

ANEXO 1: PROSPECTO WIENER LAB.



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 diazoreactivo, 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 nitrito 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.
Diazoreactivo: 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.
Diazoreactivo: 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 descrita 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	± 0,18 mg/l	8,5 %
26,0 mg/l	± 0,62 mg/l	2,4 %

Bilirrubina total

Nivel	D.S.	C.V.
9,8 mg/l	± 0,47 mg/l	4,7 %
127,7 mg/l	± 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 microbiological techniques", Harper & Row Pub - 4ª Ed. (1968).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4ª ed., 2001.


SIMBOLOS

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

 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

