



Bilirrubina

Para la determinación de bilirrubina directa y total

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 (Reactivo A) 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

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

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

C. Reactivo C: solución de nitrato de sodio 0,07 mol/l.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- Agua destilada.
- **Bilirrubina Standard** de Wiener lab. para efectuar la calibración periódica del equipo.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo A: listo para usar.

Reactivo B: listo para usar.

Diazorreactivo: de acuerdo al volumen de trabajo, mezclar 1 parte de Reactivo C con 21 partes de Reactivo B. Rotular y fechar.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales

de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

Reactivo B: H315 + H320: Provoca irritación cutánea y ocular. H314: Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. P262: Evitar el contacto con los ojos, la piel o la ropa. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

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 para medir los volúmenes indicados.
- Frasco de vidrio color caramelo.
- Tubos.
- 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 marcados B (Blanco), D (Directa) y T (Total) colocar:

	B	D	T
Muestra (suero)	200 ul	200 ul	200 ul
Agua destilada	2,5 ml	2,5 ml	-
Reactivo A	-	-	2,5 ml
Reactivo B	200 ul	-	-
Diazorreactivo	-	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 descripta 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 marcados B (Blanco) y T (Total) colocar:

	B	T
Muestra (líquido amniótico)	1 ml	1 ml
Agua destilada	1,5 ml	-

Reactivo A	-	1,5 ml
Reactivo B	0,2 ml	-
Diazorreactivo	-	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

Si la muestra a ensayar es suero o plasma, procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de bilirrubina, con cada determinación.

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.

CONVERSION DE UNIDADES

Bilirrubina (mg/l) = Bilirrubina (mg/dl) x 10

Birrubina (umol/l) = Bilirrubina (mg/dl) x 17,1

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	$\pm 0,18$ mg/l	8,5 %
26,0 mg/l	$\pm 0,62$ mg/l	2,4 %

Bilirrubina total

Nivel	D.S.	C.V.
9,8 mg/l	$\pm 0,47$ mg/l	4,7 %
127,7 mg/l	$\pm 1,45$ 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%.

d) Límite de detección: depende del espectrofotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida para un ΔA mínimo de 0,001, el menor cambio de concentración detectable será de 0,17 mg/l.

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 - 4ª Ed. (1968).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.



Bilirrubina

Para a determinação de bilirrubina direta e total

SIGNIFICADO CLÍNICO

A bilirrubina, composto produzido pela degradação da hemoglobina, é captado pelo fígado para sua conjugação e excreção biliar. As alterações hepatocelulares e obstruções biliares podem provocar hiperbilirrubinemias.

A eritroblastose fetal ou anemia hemolítica do recém nascido é uma patologia provocada pela incompatibilidade materno-fetal. Nesta patologias se produz a destruição massiva de glóbulos vermelhos que resulta num considerável aumento da bilirrubina sérica com o conseqüente risco de espalhar-se o pigmento ao sistema nervoso central. Por tal motivo, a determinação dos parâmetros resulta muito importante.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A bilirrubina reage com ácido sulfanílico diazotado produzindo um pigmento cor vermelho escuro, perto do roxo (azobilirrubina) que se mede em fotocolorímetro a 530 nm. Assim como a bilirrubina conjugada (direta) reage diretamente com o diazorreagente, a bilirrubina não conjugada (indireta) necessita a presença de um desenvolvedor aquoso (Reagente A) que permite sua reação.

Para a reação de bilirrubina total (conjugada e não conjugada) presente na amostra, deve adicionar-se benzoato de cafeína.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: solução aquosa de benzoato de cafeína 0,13 mmol/l, tamponada e estabilizada.

B. Reagente B: solução de ácido sulfanílico 29 mmol/l e ácido clorídrico 0,17 mol/l.

C. Reagente C: solução de nitrito de sódio 0.07 mol/l.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- Água destilada.

- **Bilirrubina Standard** da Wiener lab. para realizar a calibração do kit.

INSTRUÇÕES DE USO

Reagente A: pronto para uso.

Reagente B: pronto para uso.

Diazorreagente: conforme o volume de trabalho, misturar 1 parte de Reagente C com 21 partes de Reagente B. Rotular e datar.

PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

Reagente B: H315+H320: Provoca irritação cutânea e ocular. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P262: Não pode entrar em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob temperatura ambiente (< 25°C) até a data do vencimento indicada na embalagem.

Diazorreagente: sob refrigeração (2-10°C) e em frasco de vidro cor âmbar é estável 3 meses a contar da data de seu preparo.

INDÍCIOS DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES

A presença de sedimento e/ou mudança de coloração dos reagentes, podem ser indícios de deterioração dos mesmos.

AMOSTRA

Soro, plasma ou líquido amniótico

a) Coleta: obter soro ou plasma da maneira habitual. Manter protegido da luz natural ou artificial, cobrindo o tubo com papel escuro.

Também pode realizar-se a determinação em líquido amniótico.

b) Aditivos: no caso de que a amostra a ser realizada seja plasma, deve utilizar-se heparina para sua obtenção.

c) Substâncias interferentes conhecidas: hemólise moderada ou intensa inibe a reação direta, obtendo-se valores de bilirrubina total falsamente aumentados.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve ser preferencialmente fresca. No caso de não realizar-se o ensaio na hora, o soro deve conservar-se até 48 horas sob refrigeração (2-10°C) e a sangue inteira não mais de 24 horas sob refrigeração ou 12 horas a temperatura ambiente. O líquido amniótico é conveniente mantê-lo congelado até realizar o ensaio.

A ação da luz pode destruir em uma hora até 50% da bilirrubina presente na amostra. Por tal motivo deve proteger-se da luz.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro.
- Micropipetas ou pipetas para medir volumes indicados.
- Frasco de vidro cor âmbar.
- Tubos.
- Relógio ou timer.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda: 530 nm em espectrofotômetro ou 520-550 nm em fotocolorímetro com filtro verde.
- Temperatura de reação: temperatura ambiente
- Tempo de reação: 5 minutos
- Volume de amostra: 200 ul
- Volume final de reação: 2,9 ml

PROCEDIMENTO

I- TÉCNICA PARA SORO

Em três tubos marcados B (Branco), D (Direta) e T (Total) colocar:

	B	D	T
Amostra (soro)	200 ul	200 ul	200 ul
Água destilada	2,5 ml	2,5 ml	-
Reagente A	-	-	2,5 ml
Reagente B	200 ul	-	-
Diazorreagente	-	200 ul	200 ul

Misturar imediatamente cada tubo por inversão. Logo de 5 minutos, ler em espectrofotômetro a 530 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (520-550 nm) levando o aparelho a zero com água destilada. As leituras podem realizar-se entre 4 e 15 minutos, exceto para a bilirrubina direta que deve ler-se aos 5 minutos. De ser lido antes, se observará uma sub-valorização dos resultados pela reação incompleta. De ser lido depois, se observará uma sobre valorização posto que começa a reagir a bilirrubina livre.

Soros ictericos: deve utilizar-se a técnica descrita, com menor quantidade de amostra, conforme à severidade da icterícia. No caso de icterícia moderada deverá ser utilizado 50 ul de soro. Em uma icterícia intensa será necessário só 20 ul. Multiplicar os resultados obtidos por 3,79 e 9,38 respetivamente.

II- TÉCNICA PARA LÍQUIDO AMNIÓTICO

Para determinação de bilirrubina total. Em dois tubos marcados B (Branco) e T (Total) colocar:

	B	T
Amostra (líquido amniótico)	1 ml	1 ml
Água destilada	1,5 ml	-

Reagente A	-	1,5 ml
Reagente B	0,2 ml	-
Diazorreagente	-	0,2 ml

Proceder da mesma maneira que na técnica I. Dividir o resultado final por 5,37.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

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

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

Bilirrubina livre (indireta) = BRB total - BRB direta

O fator colorimétrico (f) deve ser calculado com Bilirrubina Standard de Wiener lab.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Se a amostra a ensaiar for soro ou plasma, processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) com concentrações conhecidas de bilirrubina, com cada determinação.

VALORES DE REFERÊNCIA

Bilirrubina em soro ou plasma

- Adulto:

Direta: até 2 mg/l

Total: até 10 mg/l

- Recém nascidos:

	Nascidos a termo	Prematuros
Sangue de cordão	25 mg/l	
até as 24 hs	60 mg/l	80 mg/l
até as 48 hs	75 mg/l	120 mg/l
do 3º ao 5º dia	120 mg/l	240 mg/l

Os valores começam logo diminuindo para alcançar o nível médio do adulto ao cumprir um mês do nascimento. Nos prematuros, os níveis de bilirrubina se retardam mais para alcançar a normalidade, dependendo do grau de imaturidade hepática.

Bilirrubina em líquido amniótico

Valores menores de 1 mg/l consideram-se normais, no entanto os valores entre 1 e 2,7 mg/l sugerem a possibilidade de um feto afetado. Os níveis por cima de 2,7 mg/l só encontram-se em presença de eritroblastose fetal. Se a quantidade de bilirrubina é superior a 4,7 mg/l o feto encontra-se afetado e tem provavelmente algum tipo de deficiência circulatória.

Se a quantidade de bilirrubina fica por cima de 9,5 mg/l a morte do feto é iminente.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

CONVERSÃO DE UNIDADES

Bilirrubina (mg/l) = Bilirrubina (mg/dl) x 10

Birrubina (umol/l) = Bilirrubina (mg/dl) x 17,1

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.
A ação da luz, por cima dos soros e por cima das soluções de padrão, pode destruir em 1 hora até o 50% da bilirrubina presente.

DESEMPENHO

a) Reprodutibilidade: processando duplicatas das mesmas amostras em um mesmo dia, obtiveram-se os seguintes dados:

Bilirrubina direta

Nível	D.P.	C.V.
2,1 mg/l	± 0,18 mg/l	8,5 %
26,0 mg/l	± 0,62 mg/l	2,4 %

Bilirrubina total

Nível	D.P.	C.V.
9,8 mg/l	± 0,47 mg/l	4,7 %
127,7 mg/l	± 1,45 mg/l	1,1 %

b) Linearidade: a reação é linear até 150 mg/l.

c) Recuperação: adicionar quantidades conhecidas de bilirrubina a diferentes soros, obteve-se uma recuperação entre 100 e 106%.

d) Limite de detecção: depende do espectrofotômetro e da comprimento de onda utilizados. De acordo com a sensibilidade requerida, para um ΔA mínimo de 0,001, a menor concentração detectável será de 0,17 mg/l.

APRESENTAÇÃO

Kit para 200 determinações (Cód. 1120001).

REFERÊNCIAS

- Botwell, J.H. - Clin. Chem. 10/3:197 (1964).
- Walson, 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 microbiological techniques", Harper & Row Pub - 4ª Ed. (1968).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4ª ed., 2001.



Bilirrubina

For direct and total bilirubin determination

SUMMARY

Bilirubin, compound produced by degradation of hemoglobin, is captured by the liver for its conjugation and bile excretion. Liver cell disorders or bile obstructions may lead to hyperbilirubinemia. *Erythroblastosis fetalis* or hemolytic anemia of the newborn is a pathology caused by mother-fetus blood incompatibility, producing an excessive destruction of red blood cells. This results in a severe increase in serum Bilirubin with risk of pigment diffusion to the central nervous system. Consequently, bilirubin determination in these newborns is highly important.

PRINCIPLE

Bilirubin reacts specifically with diazotized sulfanilic acid producing a purple-red pigment (azobilirubin) photocolormetrically measured at 530 nm. While conjugated (direct) bilirubin reacts directly with the diazoreagent, unconjugated (indirect) bilirubin requires the presence of an aqueous developer (Reagent A) to enable reaction. Therefore, caffeine benzoate must be added to the reaction medium so that the total bilirubin (conjugated and unconjugated) in the sample generates reaction.

PROVIDED REAGENTS

- A. Reagent A:** 0.13 mol/l caffeine benzoate aqueous solution, buffered and stabilized.
B. Reagent B: 29 mmol/l sulfanilic acid solution and 0.17 mol/l hydrochloric acid.
C. Reagent C: 0.07 mol/l sodium nitrite solution.

NON-PROVIDED REAGENTS

- Distilled water.
- Wiener lab's **Bilirrubina Standard** for periodic instrument calibration.

INSTRUCTIONS FOR USE

Reagent A: ready to use.

Reagent B: ready to use.

Diazoreagent: according to the volume to prepare, mix 1 part of Reagent C with 21 parts of Reagent B. Label and date.

WARNINGS

The reagents are for «in vitro» diagnostic use. Use the reagents maintaining the usual working precautions for the clinical laboratory. All reagents and samples must be discarded according to local regulations in force.

Reagent B: H315+H320: Causes skin and eye irritation. H314: Causes severe skin burns and eye damage. P262: Do not get in eyes, on skin, or on clothing. P305 + P351 +

P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Provided Reagents: stable at room temperature (< 25°C) until the expiration date shown on the box.

Diazoreagent: at 2-10°C and in caramel-colored glass bottle it is stable for 3 months from the date of preparation.

INSTABILITY OR DETERIORATION OF REAGENTS

The presence of sediment and/or discoloration of the reagents may indicate reagent deterioration.

SAMPLE

Serum, plasma or amniotic fluid

a) Collection: obtain serum or plasma as usual. Protect from natural or artificial light covering the tube with black paper. You can also make the determination in amniotic fluid.

b) Additives: use heparin for collection in case the sample to be used is plasma

c) Known Interfering Substances: samples with mild or intense hemolysis inhibit the direct reaction, obtaining falsely increased total bilirubin values. Refer to Young, D.S. in references for the effect of drugs on the present method.

d) Stability and storage instructions: sample should be preferably fresh. If the assay is not performed immediately, serum can be stored up to 48 hours in refrigerator (2-10°C) and whole blood no more than 24 hours in refrigerator (2-10°C) or 12 hours at room temperature. Keep the amniotic fluid frozen until the assay is performed.

The action of light is capable of destroying up to a 50% of the bilirubin present in the sample in one hour. Consequently, it should be carefully protected.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Spectrophotometer and photocolormeter
- Micropipettes and pipettes for measuring stated volumes
- Caramel-colored glass bottle
- Tubes
- Watch or timer

ASSAY CONDITIONS

- Wavelength: 530 nm in spectrophotometer or 520-550 nm in photocolormeter with green filter
- Reaction temperature: room temperature

- Reaction time: 5 minutes
- Sample volume: 200 ul
- Final reaction volume: 2.9 ml

PROCEDURE

I-TECHNIQUE FOR SERUM

In three tubes labeled B (Blank), D (Direct) and T (Total) place:

	B	D	T
Sample (serum)	200 ul	200 ul	200 ul
Distilled water	2.5 ml	2.5 ml	-
Reagent A	-	-	2.5 ml
Reagent B	200 ul	-	-
Diazo reagent	-	200 ul	200 ul

Mix immediately by inverting each tube. After 5 minutes, read on spectrophotometer at 530 nm or on photo-colorimeter with green filter (520-550 nm), taking the instrument to zero with distilled water. Readings can be performed at intervals between 4 and 15 minutes, except for direct bilirubin, which must be read at exactly 5 minutes. If read beforehand, there will be undervaluation of the results by incomplete reaction. If read afterwards, there will be overvaluation because free bilirubin starts reaction. Icteric sera: the technique described should be used with smaller amounts of sample, according to the severity of the jaundice. Thus, for moderate jaundice 50 ul serum will be used, while for severe jaundice only 20 ul will be required. Multiply the results by 3.79 and 9.38 respectively.

II- TECHNIQUE FOR AMNIOTIC FLUID

Total bilirubin is determined. In two tubes labeled B (Blank) and T (Total) place:

	B	T
Sample (amniotic fluid)	1 ml	1 ml
Distilled water	1.5 ml	-
Reagent A	-	1.5 ml
Reagent B	0.2 ml	-
Diazo reagent	-	0.2 ml

Proceed in the same way as in Technique I. Divide the result by 5.37.

CALCULATIONS

Total Bilirubin (mg/l) = (T - B) x f

Direct Bilirubin (mg/l) = (D - B) x f

Free Bilirubin (indirect) = Total BRB - Direct BRB

The colorimetric factor (f) must be calculated using Wiener lab's **Bilirubina Standard**.

QUALITY CONTROL METHOD

If the test sample is serum or plasma, process 2 levels of a quality control material (**Standatrol S-E 2 niveles**) with known concentrations of bilirubin, with each test.

REFERENCE VALUES

Bilirubin in serum or plasma

- Adults:

Direct: up to 2 mg/l

Total: up to 10 mg/l

- Newborns:

	Full-term infant	Premature
Cord blood	25 mg/l	
Up to 24 hrs	60 mg/l	80 mg/l
Up to 48 hrs	75 mg/l	120 mg/l
3rd to 5th day	120 mg/l	240 mg/l

The values begin to decrease to reach the average adult level after one month of birth. In premature infants, bilirubin levels take longer to reach normality, depending on the degree of hepatic immaturity.

Bilirubin in amniotic fluid

Values lower than 1 mg/l are considered normal, while between 1 and 2.7 mg/l suggest the possibility of an affected fetus.

Levels greater than 2.7 mg/l are found only in presence of fetal erythroblastosis. If the amount of bilirubin is greater than 4.7 mg/l the fetus is affected and probably has some kind of circulatory insufficiency. If the amount of bilirubin exceeds 9.5 mg/l fetal death is imminent.

It is recommended that each laboratory establish its own reference values.

UNITS CONVERSION

Bilirubin (mg/l) = Bilirubin (mg/dl) x 10

Bilirubin (umol/l) = Bilirubin (mg/dl) x 17.1

PROCEDURE LIMITATIONS

See Known interfering substances under SAMPLE. The action of light, both on sera as on the standard solutions, is capable of destroying up to 50% of the existent bilirubin in one hour.

PERFORMANCE

a) Reproducibility: processing replicates of the same samples in the same day, the following values were obtained:

Direct Bilirubin

Level	S.D.	C.V.
2.1 mg/l	± 0.18 mg/l	8.5 %
26.0 mg/l	± 0.62 mg/l	2.4 %

Total Bilirubin

Level	S.D.	C.V.
9.8 mg/l	± 0.47 mg/l	4.7 %
127.7 mg/l	± 1.45 mg/l	1.1 %

b) Linearity: reaction is linear up to 150 mg/l.

c) Recovery: by adding known amounts of bilirubin to various

sera, a recovery between 100% and 106% was obtained.
d) Detection limit: it depends on the spectrophotometer used and the wavelength. According to the sensitivity required for a minimum ΔA of 0.001, the smallest detectable concentration change will be 0.17 mg/l.

WIENER LAB. PROVIDES

Kit for 200 tests (Cat. No. 1120001).

REFERENCES

- 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 microbiological techniques", Harper & Row Pub - 4a Ed. (1968).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SÍMBOLOS

Símbolos que podrían encontrarse en los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab. // Símbolos que podem ser encontrados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab. // Symbols that might be found on Wiener lab diagnostic reagent kits.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro" // Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro" // This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices



Representante autorizado en la Comunidad Europea // Representante autorizado na Comunidade Europeia // Authorized representative in the European Community



Uso diagnóstico "in vitro" // Uso médico-diagnóstico "in vitro" // "In vitro" diagnostic medical device



Contenido suficiente para <n> ensayos // Conteúdo suficiente para <n> testes // Contains sufficient for <n> tests



Fecha de caducidad // Data de validade // Use by



Límite de temperatura (conservar a) // Limite de temperatura (conservar a) // Temperature limitation (store at)



No congelar // Não congelar // Do not freeze



Riesgo biológico // Risco biológico // Biological risks



Volumen después de la reconstitución // Volume após a reconstituição // Volume after reconstitution



Contenido // Conteúdo // Contents



Número de lote // Número de lote // Batch code



Elaborado por: // Elaborado por: // Manufactured by:



Nocivo // Nocivo // Harmful



Corrosivo / Cáustico // Corrosivo / Caústico // Corrosive / Caustic



Irritante // Irritante // Irritant



Consultar instrucciones de uso // Consultar as instruções de uso // Consult instructions for use



Calibrador // Calibrador // Calibrator



Control // Controle // Control



Control Positivo // Controle Positivo // Positive Control



Control Negativo // Controle Negativo // Negative Control



Número de catálogo // Número de catálogo // Catalog number

IVD



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



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina