

Bilirrubina Directa

Finalidad . Sistema bi-reactivo para la determinación de bilirrubina directa, por reacción de punto final, en muestras de suero y plasma.

Uso profesional.

[Solamente para uso diagnóstico in vitro.]

Principio . La muestra es solubilizada en medio ácido y la bilirrubina directa es medida por formación de azobilirrubina con dicloroanilina diazotada. El color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina directa en la muestra.

Características del sistema . Bili-D Liquiform es un conjunto de reactivos que permite un procedimiento sencillo y rápido para la determinación de la bilirrubina directa en muestras de suero o plasma. El Reactivo 1 contiene ácido sulfámico a una concentración optimizada que mantiene el pH en valores adecuados para minimizar la interferencia de la bilirrubina indirecta, garantizando la especificidad de la medición. El Reactivo 2 contiene dicloroanilina diazotada (DCA), que es un diazo-reactivo estable en forma líquida, listo para el uso.

Como las metodologías que utilizan mono-reactivos sufren interferencias de la muestra e incrementan la inexactitud de los resultados, Labtest Diagnóstica desarrolló una aplicación bi-reactivo con utilización de un blanco de muestra, que aumenta la especificidad metodológica y minimiza la interferencia de la muestra, transfiriendo excelente exactitud a los resultados.

El sistema Labtest permite que sean ensayadas muestras con concentraciones de bilirrubina directa de hasta 12 mg/dL, minimizando la necesidad de dilución de muestras con concentración elevada.

El desarrollo del método fue orientado hacia la automatización, tornándolo fácilmente aplicable en analizadores automáticos capaces de medir con exactitud una reacción de punto final a 546 nm. Además, el sistema Bili-D Liquiform puede ser utilizado con éxito en aplicaciones manuales utilizando fotómetros o instrumentos semi-automáticos.

Metodología . Labtest DCA

Reactivos

1. **R 1** - Reactivo 1 - Almacenar entre 2-8°C.

Contiene ácido sulfámico ≥ 92 mmol/L y estabilizadores.

2. **R 2** - Reactivo 2 - Almacenar entre 2-8°C.

Contiene ácido clorhídrico 680 mmol/L; dicloroanilina diazotada ≤ 995 μ mol.

Los reactivos no abiertos, almacenados en las condiciones indicadas, son estables hasta la fecha de expiración impresa en el rótulo. Los reactivos después de la apertura (en uso) son estables hasta por 60 días a 2-8°C. Durante su manipulación, los reactivos están sujetos a contaminaciones de naturaleza química y microbiana que pueden provocar reducción en su estabilidad.

Precauciones y cuidados especiales

Los cuidados habituales de seguridad deben ser aplicados en la manipulación de los reactivos, los que no deben ser pipeteados con la boca. Se debe tener cuidado para evitar su ingestión, y en caso de contacto con los ojos, se deben lavar inmediatamente con abundante cantidad de agua y procurar auxilio médico.

Material necesario y no provisto

1. Baño-maría mantenido a temperatura constante (37°C).
2. Fotómetro capaz de medir con exactitud absorbancias entre 530 y 550 nm.
3. Pipetas para medir muestras y reactivos.
4. Cronómetro.
5. Calibradores de la línea Calibra - Labtest.

Muestra

Se debe crear un Procedimiento Operacional Estándar (POE) que establezca procedimientos adecuados para la toma, preparación y almacenamiento de la muestra. Destacamos que los errores debidos a la muestra pueden ser mucho mayores que los errores ocurridos durante el procedimiento analítico.

Las bilirrubinas conjugada (directa) y no conjugada (indirecta) son oxidadas por acción de la luz blanca o ultravioleta. Por lo tanto, las muestras de sangre deben ser protegidas de la exposición directa a la luz artificial o solar inmediatamente después de su obtención.

Usar suero o plasma (Heparina, EDTA). Cuando la muestra es protegida de la luz, el analito es estable 4 días entre 2-8°C y 3 meses a 20°C negativos.

Las muestras hemolisadas dan valores falsamente disminuidos en la determinación de la bilirrubina directa.

Como ningún test conocido puede asegurar que las muestras de sangre no transmiten infecciones, todas deben ser consideradas como potencialmente infecciosas. Por lo tanto, al manipularlas, se deben seguir las normas establecidas para bioseguridad.

Para descartar los reactivos y el material biológico, sugerimos aplicar las normas locales, estatales o federales de protección ambiental.

Interferencias

Concentraciones de triglicéridos de hasta 1000 mg/dL no producen interferencias significativas.

La presencia de hemoglobina (muestra hemolisada), en cualquier concentración, interfiere en el resultado del ensayo.

Procedimiento

Este procedimiento no se aplica a analizadores semi-automáticos que utilizan únicamente cubeta de flujo. Están disponibles aplicaciones para sistemas automáticos y semi-automáticos.

Vea Observaciones 1, 2 y 3.

Tomar 3 cubetas del fotómetro y proceder como sigue:

	Blanco	Test	Calibrador
Reactivo 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Muestra	----	0,1 mL	----
Calibrador	----	----	0,1 mL
Agua desionizada	0,1 mL	----	----

Homogeneizar e incubar a baño-maría a 37°C durante 5 minutos. El nivel del agua en el baño debe ser superior al nivel de los reactivos en los tubos de ensayo. Determinar solamente la absorbancia del test y del calibrador a 546 nm (530 a 550 nm), ajustando el cero con agua desionizada. Se obtiene la absorbancia A_1 .

	Blanco	Test	Calibrador
Reactivo 2	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL

Homogeneizar e incubar en baño-maría a 37°C durante 5 minutos. Determinar las absorbancias del test y del calibrador a 546 nm (530 a 550 nm), ajustando el cero con el blanco. Se obtiene la absorbancia A_2 . El color es estable por 30 minutos.

El procedimiento sugerido para la medición es adecuado para fotómetros cuyo volumen mínimo de solución de lectura es igual o menor a 1,1 mL. Se debe verificar la necesidad de ajuste del volumen en el fotómetro utilizado. Los volúmenes de muestra y reactivos pueden ser modificados proporcionalmente sin perjuicio en el desempeño del ensayo, manteniéndose inalterado el procedimiento de cálculos. En caso de reducción de los volúmenes, es fundamental que se observe el volumen mínimo necesario para la lectura fotométrica. Volúmenes de muestra menores a 0,01 mL son críticos en aplicaciones manuales y deben ser usados con cautela porque aumentan la imprecisión de la medición.

Cálculos . Vea Linealidad.

La lectura A_1 del Test y del Calibrador debe ser corregida al volumen final de la reacción, obteniéndose A_{1cor} .

$$\text{Test } A_{1cor} = \text{Test } A_1 \times 0,81$$

$$\text{Calibrador } A_{1cor} = \text{Calibrador } A_1 \times 0,81$$

Para obtener la absorbancia final restar el valor de A_{1cor} de la absorbancia A_2 del Test y del Calibrador:

$$\text{Absorbancia del Test} = A_2 - A_{1cor}$$

$$\text{Absorbancia del Calibrador} = A_2 - A_{1cor}$$

$$\text{Bilirrubina directa (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbancia del Test}}{\text{Absorbancia del Calibrador}} \times \text{CCal}$$

CCal: concentración del calibrador

Ejemplo

Test

$$A_1 = 0,064$$

$$A_{1cor} = 0,064 \times 0,81 = 0,052$$

$$A_2 = 0,094$$

$$\text{Absorbancia del Test: } 0,094 - 0,052 = 0,042$$

Calibrador

$$\text{Ccal: } 1,93 \text{ mg/dL}$$

$$A_1 = 0,105$$

$$A_{1cor} = 0,105 \times 0,81 = 0,085$$

$$A_2 = 0,170$$

$$\text{Absorbancia del Calibrador: } 0,170 - 0,085 = 0,085$$

$$\text{Bilirrubina directa} = \frac{0,042}{0,085} \times 1,93 = 0,95 \text{ mg/dL}$$

Debido a la gran reproducibilidad que puede obtenerse con esta metodología, se puede utilizar el método del factor.

$$\text{FACTOR} = \frac{\text{Ccal mg/dL}}{\text{Absorbancia del Calibrador}}$$

$$\text{Bilirrubina directa (mg/dL)} = \text{Absorbancia del Test} \times \text{Factor}$$

Ejemplo

$$\text{Factor} = \frac{1,93}{0,085} = 22,7 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Bilirrubina directa (mg/dL)} = 0,042 \times 22,7 = 0,95 \text{ mg/dL}$$

Calibración . Utilizar los calibradores proteicos de la línea Calibra - Labtest.

Calibraciones manuales

Obtener el factor de calibración al usar un nuevo lote de reactivo o cuando el control interno de calidad lo indique.

Sistemas automáticos

Blanco de reactivos: agua desionizada o NaCl 150 mmol/L (0,85%).

Intervalo de calibraciones

Calibración en 2 o 3 puntos al cambiar de lote;

Calibración en 2 o 3 puntos cuando el control interno de calidad lo indique.

Linealidad

El resultado de la medición es lineal hasta 12 mg/dL. Para valores mayores a 12 mg/dL, diluir la muestra con NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar una nueva medición y multiplicar el resultado obtenido por el factor de dilución. Sugerimos la verificación de la linealidad metodológica y fotométrica al menos semestralmente, utilizando muestras con valores de hasta 12 mg/dL.

Control interno de la calidad . El laboratorio debe mantener un programa de control interno de calidad que defina con claridad los reglamentos aplicables, objetivos, procedimientos, criterios para especificaciones de la calidad y límites de tolerancia, acciones correctivas y registro de las actividades. Controles deben ser utilizados para evaluar la imprecisión e desviaciones de calibración. Se sugiere que las especificaciones para el coeficiente de variación máximo y el error total sean basados en los componentes de la variación biológica (VB)^{5,7}.

Se sugiere utilizar las preparaciones estandarizadas de los productos de la línea Qualitrol - Labtest, para control interno de la calidad en ensayos de química clínica.

Intervalo de referencia . Los intervalos deben ser usados sólo como orientación. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores de referencia en la población atendida.

Neonatos⁸

Bilirrubina Directa	hasta 0,4 mg/dL
Bilirrubina Total	1 día: hasta 5,1 mg/dL
	1 a 2 días: hasta 7,2 mg/dL
	3 a 5 días: hasta 10,3 mg/dL

Niños, Adolescentes y Adultos

Bilirrubina Directa	hasta 0,4 mg/dL
Bilirrubina Total	hasta 1,2 mg/dL

Conversión: Unidades Convencionales (mg/dL) x 17,1 = Unidades SI (µmol/L)

Características de desempeño⁹

Exactitud . En muestras con concentraciones conocidas de bilirrubina directa fueron añadidas diferentes cantidades del analito, obteniéndose recuperaciones de entre 99 y 102%. El error sistemático proporcional medio obtenido a un valor de 1,4 mg/dL fue igual a 0,01 mg/dL o 0,7%.

Estudios de comparación de métodos . El método propuesto fue comparado con método de tecnología similar, obteniéndose los siguientes resultados:

	Método Comparativo	Método Labtest
Número de muestras	20	20
Intervalo de concentraciones (mg/dL)	0,14 - 18,7	0,15 - 17,2
Media des las estimaciones (mg/dL)	3,36	3,28
Ecuación de regresión	Método Labtest = 0,927 Comparativo + 0,168 mg/dL	
Coefficiente de correlación	0,999	
Error sistemático medio (mg/dL)	0,08	

Fueron confirmados errores sistemáticos iguales a 4,7% y 5,5% en los niveles de decisión de 1,4 mg/dL y 9,0 mg/dL, respectivamente. Confirmase la hipótesis nula de que las diferencias entre el método Bili-D Liquiform y el método comparativo no se desvían en más que el desvío provocado por las imprecisiones inherentes, caracterizando la identidad o relación funcional entre los métodos.

Los errores totales (error aleatorio + error sistemático) estimados en los niveles de decisión 1,4 e 9,0 mg/dL son 6,4% y 7,2%. Así siendo, Bili-D Liquiform es substancialmente equivalente al método comparativo. El coeficiente de correlación (0,999) confirma la fuerza de la relación entre los métodos.

Repetitividad - Imprecisión intra-ensayo

	N	Media	DE	CV (%)
Muestra 1	20	0,32	0,009	2,76
Muestra 2	20	1,96	0,009	0,47
Muestra 3	20	8,91	0,027	0,30

Reproducibilidad - Imprecisión total

	N	Media	DE	CV (%)
Muestra 1	20	0,32	0,009	2,86
Muestra 2	20	1,96	0,020	1,02
Muestra 3	20	8,91	0,094	1,05

Sensibilidad metodológica . El límite de detección fotométrica es de 0,02 mg/dL, correspondiendo a una absorbancia igual a 0,001.

Efectos de la dilución de la matriz . Muestras con valores iguales a 5,8 y 9,6 mg/dL fueron utilizadas para evaluar la respuesta del sistema a las diluciones de la matriz con NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando diversos factores de dilución correspondientes a 1:2, 1:4 se determinó una recuperación media del 105%.

Significancia clínica . Algunas enfermedades adquiridas y hereditarias y diversos medicamentos son capaces de afectar una o más etapas involucradas en la producción, captación, almacenamiento, metabolismo y excreción de la bilirrubina. Dependiendo del disturbio, la bilirrubina no conjugada (indirecta), la conjugada (directa) o ambas (total), son las principales contribuyentes de la hiperbilirrubinemia.

Las causas más comunes de aumento de bilirrubina directa son las enfermedades hepatobiliares y la obstrucción del árbol biliar (colestasis). En realidad, ambas bilirrubinas están aumentadas y se puede observar una variación amplia de las concentraciones séricas de cada forma de bilirrubina. La hepatitis y la cirrosis son ejemplos de dolencias que pueden causar colestasis intra-hepática. La colestasis puede también ser inducida por medicamentos y hormonas esteroideas. La obstrucción extra-hepática del árbol biliar debida a carcinoma o fibrosis de cabeza del páncreas, carcinoma o constricciones del canal biliar común y coledocolitiasis, producen concentraciones séricas aumentadas de bilirrubina directa.

Observaciones

1. La limpieza y secado adecuados del material utilizado son factores fundamentales para la estabilidad de los reactivos y obtención de resultados correctos.

2. El laboratorio clínico tiene como objetivo fornecer resultados exactos y precisos. La utilización de agua de calidad inadecuada es una causa potencial de errores analíticos. El agua utilizada en el laboratorio debe tener la calidad adecuada para cada aplicación. Así, para preparar reactivos y usar en las mediciones y para su uso en enjuague final de la vidriería, debe tener resistividad ≥ 1 megaohm.cm o conductividad ≤ 1 microsiemens/cm y concentración de silicatos $< 0,1$ mg/L. Cuando la columna desionizadora está con su capacidad saturada, se produce agua alcalina con liberación de varios iones, silicatos y sustancias con gran poder de oxidación o reducción que deterioran los reactivos en pocos días o incluso horas, alterando los resultados de modo imprevisible. Por lo cual es fundamental establecer un programa de control de la calidad del agua.

3. Para una revisión de las fuentes fisiopatológicas y medicamentosas de interferencia en los resultados y en la metodología, se sugiere consultar: www.fxol.org/

Referencias

1. Rand RN, di Pasqua A. Clin. Chem. 1962; 06:570-8.
2. Perlman FC, Lee RTY. Clin. Chem. 1974, 20:447-453.
3. Poon R; Hinberg IH. Clin. Chem. 1985, 31:92-94.
4. Tietz. Textbook of Clinical Chemistry, Burtis CA.; Ashwood ER. eds, 2ª edición, Philadelphia: WB. Saunders Co, 1994.
5. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponível em: <<http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170>> (acesso em 04/2006).

6. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm> (acesso em 23/10/07).
7. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica. 2005.
8. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC: Pediatric Reference Ranges, 5a. edição, Washington: AACC Press, 2005: 42-43.
9. Labtest: Dados de Arquivo.

Presentación

Producto	Referencia	Contenido	
Bili-D Liquiform	93-1/104	R1	1 X 80 mL
		R2	2 X 12 mL
Bili-D Liquiform Labmax 560/400	93-4/44	R1	4 X 35 mL
		R2	4 X 9 mL

Para obtener información sobre otras presentaciones comerciales, visite www.labtest.com.br o comuníquese con el Servicio al Cliente (Customer Service).

El número de pruebas para sistemas automáticos depende de los parámetros programados.

Consulte disponibilidad de aplicaciones con el Servicio al Cliente (Customer Service)

Informaciones al consumidor

[Términos y Condiciones de Garantía]

Labtest Diagnóstica garantiza el desempeño de este producto, dentro de las especificaciones, hasta la fecha de expiración indicada en los rótulos, siempre que los cuidados de utilización y almacenamiento indicados en los rótulos y en estas instrucciones, sean seguidos correctamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296 / 0001 - 38
 Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP 33240-152
 Lagoa Santa - Minas Gerais Brasil - www.labtest.com.br

Customer Service | e-mail: customerservice@labtest.com.br


Edición: Octubre, 2004
 Revisión: Enero, 2021
 Ref.: 280122(01)

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
 Reproducción bajo previa autorización

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with ivd devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Tóxico Tóxico Poison
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Reagente Reactivo Reagent
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control
	Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control
	Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Periodo após abertura Periodo post-abertura Period after-opening		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before		

Ref.: 140214 |