MEDICA

REF 10207-4 4 x 29 mL/8 mL

BILIRRUBINA TOTAL (TBIL)

Cada compartimiento contiene una cantidad utilizable de 29 mL de reactivo R1 de reactivo R1 y 8 mL de reactivo R2.

USO PREVISTO

El reactivo de bilirrubina total EasyRA se utiliza para la determinación cuantitativa de la Bilirrubina Total (TBIL) en suero humano de adultos, mediante el "Analizador químico MEDICA EasyRA" en laboratorios clínicos. Las mediciones de bilirrubina se usan para el diagnóstico y tratamiento de trastornos del hígado, hemolíticos, hematológicos y metabólicos, incluyendo hepatitis y bloqueo de la vesícula biliar.
Utilizar únicamente para diagnóstico *in-vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La bilirrubina es un pigmento de la hemoglobina y se encuentra presente en el suero como resultado de la destrucción de células rojas. El aumento de los valores de bilirrubina pueden ser un resultado de procesos hemolíticos, enfermedades del hígado o trastornos del tracto biliar. La bilirrubina existe en dos formas; no conjugada (indirecta) y conjugada (directa). La bilirrubina no conjugada es transportada al hígado donde es ligada a través de la albúmina, se convierte en conjugada (directa) con ácido glucorónico y es eventualmente excretada. La bilirrubina no conjugada no es soluble en solución acuosa y requiere de alcoholes y otros solventes para su solubilización. Los ensayos que involucran estas clases de solventes brindan la cantidad total de bilirrubina. Los conjugados de bilirrubina mono y diglucurónido son solubles en agua, ensayos de esta clase miden la bilirrubina directa. El método tradicional involucra la reacción de la bilirrubina con un reactivo diazo (por ejemplo, sal de 2,4-diclorofenil diazonio) para formar el compuesto cromóforo azobilirrubina. Se agregaron varios aditivos, como etanol,[1] cafeína[2] y DMSO[3] para acelerar la reacción y formación del compuesto azobilirrubina. También se incluyeron surfactantes como agentes solubilizantes.[4]

PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

Este método de reacción de punto terminal mide la bilirrubina total (conjugada y no conjugada) ligada a la sal de 2,4-diclorofenil diazonio en presencia del surfactante para formar la azobilirrubina.

Bilirrubina total + 2,4-diclorofenil diazonio $\xrightarrow{\text{Surfactante}}$ Azobilirrubina

El aumento en la absorbancia a 550 nm es directamente proporcional a la concentración de Bilirrubina total en la muestra.

REACTIVOS

Reactivo TBIL (R1):

NaCl	154 mmol/L
HCL	190 mmol/L
Surfactantes y conservantes	

Reactivo TBIL (R2):

HCL	417 mmol/L
Sal de 2,4-diclorofenil diazonio	5 mmol/L

Surfactante

Precauciones

1. Se deben seguir buenas practicas de seguridad en el laboratorio cuando se manipula cualquier reactivo. (*NCCLS*, GP17-A2).
2. Los reactivos (R1 y R2) son soluciones ácidas. NO las inhale ni las ingiera, y evite cualquier contacto con la piel y los ojos. En caso de contacto con los ojos, lave con abundante agua y vea a un médico. En caso de contacto con la piel, lave inmediatamente con agua durante 10 minutos. En caso de ingestión, vea a un médico inmediatamente.
3. Como en todos los casos de procedimientos de evaluación de diagnóstico, los resultados se deben interpretar teniendo en cuenta todos los otros resultados de las evaluaciones y el estado clínico del paciente.
4. No utilice cubetas lavadas.

Instrucciones para la manipulación, el almacenamiento y la estabilidad de los reactivos

VIDA UTIL: 24 MESES

El reactivo está listo para usar. El reactivo que no fue abierto es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta si se almacena a 2º - 8º C. El reactivo es estable una vez cargado en el área refrigerada para reactivos del Analizador químico Medica EasyRA por la cantidad de días programados en el chip RFID que se encuentra en el compartimiento del reactivo. Si el analizador no tiene la opción de refrigeración, los reactivos se deben cerrar y guardar a 2º - 8º C después de su utilización. No use el reactivo si se encuentra turbio o nebuloso o si no logra obtener valores de control de suero conocidos.

RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA/ESTABILIDAD
Se debe utilizar suero claro y no hemolizado. Aleje las muestras del sol directo y de la luz artificial ya que la bilirrubina directa (conjugada) es inestable.[5] Este ensayo se debe realizar dentro de las 2 horas de la recolección debido a que la bilirrubina en la muestra es inestable. Si las muestras no se pueden analizar dentro de este límite de tiempo, guárdelas hasta 3 días a 2º - 8º C.[6] Las muestras solo se pueden guardar por 3 meses a -70º C.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados
Compartimiento de reactivo TBIL (Medica TBIL Reagent Wedge), REF 10207

Materiales adicionales necesarios

Medica EasyCal Chemistry, REF 10651
Medica EasyQC Chemistry – Nivel A, REF 10791 *o*
Medica EasyQC Chemistry/Electrolytes – Nivel A, REF 10793
Medica EasyQC Chemistry – Nivel B, REF 10792 *o*
Medica EasyQC Chemistry/Electrolytes – Nivel A, REF 10794
Método de diagnóstico Dye Test – Medica Precision Test Dye Wedge, REF 10764
Medica Cleaner Wedge – Chemistry & ISE, REF 10760 *o*
Medica Cleaner Wedge – Chemistry, REF 10761

Instrucciones de uso
El reactivo está listo para usar. Retire la tapa del reactivo y colóquelo en la bandeja para el reactivo del Analizador químico Medica EasyRA ubicada en el área refrigerada de los reactivos. Una vez en el compartimiento, la estabilidad del reactivo (máximo 28 días) se programa en el chip RFID del compartimiento de reactivos.

Nota: verifique que no haya espuma en la parte interna del cuello del compartimiento después de retirar las tapas y colocar el compartimiento en el analizador. Si encuentra espuma, retírela con un hisopo o una pipeta desechable antes de realizar el análisis. Utilice distintos hisopos o pipetas desechables para los R1 y R2.

Calibración
Se recomienda Medica EasyCal Chemistry, REF 10651 para la calibración del ensayo. El intervalo de calibración (máximo 7 días) se programa en el chip RFID del compartimiento de reactivos. La calibración es necesaria cada vez que hay un cambio en el lote del reactivo o si ocurre un cambio en los valores de control de calidad.

Control de calidad
Se recomienda llevar a cabo dos niveles de control del suero humano (normal y anormal) en el ensayo al menos una vez cada 8 horas y con cada cambio de lote del reactivo. Si en el ensayo del material de control no se obtienen los rangos de valores correctos, esto es indicador de deterioro del reactivo, un mal funcionamiento del instrumento o errores de procedimiento. Cuando se utilizan materiales de control de calidad, el laboratorio también debe cumplir con las normas de control de calidad locales, estatales y federales.

Resultados
Al terminar el ensayo, el analizador químico Medica EasyRA calcula la concentración de bilirrubina total de la proporción de la absorbancia corregida de la muestra desconocida con la absorbancia corregida del calibrador multiplicada por el valor del calibrador.

$$\text{TBIL (mg/dL)} = \frac{[(A_{U_{550}} - A_{U_{600}}) - (A_{RBlk_{550}} - A_{RBlk_{600}})] - [(A_{U_{550}} - A_{U_{600}})_{SBlk} - (A_{RBlk_{550}} - A_{RBlk_{600}})_{SBlk}] \times dF}{[(A_{C_{550}} - A_{C_{600}}) - (A_{RBlk_{550}} - A_{RBlk_{600}})] - [(A_{C_{550}} - A_{C_{600}})_{SBlk} - (A_{RBlk_{550}} - A_{RBlk_{600}})_{SBlk}] \times dF} \times \text{Valor Cal}$$

Donde A_U y A_C son los valores de la absorbancia desconocidote la muestra desconocida y del calibrador, respectivamente, A_{RBlk} es la absorbancia del blanco del reactivo, S_{Blk} es el blanco de la muestra y "Valor Cal" es la concentración de bilirrubina total en el calibrador (mg/L). Como el volumen de la reacción cambia al agregar más tarde el reactivo R2, existe un factor de corrección de dilución (dF) que se incluye en el cálculo.

El blanco de la muestra se corrige debido a la diferencia del factor de dilución introducido al usar R1 vs. (R1 y R2) por medio de la siguiente ecuación:

$$df = \frac{\text{Reac}_1 \text{ Vol} + \text{Volumen diluido} + \text{Volumen de la muestra}}{\text{Volumen total}}$$

Valores esperados[10]
El rango de referencia para la TBIL en suero es el siguiente:

Adulto: 0,2 - 1,0 mg/dL

Se sugieren estos valores solamente como referencia. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores normales debido a las diferencias que existen entre los instrumentos, los laboratorios y la población local.

Limitaciones en los procedimientos (por ejemplo: si la muestra está por encima del rango del ensayo)
Sólo se deben utilizar muestras de suero no hemolizado. Esta prueba no se ha evaluado en neonatos.

El Analizador químico Medica EasyRA marca cualquier resultado por encima de 20 mg/dL como Alta Linealidad "LH". Si el operador selecciona el icono "Re-run", se puede volver a probar la muestra usando la mitad (1/2) del volumen de muestra. Los resultados de los análisis repetidos se calculan para que reflejen el uso de un volumen inferior de muestra. Esto aumentará efectivamente el rango a reportar del análisis de TBIL a 40 mg/dL.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO[9]

Rango a reportar
El rango a reportar es de 0,08 a 20 mg/dL. El rango extendido es de 0,08 a 40 mg/dL cuando se utiliza la mitad de la muestra (dilución 1:1).

Inexactitud/Correlación (NCCLS, EP9-A2)
La tabla a continuación detalla los datos obtenidos en una comparación sobre el rendimiento del reactivo Medica para TBIL (y) en el Analizador químico Medica EasyRA con un reactivo similar para TBIL (x) en el Analizador Roche COBAS MIRA. Los datos que se muestran a continuación representan determinaciones únicas obtenidas en el Analizador químico Medica EasyRA vs. el promedio de 2 valores replicados obtenidos en el analizador Roche COBAS MIRA.

Número de muestras	65	Rango de muestras	0,05 hasta 19,8 mg/dL
Pendiente	1,0043	Intercepto con y	-0,1966
Coeficiente de correlación	0,9957	Ecuación de regresión:	Y = 1.0043*X – 0,1966

Imprecisión (NCCLS, EP5-A2).
Las medidas duplicadas de cada uno de los tres niveles del material de control de calidad se analizaron dos veces al día durante 20 días. Tanto la precisión dentro de la corrida como la precisión total fueron determinadas a partir de estos datos.

Dentro de la imprecisión corriente:

Nivel del control de calidad mg/dL	Dentro de la depleción de sustrato actual mg/dL	Dentro del CV %
3,36	0,02	0,67
1,66	0,02	1,13
0,44	0,01	2,64

Imprecisión total:

Nivel del control de calidad mg/dL	Imprecisión total de depleción de sustrato mg/dL	Imprecisión total del CV %
3,36	0,05	1,35
1,66	0,03	2,09
0,44	0,02	3,81

Linealidad (NCCLS, EP6-A)[9]
Lineal desde 0,08 a 20 mg/dL, con base en la regresión lineal Y = 0.98*X + 0,0921.

Límite del blanco (LOB):	0,04 mg/dL	(NCCLS, EP17-A)
Límite de detección (LOD):	0,06 mg/dL	(NCCLS, EP17-A)
Límite de cuantificación (LoQ):	0,05 mg/dL	(NCCLS, EP17-A)

Sustancias de interferencia (NCCLS, EP7-A)
Menos del 10% de interferencia fue clasificado como "interferencia no significativa".
Existe una interferencia significativa a niveles de hemoglobina sobre 125 mg/dL.
Existe una interferencia significativa de los triglicéridos. No use muestras lipímicas.

Young provee una lista de drogas y otras sustancias que interfieren con los análisis de química clínica.[7]

REFERENCIAS

1. Malloy H.T. and Evelyn, K.A., *The Determination of Bilirubin with the Photoelectros Colorimeter*., J.Biol. Chem 119:481-490 (1973).
2. Jendrassik, L and Grof.P. *Vereinfachte, Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blubilirubins*, Bichem. A. 297: 81-89 (1938)
3. Walters, M. and Gerarde, H. *An Ultramicromethod for the Determination of Conjugated and Total Bilirubin in Serum or Plasma*. Microchem. J. 15:231-243 (1970).
4. Winsten, J. and Cehelyk, B., *A Rapid Micro Diazo Technique for Measuring Total Bilirubin*., Clin. Chem. Acta 25: 441-446 (1969).
5. Henry, RJ. *Clinical Chemistry, Principles and Technics,* Haggerstown, MD: Harper and Row, Publishers 1974:1058.
6. Tietz NW. *Textbook of Clinical Chemistry*, WB Saunders and Co., Philadelphia, PA, 1986: p1388.
7. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4th ed. Washington, DC. AACC Press, 1995.
8. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC. AACC Press, 1997.
9. Datos de los archivos de Medica.
10. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds),Tietz Textbook or Clinical Chemistry, 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994
11. NCCLS EP9-P
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, *User Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices* (NCCLS) Document EP5-T2 (ISBN 1-56238-145-8), 1992.

Parámetros del ensayo (TBIL) EasyRA

Longitud de onda primaria (nm)	550
Longitud de onda secundaria (nm)	600
Tipo de reacción	Punto terminal (2)
Dirección de la reacción	Aumento
Blanco del reactivo	Sí (con cada calibración)
Blanco de la muestra	Sí
Tiempo de reacción	5,6 min
Intervalo de calibración (máximo)	7 días
Estabilidad integrada del reactivo	28 días

Suero

Volumen de la muestra (µl)	8,0
Volumen del diluyente 1 (µl)	15
Volumen del diluyente 2 (µl)	15
Volumen del reactivo R1 (µl)	150
Volumen del reactivo R2 (µl)	38
Puntos decimales (valores predeterminados)	2
Unidades (valores predeterminados)	mg/dL
Factor de dilución para extender el rango de medición	1:1
Linealidad	0,08 hasta 20 mg/dL.

Medica Corporation, 5 Oak Park Drive
Bedford, MA 01730-1413 USA

EC REP Emergo Europe, Molenstraat 15
NL-2513 BH The Hague, The Netherlands