



Bilirrubina Total

AA

Método DPD para la determinación de bilirrubina total
en suero o plasma

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 produciendo toxicidad, por lo que la determinación de la bilirrubina en estos niños recién nacidos resulta sumamente importante.

FUNDAMENTOS DEL METODO

La bilirrubina indirecta, unida a la albúmina, es liberada por un tensioactivo. La bilirrubina total reacciona con la sal de diclorofenildiazonio (DPD) formando un azocompuesto de color rojo en solución ácida.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución acuosa conteniendo ácido clorhídrico 150 mmol/l y tensioactivo.

B. Reactivo B: solución acuosa conteniendo sal de diclorofenildiazonio 1,5 mmol/l en ácido clorhídrico 150 mmol/l.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Calibrador A plus de Wiener lab.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos Provistos: listos para usar. Antes de utilizar, mezclar por inversión.

El **Reactivo B** puede presentar una ligera turbidez que no afecta su reactividad.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Los reactivos son corrosivos. 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.

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.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener de la manera habitual. Proteger de la luz natural o artificial envolviendo el tubo con papel negro.

b) Aditivos: en caso de que la muestra sea plasma, debe usarse heparina o EDTA para su obtención.

c) Sustancias interferentes conocidas: concentraciones elevadas de globulinas pueden causar interferencia.

No se observan interferencias por hemólisis hasta una concentración de hemoglobina de 500 mg/dl (0,5 g/dl) ni lipemia hasta una concentración de 500 mg/dl (5 g/l) de triglicéridos. No obstante, muestras hiperlipémicas o con hemólisis moderada pueden conducir a resultados erróneos. 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, la muestra puede conservarse hasta 48 horas en refrigerador (2-10°C).

La acción de la luz es capaz de destruir hasta un 50% de la bilirrubina presente en la muestra, por lo que debe protegerse cuidadosamente.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados
- Cronómetro
- Analizador automático

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 546 nm (520 - 550 nm)
- Temperatura de reacción: 25°C (30°C o 37°C)
- Tiempo de reacción: 5 minutos 30 segundos
- Volumen de muestra: 80 µl
- Volumen final de reacción: 1,28 ml

PROCEDIMIENTO

En 3 tubos marcados BR (Blanco de Reactivos), BM (Blanco de Muestra/Calibrador/Control) y M (Muestra/Calibrador/Control), colocar:

	BR	BM	M
Reactivo A	1 ml	1,2 ml	1 ml

Agua destilada	80 ul	-	-
Muestra	-	80 ul	80 ul
Mezclar e incubar exactamente 30 segundos. Luego agregar:			
Reactivo B	0,2 ml	-	0,2 ml
Mezclar e incubar 5 minutos. Inmediatamente después, leer en espectrofotómetro a 546 nm (520 - 550 nm), llevando a cero el aparato con el Blanco de Reactivo (BR). Lectura 1 (DO ₁): BM (Blanco de Muestra o BC (Blanco de Calibrador). Lectura 2 (DO ₂): M (Muestra) o C (Calibrador).			

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de la reacción es estable durante 30 segundos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese tiempo.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Bilirrubina Total (mg/l) = (DO_{2 M} - DO_{1 BM}) x f

donde:

$$f = \frac{X' \text{ mg/l}}{DO_{2C} - DO_{1BC}}$$

(') concentración de bilirrubina total en el **Calibrador A plus** de Wiener lab.

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de bilirrubina total, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

Bilirrubina total en suero o plasma:

- Adultos: hasta 10 mg/l

- Recién nacidos:

	Nacidos a término	Prematuros
Sangre de cordón	< 20 mg/l	< 20 mg/l
hasta las 24 hs	14 - 87 mg/l	< 80 mg/l
hasta las 48 hs	34 - 115 mg/l	< 120 mg/l
del 3º al 5º día	15 - 120 mg/l	< 160 mg/l

Los valores comienzan luego a disminuir para alcanzar el nivel promedio del adulto al mes del nacimiento.

En los prematuros, los niveles tardan más en alcanzar la normalidad, dependiendo del grado de inmadurez hepática. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CONVERSION DE UNIDADES AL SISTEMA SI

Bilirrubina (umol/l) = Bilirrubina (mg/l) x 1,71

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

La acción de la luz, tanto sobre las muestras como sobre las soluciones standard, es capaz de destruir en una hora hasta el 50% de la bilirrubina presente.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: se aplicó el protocolo EP15-A del CLSI. Se analizaron tres niveles de concentración, cada uno por cuadruplicado durante 5 días. Con los datos obtenidos, se calcularon la precisión intraensayo y total.

Precisión intraensayo (n = 20)

Nivel	D.S.	C.V.
8,5 mg/l	± 0,28 mg/l	3,29%
46,1 mg/l	± 0,31 mg/l	0,67%
164,5 mg/l	± 1,21 mg/l	0,74%

Precisión total (n = 20)

Nivel	D.S.	C.V.
8,5 mg/l	± 0,30 mg/l	3,53%
46,1 mg/l	± 0,77 mg/l	1,67%
164,5 mg/l	± 3,15 mg/l	1,92%

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 250 mg/l de bilirrubina. Para valores superiores, repetir la determinación empleando muestra diluida 1:2 ó 1:4 con solución fisiológica, multiplicando el resultado obtenido por 2 ó 4 según el caso.

c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. En espectrofotómetros con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, para un ΔA de 0,001 el mínimo cambio de concentración detectable será de 0,031 mg/dl.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso. Para la calibración, debe usarse **Calibrador A plus** de Wiener lab.

PRESENTACION

168 ml: 4 x 35 ml Reactivo A

4 x 7 ml Reactivo B

(Cód. 1008115)

240 ml: 4 x 50 ml Reactivo A

2 x 20 ml Reactivo B

(Cód. 1120008)

240 ml: 4 x 50 ml Reactivo A

2 x 20 ml Reactivo B

(Cód. 1009334)

240 ml: 4 x 50 ml Reactivo A

2 x 20 ml Reactivo B

(Cód. 1009244)

240 ml: 4 x 50 ml Reactivo A

2 x 20 ml Reactivo B

(Cód. 1009605)

BIBLIOGRAFIA

- Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. - Tietz Fundamentals of Clin. Chem. 5th Ed.: 966, 2001.
- Weigl, E.; Bach, H.; Krieg, D. - Med. Klin. 70/15:664 (1975).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.

- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, 2004.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3rd ed. (2001).

SÍMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso

 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo



Bilirrubina Total

AA

Método DPD para a determinação de bilirrubina total
em soro ou plasma

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. Nestas 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, produzindo toxicidade. Porém, a determinação de bilirrubina no recém nascido é muito importante.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

ABilirrubina indireta, unida à albumina, é liberada por um tensoativo. A bilirrubina total reage com o sal de diclorofenildiazônio (DPD) produzindo um azo composto cor vermelho em solução ácida.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: solução aquosa contendo ácido clorídrico 150 mmol/l e tensoativo.

B. Reagente B: solução aquosa contendo sal de diclorofenildiazônio 1,5 mmol/l em ácido clorídrico 150 mmol/l.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

Calibrador A plus da Wiener lab.

INSTRUÇÕES DE USO

Reagentes Fornecidos: prontos para uso. Antes de utilizar, misturar por inversão.

O **Reagente B** pode desenvolver turbidez que não afeta a sua reatividade.

PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Os reagentes são corrosivos. 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. 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.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data do vencimento indicada na embalagem.

AMOSTRA

Soro ou plasma

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

b) Aditivos: caso de que a amostra seja plasma, deve-se utilizar heparina ou EDTA para sua obtenção.

c) Substâncias interferentes conhecidas: altas concentrações de globulinas podem causar interferência.

Não se observam interferências por hemólise até uma concentração de hemoglobina de 500 mg/dl (0,5 g/dl) nem lipemia até uma concentração de 500 mg/dl (5 g/l) de triglicerídeos. No entanto, amostras hiperlipêmicas ou com hemólise moderada podem conduzir a resultados errados. Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve ser preferencialmente fresca. Caso de não realizar-se o ensaio na hora, a amostra deve ser conservada até 48 horas sob refrigeração (2-10°C).

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

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Espectrofotômetro
- Micropipetas ou pipetas para medir os volumes indicados
- Cronômetro
- Analisador automático

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda: 546 nm (520 - 550 nm)
- Temperatura de reação: 25°C (30°C ou 37°C)
- Tempo de reação: 5 minutos 30 segundos
- Volume de amostra: 80 µl
- Volume final de reação: 1,28 ml

PROCEDIMENTO

Em 3 tubos marcados BR (Branco de Reagentes), BM (Branco de Amostra/Calibrador/Controle), e M (Amostra/Calibrador/Controle), colocar:

	BR	BM	M
Reagente A	1 ml	1,2 ml	1 ml

Água destilada	80 ul	-	-
Amostra	-	80 ul	80 ul
Misturar e incubar exatamente 30 segundos. Após, acrescentar:			
Reagente B	0,2 ml	-	0,2 ml
Misturar e incubar 5 minutos. Logo após, ler em espectrofotômetro a 546 nm (520 - 550 nm), levando o aparelho a zero com o Branco de Reagente (BR). Leitura 1 (DO ₁): BM (Branco de Amostra) ou BC (Branco de Calibrador). Leitura 2 (DO ₂): M (Amostra) ou C (Calibrador).			

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A cor é estável 30 segundos pelo que a absorbância deve ser lida dentro deste tempo.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Bilirrubina Total (mg/l) = (DO_{2 Amostra} - DO_{1 Amostra}) x f

onde:

$$f = \frac{X' \text{ mg/l}}{\text{DO}_{2 \text{ Calibr.}} - \text{DO}_{1 \text{ Calibr.}}}$$

(') concentração de bilirrubina total no **Calibrador A plus** da Wiener lab.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) com concentrações conhecidas de bilirrubina total, com cada determinação.

VALORES DE REFERÊNCIA

Bilirrubina total em soro ou plasma:

- Adultos: até 10 mg/l

- Recém nascidos:

	Nascidos a termo	Prematuros
Sangue de cordão	< 20 mg/l	< 20 mg/l
até as 24 hs	14 - 87 mg/l	< 80 mg/l
até 48 hs	34 - 115 mg/l	< 120 mg/l
do 3º ao 5º dia	15 - 120 mg/l	< 160 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. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

CONVERSÃO DE UNIDADES AO SISTEMA SI

Bilirrubina (umol/l) = Bilirrubina (mg/l) x 1,71

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. A ação da luz sobre as amostras e soluções padrão, pode destruir em 1 hora até o 50% da bilirrubina presente.

DESEMPENHO

a) Reprodutibilidade: aplicando o protocolo EP-15A do CLSI, se analisaram três níveis de concentração, cada um por quadruplicado durante 5 dias. Com os dados obtidos, calcularam-se as precisões intra-ensaio e total.

Precisão intra-ensaio (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
8,5 mg/l	± 0,28 mg/l	3,29%
46,1 mg/l	± 0,31 mg/l	0,67%
164,5 mg/l	± 1,21 mg/l	0,74%

Precisão total (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
8,5 mg/l	± 0,30 mg/l	3,53%
46,1 mg/l	± 0,77 mg/l	1,67%
164,5 mg/l	± 3,15 mg/l	1,92%

b) Linearidade: a reação é linear até 300 mg/l de bilirrubina. Para valores superiores repetir a determinação com amostra diluída 1:2 ou 1:4 com solução fisiológica e multiplicar o resultado obtido por 2 ou 4 respectivamente.

c) Limite de detecção: depende do fotômetro empregado e da comprimento de onda. Em espectrofotômetros com cubetas de faces paralelas de 1 cm de espessura, para um ΔA de 0,001 a mudança mínima de concentração detectável será de 0,031 mg/dl.

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

Para a calibração deve-se utilizar o **Calibrador A plus** da Wiener lab.

APRESENTAÇÃO

168 ml: 4 x 35 ml Reagente A

4 x 7 ml Reagente B

(Cód. 1008115)

240 ml: 4 x 50 ml Reagente A

2 x 20 ml Reagente B

(Cód. 1120008)

240 ml: 4 x 50 ml Reagente A

2 x 20 ml Reagente B

(Cód. 1009334)

240 ml: 4 x 50 ml Reagente A

2 x 20 ml Reagente B

(Cód. 1009244)

240 ml: 4 x 50 ml Reagente A

2 x 20 ml Reagente B

(Cód. 1009605)

REFERÊNCIAS

- Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. - Tietz Fundamentals of Clin. Chem. 5th Ed.: 966, 2001.

- Weigl, E.; Bach, H.; Krieg, D. - Med. Klin. 70/15:664 (1975).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, 2004.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3rd ed. (2001).

SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após a reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo



Bilirrubina Total

AA

DPD method for total bilirubin determination in serum or plasma

SUMMARY

Bilirubin, a compound produced by the degradation of hemoglobin, is captured by the liver for its conjugation and bile excretion. Hepatocellular disorders or biliary obstructions may lead to hyperbilirubinemia.

Erythroblastosis fetalis or hemolytic anemia of the newborn are pathologies due to mother-fetus blood incompatibility, in which an excessive destruction of red blood cells occurs. The result is a severe increase of serum bilirubin, with the consequent risk of pigment diffusion to the central nervous system. Therefore, bilirubin determination in these newborns is extremely important.

PRINCIPLE

Indirect bilirubin, bound to albumin, is released by a surfactant. Total bilirubin reacts with dichlorophenyldiazonium salt (DPD) forming a red azocompound in acid medium.

PROVIDED REAGENTS

A. Reagent A: aqueous solution containing 150 mmol/l hydrochloric acid and surfactant.

B. Reagent B: aqueous solution 1.5 mmol/l dichlorophenyldiazonium salt in 150 mmol/l hydrochloric acid.

NON-PROVIDED REAGENTS

Wiener lab's **Calibrador A plus**.

INSTRUCTIONS FOR USE

Provided Reagents: ready to use. Mix by inversion before use.

Reagent B may develop a slight turbidity which does not affect its performance.

WARNINGS

Reagents are for "in vitro" diagnostic use.

Reagents are corrosive.

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.

Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

The reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

Provided Reagents: stable in refrigerator (2-10°C) until the expiration date stated on the box.

SAMPLE

Serum or plasma

a) Collection: obtain as usual. Protect from natural or artificial light covering the tube with black paper.

b) Additives: heparin or EDTA.

c) Known interfering substances: high concentrations of globulins can cause interference.

No interference has been observed with hemoglobin up to 500 mg/dl (0.5 g/dl) and triglycerides up to 500 mg/dl (5 g/l). Nonetheless, samples with moderate hemolysis or hyperlipemic samples, may lead to erroneous results.

See Young, D.S. in References for effect of drugs on the present method.

d) Stability and storage instructions: sample should be preferably fresh. If assay is not performed immediately, serum can be stored up to 48 hours at 2-10°C.

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

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Spectrophotometer
- Micropipettes and pipettes to measuring the stated volumes
- Stopwatch
- Autoanalyzer

ASSAY CONDITIONS

- Wavelength: 546 nm (520 - 550 nm)
- Reaction temperature: 25°C (30°C or 37°C)
- Reaction time: 5 minutes 30 seconds
- Sample volume: 80 μ l
- Final reaction volume: 1.28 ml

PROCEDURE

In 3 tubes labeled RB (Reagent Blank), SB (Sample/Calibrator/Control Blank) and S (Sample/Calibrator/Control), place:

	RB	SB	S
Reagent A	1 ml	1.2 ml	1 ml
Distilled water	80 μ l	-	-

Sample	-	80 ul	80 ul
Mix and exactly incubate for 30 seconds. Then, add:			
Reagent B	0.2 ml	-	0.2 ml
Mix and incubate for 5 minutes. Measure optical density at 546 nm (520 - 550 nm), setting the instrument to zero with the Reagent Blank (RB). Reading 1 (OD ₁): SB (Sample Blank) or CB (Calibrator Blank). Reading 2 (OD ₂): S (Sample) or C (Calibrator).			

STABILITY OF FINAL REACTION

Color is stable for 30 seconds, so absorbance should be read within that period.

CALCULATIONS

Total Bilirubin (mg/l) = (OD_{2S} - OD_{1SB}) x f

where:

$$f = \frac{X' \text{ mg/l}}{OD_{2C} - OD_{1CB}}$$

(') total bilirubin concentration in Wiener lab.'s **Calibrador A plus**

QUALITY CONTROL METHOD

Each time the test is running, analyze two levels of a quality control material (**Standatrol S-E 2 niveles**) with known total bilirubin concentration.

REFERENCE VALUES

Total bilirubin in serum or plasma

- Adults: up to 10 mg/l

- Newborns:

	Term infant	Preterm infant
umbilical cord blood	< 20 mg/l	< 20 mg/l
up to 24 hrs	14 - 87 mg/l	< 80 mg/l
up to 48 hrs	34 - 115 mg/l	< 120 mg/l
from 3 rd to 5 th day	15 - 120 mg/l	< 160 mg/l

Within a month after birth, total bilirubin concentration decrease reaching the adult's average level.

In preterm infants, levels take longer to reach normality, depending on the hepatic immaturity degree.

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

SI SYSTEM UNITS CONVERSION

Bilirubin (umol/l) = Bilirubin (mg/l) x 1.71

PROCEDURE LIMITATIONS

See Known interfering substances under SAMPLE.

The action of light, both on samples and on standard solutions, is capable of destroying up to 50% of bilirubin in one hour.

PERFORMANCE

a) **Reproducibility:** CLSI protocol EP15-A was applied.

Three concentration levels were tested, in replicates by four, during 5 days. With the obtained data, total and intra-assay precision were calculated.

Intra-assay precision (n = 20)

Level	S.D.	C.V.
8.5 mg/l	± 0.28 mg/l	3.29%
46.1 mg/l	± 0.31 mg/l	0.67%
164.5 mg/l	± 1.21 mg/l	0.74%

Total precision (n = 20)

Level	S.D.	C.V.
8.5 mg/l	± 0.30 mg/l	3.53%
46.1 mg/l	± 0.77 mg/l	1.67%
164.5 mg/l	± 3.15 mg/l	1.92%

b) Linearity: the reaction is linear up to 300 mg/l bilirubin. For higher values, repeat the determination using diluted sample 1:2 or 1:4 with saline solution. Multiply the obtained result by 2 or 4 according to the dilution performed.

c) Detection limit: in spectrophotometers with 1 cm optical length square cuvettes, for a ΔA minimum of 0.001, the minimum detectable concentration change will be of 0.031 mg/dl.

PARAMETERS FOR AUTOANALYZERS

For programming instructions check the user's manual of the autoanalyzer in use.

For calibration, it must be used Wiener lab.'s **Calibrador A plus**.

WIENER LAB. PROVIDES

168 ml: 4 x 35 ml Reagent A
4 x 7 ml Reagent B
(Cód. 1008115)

240 ml: 4 x 50 ml Reagent A
2 x 20 ml Reagent B
(Cat. 1120008)

240 ml: 4 x 50 ml Reagent A
2 x 20 ml Reagent B
(Cat. 1009334)

240 ml: 4 x 50 ml Reagent A
2 x 20 ml Reagent B
(Cat. 1009244)

240 ml: 4 x 50 ml Reagent A
2 x 20 ml Reagent B
(Cat. 1009605)

REFERENCES

- Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. - Tietz Fundamentals of Clin. Chem. 5th Ed.: 966, 2001.
- Weigl, E.; Bach, H.; Krieg, D. - Med. Klin. 70/15:664 (1975).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, 2004.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3rd ed. (2001).

SYMBOLS

The following symbols are used in the packaging for Wiener lab. diagnostic reagents kits.



This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices



Authorized representative in the European Community



"In vitro" diagnostic medical device



Contains sufficient for $<n>$ tests



Use by



Temperature limitation (store at)



Do not freeze



Biological risks



Volume after reconstitution



Contents



Batch code



Manufactured by:



Harmful



Corrosive / Caustic



Irritant



Consult instructions for use



Calibrator



Control



Positive Control



Negative Control



Catalog number



Nr kat. 1120008 Nr kat. 1009605
Nr kat. 1009244 Nr kat. 1008115
Nr kat. 1009334

LINIA PŁYNNA

Bilirrubina Total

AA

Test do oznaczania poziomu bilirubiny całkowitej
metodą DPD w surowicy krwi lub osoczu

WSTĘP

Bilirubina jest produktem powstającym z rozpadu hemoglobiny i jest wychwytywana przez wątrobę, gdzie ulega koniugacji a następnie wydzieleniu z żółcią. Zaburzenia komórki wątrobowej oraz odpływu żółci mogą prowadzić do hiperbilirubinemii. Erytroblastozą płodu lub anemia hemolityczna noworodków są chorobami związanymi z konfliktem serologicznym matki i płodu, w których dochodzi do nadmiernego rozpadu krwinek czerwonych. W wyniku tych procesów dochodzi do dramatycznego wzrostu poziomu bilirubiny w surowicy krwi z następującym przenikaniem barwnika do ośrodkowego układu nerwowego. Stąd oznaczenia poziomu bilirubiny u tych noworodków ma szczególne znaczenie.

ZASADA DZIAŁANIA

Bilirubina pośrednia, związana z albuminami, jest uwalniana przez surfaktant. Bilirubina całkowita reaguje z DPD - solą 2,5-dichlorofenyldiazonium tzw. odczynnikiem Diazo, który przechodzi w czerwony barwnik azowy w środowisku kwaśnym.

DOSTARCZANE ODCZYNNIKI

A. Odczynnik A: wodny roztwór zawierający 150 mmol/l kwasu wodorochlorowego i surfaktantu.

B. Odczynnik B: wodny roztwór zawierający 1,5 mmol/l soli 2,5-dichlorofenyldiazonium w 150 mmol/l kwasu hydrochlorowego.

NIEDOSTARCZANE ODCZYNNIKI

Wiener lab. **Calibrador A plus.**

INSTRUKCJA UŻYCIA

Odczynnik A: gotowy do zastosowania. Zamieszać przez odwrócenie przed użyciem.

Odczynnik B: Odczynnik B może przybrać lekkie zmętnienie jednak nie wpływa to na jego jakość.

OSTRZEŻENIA

Odczynniki wyłącznie do użycia "in vitro".

Odczynniki są żrące. H315+H320 Działa drażniąco na skórę i oczy. H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. P262 Chronić przed kontaktem ze skórą, oczami i odzieżą. P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. P302 + P352 W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować odczynniki zgodnie

z procedurami dla laboratoriów klinicznych.

Odczynniki i materiał badany powinni być odrzucone zgodnie z lokalnymi przepisami.

TRWAŁOŚĆ I WARUNKI PRZECCHOWYWANIA

Dostarczone odczynniki: stabilne w temperaturze 2-10°C do końca daty ważności umieszczonej na opakowaniu.

MATERIAŁ BADANY

Surowica lub osocze

a) Pobranie: pobrać metodą klasyczną, chronić przed światłem naturalnym i sztucznym zakrywając probówkę czarnym papierem.

b) Substancje dodatkowe: heparyna lub EDTA.

c) Znane interakcje: wysokie stężenia globulin mogą powodować zakłócenia.

Nie obserwowano interakcji przy poziomie hemoglobiny do 500mg/dl (0,5g/dl), z trójglicerydami do poziomu 5g/l (500mg/dl), jakkolwiek próbki pacjentów z hemolizą czy hiperlipidemią mogą spowodować błędne pomiary. Sprawdź źródło: Young, D.S. w sprawie wpływu leków w tej metodzie.

d) Trwałość i instrukcja przechowywania: materiał powinien być świeży. Jeżeli badanie nie jest wykonane natychmiast, surowicę można przechowywać do 48 godzin w lodówce w temperaturze 2-10°C.

Należy przechowywać materiał bez dostępu światła, ponieważ nawet 50% bilirubiny w próbce ulega rozpadowi.

WYMAGANE MATERIAŁY I SPRZĘT (niedostarczane)

- spektrofotometr,
- mikropipety i pipety do pomiaru objętości,
- stoper,
- analizator automatyczny.

WARUNKI DLA PRZEPROWADZENIA TESTU

- Długość fali: 546 nm (520-550 nm)
- Temperatura reakcji: 25°C, (30°C, lub 37°C)
- Czas reakcji: 5 min. 30 sek.
- Objętość próbki: 80 ul
- Objętość końcowej reakcji: 1,28 ml

PROCEDURA

W trzech probówkach oznaczonych RB (Reagent Blank - próba ślepa), SB (Sample/Calibrator/Control Blank - próba wzorcowa), S (Sample/Calibrator/Control - próba badana) umieścić:

	RB	SB	S
Odczynnik A	1 ml	1,2 ml	1 ml
Woda destylowana	80 ul	-	-
Materiał	-	80 ul	80 ul
Wymieszać, inkubować 30 sek. następnie dodać:			
Odczynnik B	0,2 ml	-	0,2 ml
Zmieszać i inkubować 5 min. Dokonać pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 546 nm (520 - 550 nm), ustawić spektrofotometr na zero przy Reagent Blank (RB). Odczyt 1 (OD ₁): SB (SampleBlank) lub CB (Calibrator Blank). Odczyt 2 (OD ₂): S (Sample) lub C (Calibrator).			

TRWAŁOŚĆ REAKCJI KOŃCOWEJ

Kolor jest trwały przez 30 sek., więc pomiar spektrofotometryczny powinien być wykonany w tym czasie.

OBLICZENIA

Bilirubina całkowita (mg/l) = (OD_{2S} - OD_{1SB}) x f

gdzie

$$f = \frac{X^* \text{ mg/l}}{OD_{2C} - OD_{1CB}}$$

(*) Stężenie bilirubiny całkowitej w Calibrador A plus Wiener lab.

METODA KONTROLI JAKOŚCI

W trakcie przeprowadzania badania za każdym razem należy przeprowadzać analizę jakości na dwóch poziomach (Standard S-E 2 niveles) ze znanym stężeniem bilirubiny całkowitej.

WARTOŚCI REFERENCYJNE

Bilirubina całkowita w surowicy i osoczu krwi:

- Dorosli do 10 mg/l

- Noworodki:

	noworodek	wcześnieśnik
krew pępowinowa	< 20 mg/l	< 20 mg/l
do 24 godzin	14 - 87 mg/l	< 80 mg/l
do 48 godzin	34 - 115 mg/l	< 120 mg/l
od 3 do 5 dnia	15 - 120 mg/l	< 160 mg/l

W ciągu miesiąca po porodzie, stężenie bilirubiny całkowitej wzrasta stopniowo do poziomu osoby dorosłej.

U noworodków poziom bilirubiny normalizuje się nieco wolniej w zależności od stopnia niedojrzałości komórek wątrobowych. Zaleca się dla każdego laboratorium ustalenie własnych wartości referencyjnych.

KONWERSJA JEDNOSTEK SI

Bilirubina (umol/l) = Bilirubina (mg/l) x 1,71

OGRANICZENIA PROCEDURY

Patrz znane interakcje z innymi substancjami w rozdziale MATERIAŁ.

Zarówno w materiale jak i w roztworach standaryzowanych bilirubina ulega, pod wpływem światła, rozkładowi w 50% w ciągu godziny.

CHARAKTERYSTYKA TESTU

a) Powtarzalność: Powtarzalność: badania zostały wykonane zgodnie z wytycznymi zawartymi w dokumencie EP15-A wydawnego przez CLSI. Analiza trzech poziomów stężeń bilirubiny całkowitej została przeprowadzona czterokrotnie w ciągu 5 dni.

Dokładność w trakcie badania (n = 20)

Poziom	S.D	C.V.
8,5 mg/l	± 0,28 mg/l	3,29%
46,1 mg/l	± 0,31 mg/l	0,67%
164,5 mg/l	± 1,21 mg/l	0,74%

Dokładność całkowita (n = 20)

Poziom	S.D.	C.V.
8,5 mg/l	± 0,30 mg/l	3,53%
46,1 mg/l	± 0,77 mg/l	1,67%
164,5 mg/l	± 3,15 mg/l	1,92%

b) Linijność: reakcja jest liniowa do poziomu 300 mg/l bilirubiny. Dla wyższych stężeń należy rozcieńczyć materiał roztworem soli fizjologicznej 1:2 lub 1:4 a następnie przeprowadzić badanie, wyniki odpowiednio pomnożyć przez 2 lub 4.

c) Ograniczenia w wykrywaniu: zależą od fotometru i zastosowanej długości fali. Przy kuwecie o długości optycznej 1 cm zgodnie z wymaganą czułością dla ΔA min. 0,001, minimalna czułość wykrywania zmiany stężenia powinna wynosić 0,031 mg/dl.

PARAMETRY DLA ANALIZATORÓW AUTOMATYCZNYCH

Należy zapoznać się z instrukcją obsługi celem programowania analizatorów automatycznych. Dla kalibracji należy zastosować Wiener lab. Calibrador A plus.

WIENER LAB. DOSTARCZA

168 ml: 4 x 35 ml Odczynnika A
4 x 7 ml Odczynnika B
(Nr kat.1008115)

240 ml: 4 x 50 ml Odczynnika A
2 x 20 ml Odczynnika B
(Nr kat. 1120008)

240 ml: 4 x 50 ml Odczynnika A
2 x 20 ml Odczynnika B
(Nr kat. 1009334)

240 ml: 4 x 50 ml Odczynnika A
2 x 20 ml Odczynnika B
(Nr kat. 1009244)

240 ml: 4 x 50 ml Odczynnika A
2 x 20 ml Odczynnika B
(Nr kat. 1009605)

ŹRÓDŁA

Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. - Tietz Fundamentals of Clin. Chem. 5th Ed.: 966, 2001.

- Weigl, E.; Bach, H.; Krieg, D. - Med. Klin. 70/15:664 (1975).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, 2004.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3rd ed. (2001).

Oznaczenia

Następujące symbole są zastosowane na opakowaniach zestawów odczytników diagnostycznych.

 Ten produkt spełnia wymagania Dyrektywy Europejskiej 98/79 EC dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy "in vitro"

 Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej

 Wyrób do diagnostyki "in vitro"

 Zawartość wystarczająca dla <n> badań

 Użyć przed

 Ograniczenie dopuszczalnych temperatur

 Nie zamrażać

 Ryzyko biologiczne

 Objętość po rozpuszczeniu

 Zawartość

 numer serii

 Wytwórca

 Substancja szkodliwa

 Substancja żrące

 Substancja drażniąca

 Przed użyciem zapoznać się z instrukcją

 Kalibrator

 Próba kontrolna

 Próba kontrolna dodatnia

 Próba kontrolna ujemna

 Numer katalogowy

 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.
PM-1102-12



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina