

EVALUACION DEL FUNCIONAMIENTO DE UN METODO PARA DETERMINACION DE BILIRRUBINA TOTAL Y DIRECTA

La bilirrubina, compuesto de degradación de la hemoglobina, es un metabolito utilizado habitualmente para estudiar el funcionamiento hepático.

Si bien se ha contado desde hace años con métodos de probada utilidad, la necesidad de adaptar las técnicas a analizadores automáticos en forma sencilla y con reactivos estables, llevó a la búsqueda de nuevas formulaciones. El empleo de diclorofenildiazonio (DPD) permite la elaboración de un reactivo estable y sencillamente adaptable a técnicas automáticas.

En el presente trabajo se evalúa la performance de un método que se basa en la utilización de este compuesto, verificando su linealidad, precisión y estabilidad.

Sara, M.L. y Capriotti, G.A.

Wiener Laboratorios S.A.I.C., Riobamba 2944, 2000 Rosario, Santa Fe, Argentina

Fax: (54-341) 4323200 - E-mail: cibio@satlink.com

Materiales y Métodos

Los kits en estudio, *Bilirrubina Total AA* y *Bilirrubina Directa AA* Wiener lab., se basan en el uso de la reacción de la bilirrubina con una sal de diclorofenildiazonio para formar un azocompuesto rojo, cuya absorbancia se mide en espectrofotómetro a 520-550 nm. Ambos kits contienen dos reactivos, Reactivo 1 y Reactivo 2, con los que se prepara el Reactivo de Trabajo por simple reconstitución del Reactivo 2 con la cantidad apropiada de Reactivo 1. También contiene un Reactivo para Blanco de Muestra.

Para llevar a cabo la presente evaluación se realizaron los ensayos en analizadores automáticos Express plus (Chiron Diagnostics) y Wiener lab.

Vitalab Selectra 2 (Vital Scientific), utilizando sueros control y calibrador comerciales (Standatrol S-E 2 niveles y Calibrador A plus Wiener lab.) como muestras, procesándolos de acuerdo a las instrucciones para el empleo de los kits evaluados en cada analizador.

Linealidad

Se ensayaron por duplicado diluciones sucesivas de una muestra de 20 mg/dl de Bilirrubina total. Se analizó la correlación (medida por r), entre los valores obtenidos y los esperados matemáticamente según la dilución. El ensayo se realizó en Express plus y Wiener lab. Vitalab Selectra 2.

Precisión interensayo

Se evaluó en distintos días para dos muestras con dos niveles de Bilirubi-

na total (BT) y directa (BD). Los ensayos fueron realizados en Wiener lab. Vitalab Selectra 2. Se calculó la Media, Desvío Standard (DS) y Coeficiente de Variación (CV) para la evaluación de los resultados.

Precisión intraensayo

Se realizaron replicados sucesivos en analizadores Express plus y Wiener lab. Vitalab Selectra 2, a dos muestras con dos niveles diferentes de Bilirrubina directa y total. Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos, calculándose Media, Desvío Standard y Coeficiente de Variación.

Estabilidad

Para estudiar la estabilidad de los reactivos en evaluación, se efectuaron los siguientes ensayos:

Bilirrubina Total

a) Se colocó el Reactivo de Trabajo a 37°C. A los 7 días se ensayó, usando como referencia un Reactivo de Trabajo recién preparado y refrigerado. Se procedió a ensayar ambos reactivos en analizador automático, calibrando con Calibrador A Plus Wiener lab., y utilizando como muestras Controles normales, patológicos y sueros o plasmas frescos.

b) Se colocó el Reactivo de Trabajo en heladera. A los 30 días se ensayó usando como referencia el Reactivo de Trabajo recién preparado y refrigerado. Se procedió de manera idéntica que en a).

Bilirrubina directa

a) Se colocó el Reactivo de Trabajo a 37°C. A los 3 días se ensayó usando como referencia un Reactivo de Trabajo recién preparado y refrigerado. Se procedió a ensayar ambos reactivos en analizador automático, calibrando con Calibrador A Plus Wiener lab., y utilizando como muestras Controles normales, patológicos y sueros o plasmas frescos.

b) Se colocó el Reactivo de Trabajo en heladera. A los 30 días se ensayó usando como referencia el Reactivo de Trabajo recién preparado y refrigerado. Se procedió de manera idéntica que en a).

Resultados

Linealidad

En el siguiente cuadro se resumen los coeficientes de correlación (r) resultantes entre los valores medios obtenidos en Express plus (VME) y Wiener lab. Vitalab Selectra 2 (VMS2) y los valo-

res esperados (VE) obtenidos matemáticamente según la dilución.

VE (mg/dl)	VME (mg/dl)	VMS2 (mg/dl)
20	23,79	21,06
15	17,22	15,31
10	11,61	10,60
5	5,88	5,68
r	0,99	0,99

Precisión interensayo

En el siguiente cuadro se han resumido los resultados obtenidos en Wiener lab. Vitalab Selectra 2. En el mismo, «n» es el número de repeticiones realizadas, Media BT el promedio de los valores obtenidos para Bilirrubina total y las expresiones DS BT y CV BT indican su desviación standard y su coeficiente de variación respectivamente. Media BD, DS BD y CV BD corresponden a los mismos parámetros aplicados a Bilirrubina directa.

Controles	SE-1	SE-2
n	10	10
Media BT	0,658	6,26
DS BT	0,021	0,137
CV BT	3,2%	2,2%
Media BD	0,18	1,096
DS BD	0,01	0,05
CV BD	6,0%	4,9%

Precisión intraensayo

Luego del análisis estadístico de los datos obtenidos, resultaron los siguientes valores para Media, Desvío Standard y Coeficiente de Variación:

Precisión intraensayo	Nivel Normal		Nivel Patológico	
	Express plus	Selectra 2	Express plus	Selectra 2
n	19	11	15	11
Media BT	0,63	0,56	8,81	9,09
DS BT	0,0065	0,0072	0,0753	0,0450
CV BT	1%	1%	0,85%	0,5%
Media BD	0,18	0,176	0,96	1,09
DS BD	0,0065	0,0080	0,0070	0,0160
CV BD	3,6%	4,5%	0,7%	1,5%



Fundación Wiener lab.

“Al servicio de la bioquímica por la salud del hombre”

Nuevos Asesores

Cumpliendo con el objetivo de llegar a todos los puntos del país, la Fundación Wiener lab. ha nombrado tres nuevos asesores:

Dra. Susana Ferrero en la ciudad de Corrientes, y **Dras. Delia Reyes** y **Graciela Khouri** en la ciudad de Tucumán.

Esta Fundación les desea éxitos en su función y agradece su compromiso.

Cursos

✓ **Actualización en Gastroenterología**
Dras. Berta Casabuena y **Mabel D'Arrigo**
San Juan - 22 y 23 de Junio

✓ Tiroides

Dra. Irene Rosillo y **Dr. Ricardo Parma**
Jujuy - 27 y 28 de Julio

✓ Diarreas

Dras. Leonora Kozubsky, Ana María Borsa y **Silvana Giugno**
Jujuy - 24 y 25 de Agosto

✓ Hipertensión y Embarazo

Dras. Norma Ferrari, María del Carmen Maselli y **Gabriela Ruibal**
Neuquén - 7 y 8 de Setiembre

✓ Lípidos

Dra. Ana María Paglione
Ushuaia - 14 y 15 de Setiembre

✓ Antibacterianos

Dras. Luisa Fernández y **María Cristina Guardatti**
Corrientes - 14 y 15 de Setiembre

Informe de los cursos: Fundación Wiener lab. - Suipacha 2140 2000 - Rosario, Argentina
Tel: 0341-4329191 int. 215 (Sra. Noris La Valle).

Estabilidad

Luego de someter el Reactivo de Trabajo a distintas temperaturas y seguir su comportamiento a lo largo del tiempo, se observó que luego de 30 días refrigerado, los resultados obtenidos eran similares a los de un Reactivo de Trabajo recién preparado.

Lo mismo sucedió luego de 3 días a 37°C para Bilirrubina directa y 7 días a 37°C para Bilirrubina total.

Estabilidad en uso («on board»)

Los resultados obtenidos para Bilirrubina Total AA en Wiener lab. Vitalab Selectra 2 y en Express plus se muestran en los Cuadros 1 y 2 respectivamente.

En cada caso, las condiciones del ensayo fueron las siguientes:

- Wiener lab. Vitalab Selectra 2: el reactivo permaneció destapado dentro del analizador durante el período de ensayo. Se realizó una recalibración a los 26 días y un reblanqueo cada 3 días durante este período. Luego se realizó una recalibración y reblanqueo cada 10-12 días.
- Express plus: el reactivo permaneció

destapado dentro del analizador durante 8 horas diarias, guardándose luego refrigerado hasta el siguiente día. En

estas condiciones se lo ensayó durante 32 días. Se realizó una recalibración y reblanqueo a los 20, 25 y 32 días.

Cuadro 1: Estabilidad «on board» en Selectra 2

Días en uso	0	10	26	34	43
Blanco	0,003	0,008	0,012	0,013	0,019
Abs. Calibrador	0,287	-	0,301	0,288	0,290
SE-1 (0,65 mg/dl)	0,67	0,64	0,68	0,69	0,63
SE-2 (6,10 mg/dl)	6,01	6,18	6,03	6,33	6,39
Cal. A Plus (4,4 mg/dl)	4,36	4,35	4,36	4,36	4,23

Cuadro 2: Estabilidad «on board» en Express plus

Días en uso	0	7	20	25	32
Blanco	0,078	-	0,074	0,090	0,091
Abs. Calibrador	0,232	-	0,228	0,215	0,228
SE-1 (0,60 mg/dl)	0,66	0,66	0,64	0,67	0,65
SE-2 (6,40 mg/dl)	6,18	6,03	6,21	6,31	6,70
Cal. A Plus (4,4 mg/dl)	4,43	4,24	4,46	4,61	4,51

Conclusiones

Linealidad

Cuando se comparan los resultados obtenidos con los que se calculan matemáticamente según la dilución empleada, se obtiene una excelente correlación hasta una concentración de Bilirrubina total igual a 20 mg/dl en los dos analizadores, por lo que se concluye que la linealidad aceptada para el reactivo Bilirrubina Total AA (método DPD) puede establecerse hasta 20 mg/dl.

Precisión interensayo

En todos los casos se obtuvieron CV inferiores al 5 % para la bilirrubina total y menores o iguales al 6% para la bilirrubina directa, lo que nos habla de una buena reproducibilidad de ambos métodos.

Precisión intraensayo

El análisis estadístico de los datos indica que con ambas muestras se obtuvieron CV inferiores a un 5%. Para Bilirrubina total, los valores obtenidos no superaron el 1% lo que indica también una precisión intraensayo que se encuentra dentro de los valores deseados.

Estabilidad

Bilirrubina total

El Reactivo de Trabajo después de 7 días a 37°C y 30 días refrigerado sigue reaccionando de manera comparable a la referencia, sin observarse deterioro.

Bilirrubina directa

El Reactivo de Trabajo después de 3 días a 37°C y 30 días refrigerado sigue reaccionando de manera comparable a la referencia, sin observarse deterioro.

Estabilidad en uso («on board»)

De los resultados obtenidos en el ensayo de estabilidad «on board» en los distintos analizadores, se concluye que el reactivo Bilirrubina Total AA Wiener lab. fue estable en el período de ensayo en cada analizador, es decir: 43 días en Wiener lab. Vitalab Selectra 2 y 32 días en Express plus, puesto que las muestras ensayadas (controles Standatrol S-E 2 niveles Wiener lab., y Calibrador A Plus Wiener lab.) dieron resultados dentro del rango de valores esperados.

Discusión final

Luego de ensayados los dos sistemas propuestos para determinación de bilirrubina total y directa respectivamente, se pudo comprobar que su comportamiento cumple con los requerimientos establecidos, siendo sus características fundamentales, la sencilla preparación del Reactivo de Trabajo y su prolongada estabilidad. Resulta destacable que en la experiencia realizada con el Reactivo de Trabajo, especialmente «on board», la estabilidad obtenida excede notablemente la indicada en el manual de instrucciones del kit.

Estas características lo hacen un método especialmente apropiado para uso en analizadores automáticos otorgándoles una ventaja comparativa apreciable con los tradicionales métodos en los que la labilidad del reactivo de trabajo no los hacían prácticos para automatización.

