilización se realizó en las instalaciones del Centro BIOMOLP (Centro de Biología Molecular de Parásitos).

Evaluación del suero control

Una vez liofilizados los sueros controles, se distribuyeron 48 viales de los mismos a diferentes concentraciones para cada uno de los distintos laboratorios clínicos participantes en el estudio, estos fueron el Laboratorio Clínico Cesar Sánchez Font (CSF) y el Laboratorio de Prácticas Profesionales de Bioquímica Clínica (PPBC) de la escuela de Bioanálisis-Valencia, junto con el lote se les entregó una tabla de registro y un instructivo.-

Los sueros controles de bilirrubina debieron ser evaluados en la rutina diaria del laboratorio durante 16 días consecutivos con un mínimo de 12 días, como si se tratara de la muestra de un paciente.

### **ANALISIS ESTADISTICO**

Para evaluar la estabilidad del suero control preparados, se calculó la media aritmética (para evaluar la exactitud), desviación estándar (para determinar la precisión del trabajo), coeficiente de variación (que evalúa la variabilidad) y la t de student para comparar los resultados obtenidos entre los laboratorios participantes.

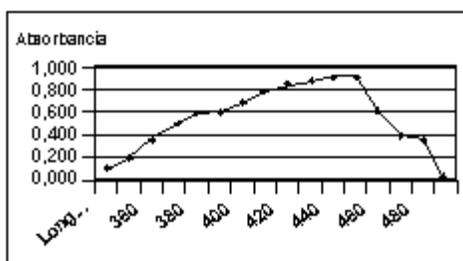
Para este análisis estadístico se empleó el programa Statgraphic versión 2.6. pc.

### **RESULTADOS**

Con la bilirrubina una vez purificada, se procedió a la realización de un espectro de absorción, observándose en el mismo, que al mayor pico (450nm) coincide con el bilirrubina (Gráfico No. 1).

Seguidamente se prepararon tres controles a diferentes concentraciones (1,2 y 4 mg/dl), que fueron comprobados antes de la liofilización, y luego se distribuyó al laboratorio para ser evaluados.

GRAFICO N° 1  
 ESPECTRO DE LA ABSORCIÓN DE LA BILIRRUBINA  
 PURIFICADA VALENCIA, 1998

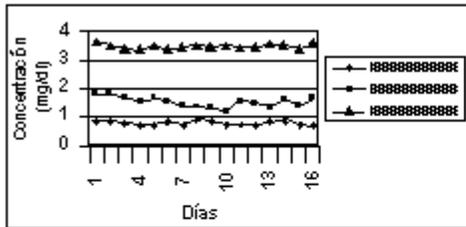


Longitud de Ond.	Absorbancia
350	0,100
360	0,200
370	0,350
380	0,520
390	0,580
400	0,600
410	0,690
420	0,780
430	0,840
440	0,860
450	0,920
460	0,910
470	0,600
480	0,430
490	0,340
500	0,040

**Fuente: Análisis de la Bilirrubina purificada**

El gráfico No. 2 presenta la información referente a la estabilidad en el tiempo de los valores de concentración de los sueros controles de bilirrubina liofilizados, donde se evidencia una pérdida de concentración del en el 22,23%, 17,65% y 2,7% de los controles 1, 2 y 3 respectivamente.

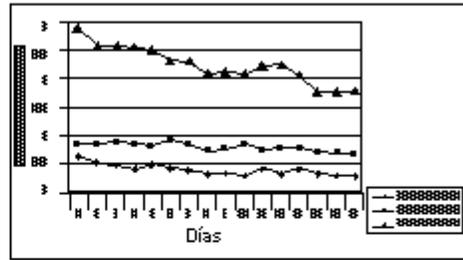
GRAFICO Nº 2  
ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE LOS VALORES DE  
CONCENTRACIÓN DE LOS SUEROS CONTROLES DE  
BILIRRUBINA LIOFILIZADOS.  
VALENCIA 1.998



3,5	1,7	3,6
3,5	1,7	3,5
3,4	1,6	3,4
3,6	1,4	3,6
3,6	1,7	3,6
3,6	1,6	3,6
3,6	1,4	3,6
3,5	1,4	3,5
3,6	1,4	3,6
3,6	1,2	3,5
3,6	1,6	3,6
3,6	1,6	3,6
3,6	1,6	3,6
3,6	1,4	3,6
3,4	1,7	3,4
3,5	1,4	3,5
3,6	1,6	3,6

Fuente: Análisis de los sueros controles de bilirrubina

GRAFICO Nº 3  
ESTABILIDAD EN EL TIEMPO DE LOS VALORES DE  
CONCENTRACIÓN DE LOS SUEROS CONTROLES DE  
BILIRRUBINA CONGELADOS.  
VALENCIA 1.998



2,8	0,9	2,8
2,6	0,9	2,6
2,6	0,9	2,6
2,5	0,8	2,5
2,5	0,8	2,5
2,3	0,9	2,3
2,3	0,8	2,3
2,1	0,7	2,1
2,1	0,7	2,1
2,1	0,8	2,1
2,3	0,7	2,3
2,3	0,7	2,3
2,1	0,7	2,1
1,8	0,6	1,8
1,8	0,6	1,8
1,8	0,6	1,8

Fuente: Análisis de los sueros controles de bilirrubina

Por otra parte, gráfico No. 3 se incluyen los resultados referentes a la estabilidad de los sueros controles congelados, que en promedio es del control No. 1 95,72%; n°2 33,34%, y del control n°3 35,72%, según los datos aportados por las determinaciones realizadas en el Laboratorio PPBC.

En el cuadro n°1 se presentan los valores promedios (X), desviación estandar (D.S) y el porcentaje del coeficiente de variación (%C.V.) de los sueros controles de bilirrubina analizados en el Laboratorio de Prácticas Profesionales de la Escuela de Bioanálisis, empleando el Kit comercial de WIENER (Método Manual). En el suero control n°1, la medida fue de 0,77mg/dl +/- 0,08 D.S., 11,2% C.V. y el rango correspondiente fue de 0,7 mg/dl; para el suero control n°2, la medida se ubicó en 1,47 mg/dl +/- 0,19 D.S., con un rango de 1,2 mg/dl a 1,7 y 12,9% C.V., mientras que para el suero control n° 3, los valores fueron 3,35 mg/dl +/- 0,31 de D.S., 9,2% de C.V. y un rango desde 3,0 mg/dl hasta 3,6 mg/dl.

**CUADRO N° 1**  
**DISTRIBUCIÓN DE LOS VALORES DE LOS SUEROS CONTROLES DE BILIRRUBINA ANALIZADOS**  
**EN EL LABORATORIO DE LAS PASANTÍAS PROFESIONALES DE LA ESCUELA**  
**DE BIOANÁLISIS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**VALENCIA. 1.998**

	<b>#Análisis</b>	<b>Media (mg/dL)</b>	<b>D.S. (mg/dL)</b>	<b>E.S.</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango (mg/dL)</b>	<b>C.V. (%)</b>
Suero control #1	16	0,77	0,08	0,02	0,75	0,2	11,2
Suero control #2	16	1,47	0,19	0,05	1,5	0,5	12,9
Suero control #3	16	3,35	0,31	0,08	3,35	0,7	9,2
Suero control comercial	16	5,11	0,1	0,02	5,1	0,3	2,1

D.S.= Desviación Estándar

E.S.= Error Estándar

C.V.= Coeficiente de Variación

Método= Kit Comercial WIENER

Fuente= Cálculos registrados a partir de los resultados de la Tabla de los Registros.

En el cuadro n°2 se puede observar la distribución de los valores de los sueros controles de bilirrubina analizados en el Laboratorio CSF, utilizando el Kit comercial Dimensión (método automatizado).

**CUADRO N° 2**  
**DISTRIBUCIÓN DE VALORES DE LOS SUEROS CONTROLES DE BILIRRUBINA ANALIZADOS**  
**EN EL LABORATORIO DE REFERENCIA "CÉSAR SÁNCHEZ FONT"**  
**VALENCIA. 1.998**

	<b>#Análisis</b>	<b>Media (mg/dL)</b>	<b>D.S. (mg/dL)</b>	<b>E.S.</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango (mg/dL)</b>	<b>C.V. (%)</b>
Suero control #1	16	0,17	0,85	0,02	0,15	0,2	47
Suero control #2	12	1,03	0,25	0,07	1,2	0,5	24,3
Suero control #3	16	1,59	0,47	0,12	1,59	1	29,5

D.S.= Desviación Estándar

E.S.= Error Estándar

C.V.= Coeficiente de Variación

Método= Kit Comercial Dimensión

Fuente= Cálculos realizados a partir de los resultados de la Tabla de los Registros.

**CUADRO N° 3**  
**DISTRIBUCIÓN DE VALORES DE LOS SUEROS CONTROLES CONGELADOS**  
**DE BILIRRUBINA ANALIZADOS EN EL LABORATORIO**  
**DE REFERENCIA "CÉSAR SÁNCHEZ FONT"**  
**VALENCIA. 1.998**

	#Análisis	Media (mg/dL)	D.S. (mg/dL)	E.S.	Mediana	Rango (mg/dL)	C.V. (%)
Suero control #1	16	0,19	0,12	0,03	0,15	0,29	63,2
Suero control #2	12	1,02	0,16	0,05	0,93	0,34	15,7
Suero control #3	16	1,79	0,49	0,12	1,85	1,3	27,3

D.S.= Desviación Estándar

E.S.= Error Estándar

C.V.= Coeficiente de Variación

Método= Kit Comercial Vitros

Fuente= Cálculos realizados a partir de los resultados de la Tabla de Registros.

En este cuadro, el suero control n°1 tiene el valor promedio de 0,17 mg/dl +/- 0,08 de desviación estándar D.S, 47% de coeficiente de variación C.V. y un rango que va de 0,1 mg/dl +/- 0,25 D.S., 24,3% C.V. y un límite mínimo de 0,7 mg/dl y un máximo de 1,2 mg/dl; en cambio para el suero control n°3 se observó un valor promedio de 1,59 mg/dl +/- 0,47 D.S., rango que va de 1,1 mg/dl a 2,1 mg/dl y un coeficiente de variación de 29,5%.

El valor promedio para el suero control n°1, fue de 0,19 mg/dl +/- 0,12 D.S. y un rango de 0,08 mg/dl y 0,37 mg/dl, para el control n°2, la media fue de 1,02 mg/dl +/- 0,16 D.S., un valor mínimo de 0,9 mg/dl y uno para el control n°3 el valor promedio fue de 1,79 mg/dl +/- 0,49 D.S., 27,3% C.V. y un rango de 1,08 mg/dl y 2,38 mg/dl. Estos valores corresponden a los sueros controles de bilirrubina analizados con kit comercial Vitros (Método Automarizado) en Laboratorios CSF (cuadro n°3).

## DISCUSION

Esta investigación se orientó a efectuar la preparación de un suero control a partir de la extracción del pigmento bilirrubina de la bilis del cerdo, con el objeto de evaluar la precisión en el tiempo, lo cual aún no había sido realizado en Venezuela.

Una vez extraída y purificada la bilirrubina, se realizó un espectro de absorción a fin de conocer si el pico de mayor absorbancia coincidía con el espectro característico de la bilirrubina (2) observándose un espectro similar.

Cuando se analizaron los resultados estadísticos se observó que había una diferencia significativa (al 95% confiabilidad), entre los valores promedio reportados por los diferentes laboratorios participantes en estudio, probablemente esto tenga su explicación en el incumplimiento de las normas para la manipulación de las muestras, la metodología utilizada en la determinación, el proceso de liofilización y la proliferación bacteriana por tratarse de muestras no estériles. Sin embargo, no se observó diferencia significativa al comparar (al 95% de confiabilidad) las medias resultantes de la evaluación realizada por el Laboratorio César Sánchez Font, empleando métodos automatizados. (Dimensión y Vitros).

Estudios previos realizados por Doumas y colaboradores en 1973, comprobaron que la bilirrubina es inestable a temperaturas superiores a 70°C, lo cual no es accesible para un laboratorio clínico.

Según la información aportada por esta investigación, se podría afirmar, que la inestabilidad de la bilirrubina en los controles congelados posiblemente se deba a ciertas causas como lo son los cambios de pH y la desnaturalización de la molécula de bilirrubina a pesar que estaban envasados en frascos ámbar (Gráfica N°3).

En los controles liofilizados se observó una pérdida menor de la concentración de bilirrubina, esto pudo deberse a que en el proceso de liofilización parte de la muestra quedó adosada al papel parafilm que cubre el envase. En los mismos también se corroboró que la liofilización es un proceso que ofrece una mayor estabilidad de las moléculas orgánicas en el tiempo, en comparación con los sueros controles congelados: esto último es posible mejorar usando Azida de Sodio o algún otro preservativo similar, en esta investigación no se pudo llevar a cabo debido al tiempo y al costo de la misma.

Si se compara los métodos de aislamiento de la bilirrubina descritos en la literatura con el aplicado en esta investigación, se puede notar que este último brinda no sólo mayor facilidad en la obtención de la muestra, sino también menor riesgo de contaminación, rapidez, bajo costo y un rendimiento de 19,2 mg/dL de bilirrubina.

El C.V para la bilirrubina utilizando métodos automatizados, según las encuestas interlaboratorio realizados por el Programa Nacional de Control de Calidad en el Reino

Unido son de 14,67% y 12,40% (15); en cambio los valores de los coeficientes de variación encontrados en esta investigación utilizando métodos automatizados (Dimensión, Vitros y Labtest) son de C.V 33,6%, C.V 35,4% y C.V 22% respectivamente.

Con relación a los métodos manuales existen diferentes valores de coeficiente de variación de acuerdo al método empleado; para la técnica de Malloy Evelyn en el C.V es 24,39% y en el caso de otros métodos Diazo es de C.V 15,98% (15), mientras que en este trabajo se obtuvo un valor promedio de C.V 11,1% (Wiener).

## CONCLUSIONES

1. El método de extracción y purificación utilizados en esta investigación no sólo brinda facilidad en la obtención de la muestra, sino también menor riesgo de contaminación, rapidez, bajo costo y buen rendimiento.
2. El proceso de liofilización es más efectivo para mantener la estabilidad de la bilirrubina en el tiempo que la congelación de las muestras en estudios, ya que la misma condujo a concentraciones significativamente mayores.
3. Si se evalúan las metodologías empleadas, la mayor precisión de análisis correspondió al método manual de Wiener (C.V. 11,1%).
4. La mayor imprecisión se observó en las determinaciones por métodos automatizados, obteniéndose coeficientes de variación de 33,6%, 35,44% y 22% los cuales corresponde a los Kit comerciales Dimensión, Vitros y Labtes respectivamente.
5. Para un nivel del 95% de confiabilidad se observó una diferencia significativamente al comparar los valores promedios de los sueros controles evaluados por los diferentes laboratorios; en cambio cuando se hizo la comparación entre las medias reportadas por el Laboratorio de Referencia César Sanchez Font, no se observó (al 95% de confiabilidad) diferencia significativa entre los mismos empleando métodos automatizados (Dimensión y Vitros).

En vista de que los laboratorios seleccionado para evaluar los sueros controles son laboratorios de referencia, y que los coeficientes de variación encontrados fueron elevados, se propone continuar de tiempo. evaluando la diferencia de los viales por un mayor período.

