



Bilirrubina Direta e Total

Responsável Técnico:
Direct & Total Bilirubin| Dr. Gilson Sérgio Pizzo
Bilirrubina Directa y Total CRF MG – 5310
Ref. 10.003.00 **MS 80027310205**

FINALIDADE

Kit destinado à determinação de Bilirrubina Direta e Total no soro. Uso em diagnóstico *in vitro*.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

- Conservar de 2 a 8 °C.
- Manter ao abrigo da luz.
- A validade do kit está impressa no rótulo da embalagem.
- Não usar reagentes com validade expirada.

PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

A determinação baseia-se na reação diazo, que quantifica colorimetricamente a formação de azobilirrubina, de coloração vermelha, quando a bilirrubina reage sob determinadas condições com ácido sulfanílico diazotado. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de bilirrubina na amostra. Na presença de dimetilsulfóxido (acelerador) reagem a forma indireta (não-conjugada) e a forma direta (monoconjugada, diconjugada e ligada à proteína), determinando-se a Bilirrubina Total. A forma direta é determinada sem o acelerador.

AMOSTRAS: TIPO, COLETA, MANUSEIO, PREPARO E PRESERVAÇÃO

Tipo de Amostra: Soro.

Coleta, manuseio e preparo: Realizar a coleta da amostra conforme Boas Práticas de Laboratório Clínico. As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante. Imediatamente após a coleta, proteger a amostra da ação da luz.

Preservação: A bilirrubina no soro é estável 7 dias conservada em temperatura de 4 a 8 °C e 6 meses em temperatura de -20 °C.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

R BD	Ácido sulfanílico ≥ 10mmol/L, ácido clorídrico ≥ 0,5% v/v.	
R BT	Ácido sulfanílico ≥ 10mmol/L, ácido clorídrico ≥ 0,1% v/v, Dimetilsulfóxido ≥ 30% v/v.	
R NI	Nitrito de sódio ≥ 10mmol/L, sacarose ≥ 2mol/L, conservante.	

ESTABILIDADE EM USO

- Após aberto, o produto (RBD, RBT e RNI) em uso é estável até a validade impressa no rótulo, desde que seguidas a condições de armazenamento recomendadas (2 a 8 °C).
- Os reagentes devem permanecer fora da temperatura especificada somente o tempo necessário para a realização dos testes.

TRATAMENTO E MANUSEIO DO PRODUTO

A) PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
RBD, RBT e RNI: Reagentes prontos para uso.

B) INTERVALO OPERACIONAL

O intervalo operacional da Bilirrubina Direta é de 0,17 mg/dL a 15,0 mg/dL. O intervalo operacional da Bilirrubina Total é de 0,18 mg/dL a 15,0 mg/dL. Para valores superiores, diluir a amostra com NaCl 150 mM (0,9%), realizar nova dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

CONTROLE DE QUALIDADE

O uso de controles deve ser prática rotineira no laboratório. Sugere-se usar um controle na faixa de referência ou no nível de decisão e outro controle com valor em outra faixa de significância clínica. Para Calibração e Controle Interno de Qualidade Laboratorial recomenda-se o uso do soro calibrador e dos soros controles abaixo:

Soro Calibrador - Autocal H	13.002.00
Soro Controle Normal - Quantinorm	REF 13.003.00
Soro Controle Patológico - Quantialt	13.004.00

PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULOS E INTERPRETAÇÃO

A) BILIRRUBINA DIRETA

1. Pipetar em tubos de ensaio:

	Branco	Branco Amostra	Amostra
RBD	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RNI	---	---	30 µL
Amostra/Calibrador	---	50 µL	50 µL

2. Homogeneizar bem e manter os tubos durante 5 minutos em temperatura ambiente.
3. Medir a absorbância do Calibrador, Branco do Calibrador, Amostra e Branco da Amostra frente ao branco em 550 nm (530-570). A cor é estável durante 5 minutos.

B) BILIRRUBINA TOTAL

1. Pipetar em tubos de ensaio:

	Branco	Branco Amostra	Amostra
RBT	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RNI	---	---	30 µL
Amostra/Calibrador	---	50 µL	50 µL

2. Homogeneizar bem e manter os tubos durante 5 minutos em temperatura ambiente.
3. Medir a absorbância do Calibrador, Branco do Calibrador, Amostra e Branco da Amostra frente ao branco em 550 nm (530-570). A cor é estável durante 30 minutos.

C) CALIBRAÇÃO

Utilizar calibrador Autocal H Ref.13.002.00. A concentração de Bilirrubina no calibrador é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 916a do National Institute of Standards and Technology (NIST).

D) CÁLCULOS

Bilirrubina (mg/dL) = $\frac{(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco Amostra})}{(\text{Abs. Calibrador} - \text{Abs. Branco Calibrador})}$ x Valor Calibrador (mg/dL)

Exemplo:

Concentração do Calibrador = 4,62 mg/dL

Absorbância da Amostra = 0,194

Absorbância Branco da Amostra = 0,040

Absorbância do Calibrador = 0,234

Absorbância Branco Calibrador = 0,024

Bilirrubina (mg/dL) = $\frac{0,194 - 0,040}{0,234 - 0,024}$ x 4,62 = 3,39 mg/dL

Com Fator de Calibração

Fator de Calibração = $\frac{\text{Concentração Calibrador (mg/dL)}}{(\text{Abs. Calibrador} - \text{Abs. Branco Calibrador})}$

Bilirrubina (mg/dL) = (Abs. amostra - Abs. Branco Amostra) x Fator de Calibração

Exemplo:

Fator de Calibração = $\frac{4,62}{0,234 - 0,024}$ = 22

Bilirrubina (mg/dL) = (0,194 - 0,040) x 22 = 3,39 mg/dL

Bilirrubina (mg/dL) = (0,194 - 0,040) x 22 = 3,39 mg/dL

Bilirrubina (mg/dL) = (0,194 - 0,040) x 22 = 3,39 mg/dL

Bilirrubina (mg/dL) = (0,194 - 0,040) x 22 = 3,39 mg/dL

E) INTERPRETAÇÃO

A bilirrubina é um pigmento derivado da degradação do heme. A bilirrubina é transportada para o fígado, fracamente associada à albumina, em sua forma não-conjugada. Transportada para o interior do hepatócito ela é rapidamente conjugada para produzir os glicuronídeos de bilirrubina, que são então excretados para a bile. As elevações de bilirrubina conjugada (direta) constituem geralmente marcadores específicos de disfunção hepática, hepatite aguda ou colestase. O aumento da bilirrubina não conjugada (indireta) geralmente é causado por processos hemolíticos ou por uma redução do metabolismo no fígado.

INTERFERENTES OU LIMITAÇÕES

Hemólise, Icterícia e Lipemia: Triglicérides ≥ 150 mg/dL, Hemólise interfere nas dosagens de Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total.

Medicamentos: consultar referência bibliográfica recomendada (Young, 2000).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade:

	Bilirrubina Direta	Bilirrubina Total
Limite de Detecção	0,14 mg/dL	0,13 mg/dL
Limite de Quantificação	0,17 mg/dL	0,18 mg/dL

Especificidade Analítica: O produto determina especificamente Bilirrubina Direta e Total na presença de outras substâncias interferentes na amostra, até as concentrações informadas acima.

Exatidão: O método foi comparado com método similar pela determinação de 40 amostras em duplicata. Foram obtidos os resultados:

Bilirrubina Direta: Equação de regressão y = 1,017x - 0,008 e coeficiente de correlação r=0,9909. Utilizando esta equação o erro sistemático total estimado de 0,9% para um nível de 1,0 mg/dL e 1,6% para um nível de 8,0 mg/dL.

Bilirrubina Total: Equação de regressão y = 1,014x - 0,010 e coeficiente de correlação r=0,9901. Utilizando esta equação o erro sistemático total estimado de 1,20% para um nível de 5,0 mg/dL e 1,32% para um nível de 13,0 mg/dL.

Precisão: Foi determinada utilizando amostras em 03 níveis de decisão, sendo duas corridas em duplicata por dia durante 20 dias, sendo obtido:

Bilirrubina Direta:					
Amostras (mg/dL)	Repetições	Precisão intra-corrída		Precisão total	
		SD (mg/dL)	%CV	SD (mg/dL)	%CV
0,767	80	0,032	4,2	0,039	5,1
3,455	80	0,072	2,1	0,181	5,2
12,218	80	0,067	0,5	0,172	1,4

Bilirrubina Total:					
Amostras (mg/dL)	Repetições	Precisão intra-corrída		Precisão total	
		SD (mg/dL)	%CV	SD (mg/dL)	%CV
1,0471	80	0,0135	1,3	0,0135	1,3
5,4074	80	0,0519	1,0	0,0623	1,2
13,4034	80	0,0463	0,3	0,1097	0,8

%CV: Coeficiente de variação expresso em porcentagem; SD: Desvio Padrão.

RISCOS RESIDUAIS, CUIDADOS E PRECAUÇÕES

- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Não usar o reagente quando este apresentar característica visual em desacordo com o especificado na FISPQ do produto.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O laboratório deve estabelecer os requisitos químicos, microbiológicos e de partículas para a água antes do seu uso para cada uma das suas aplicações e deve definir as especificações ou tipos de água que se atenda. Uma vez que a pureza necessária tenha sido definida, o sistema de purificação deve ser validado e é importante garantir que a água obtida continue a atender às especificações por meio de verificações periódicas.
- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

INTERVALO DE REFERÊNCIA

Recém-nascido	Bilirrubina Total (mg/dL)	
Idade	Prematuro	A termo
0-1 dia	1,0 a 8,0	2,0 a 6,0
1-2 dias	6,0 a 12,0	6,0 a 10,0
3-5 dias	10,0 a 14,0	4,0 a 8,0

	Adultos	mg/dL
Bilirrubina Direta	0,0 a 0,2	
Bilirrubina Total	0,0 a 2,0	

Estes valores são unicamente para orientação, sendo recomendável que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

MATERIAL NECESSÁRIO PARA REALIZAÇÃO DO ENSAIO

- Espectrofotômetro ou fotômetro para leitura em 550 nm (530-570).
- Pipetas de vidro e/ou automáticas.
- Tubos de ensaio.
- Relógio ou cronômetro

ALERTAS E PRECAUÇÕES COM RELAÇÃO AO DESCARTE DO PRODUTO

- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.biotechnica.ind.br ou pelo telefone (35)-3214-4646.
- Descartar as sobras das reações de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico (BPLC) e Programa de Gerenciamento de Resíduos de Serviço de Saúde (PGRSS).

GARANTIA DE QUALIDADE / SAC - SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes Biotécnica são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições especificadas. Adaptações de protocolos semi-automáticos com preparo de Reagentes de Trabalho, dados relativos ao Controle de Qualidade deste produto (lote impresso nas etiquetas dos frascos de reagentes) ou qualquer dúvida na utilização deste kit, entrar em contato com a Assessoria Científica da Biotécnica Ltda, através do telefone +55 35 3214 4646 ou pelo email sac@biotechnicaltda.com.br

AUTOMATIZAÇÃO

Este procedimento é automatizável na maioria dos analisadores. Os protocolos estão disponíveis em www.biotechnica.ind.br

ENGLISH

INTENDED USE

Kit for determination of Direct and Total Bilirubin in serum. In vitro diagnostic use.

STORAGE AND HANDLING

- Store at 2 to 8 °C.
- Protect from light.
- Stable until the kit expiration date that is printed on the label.
- Do not use reagents whose date has expired.

WORKING PRINCIPLE

The determination is based on the diazo reaction, which colorimetrically quantifies the red staining of azobilirubin when bilirubin reacts under certain conditions with diazotized sulfanilic acid. The intensity of the formed color is proportional to the concentration of bilirubin in the sample. In the presence of dimethylsulfoxide (accelerator), the indirect form (unconjugated) and the direct form (monoconjugate, diconjugate and protein bound) are reacted to determine Total Bilirubin. The direct form is determined without the accelerator.

SAMPLES – TYPE, COLLECTION, HANDLING, PREPARATION AND PRESERVATION

Sample Type: Serum.

Collection, handling and preparation: Perform the sample collection according to Good Clinical Laboratory Practice. The samples to be analyzed should be treated as potentially infectious material. Immediately after collection, protect the sample from the action of light.

Preservation: Serum bilirubin is stable for 7 days at 4 to 8 °C and 6 months at -20 °C.

PRODUCT DESCRIPTION

R BD	Sulfamic acid ≥ 10mmol / L, hydrochloric acid ≥ 0.5% v / v.	
R BT	Sulfamic acid ≥ 10mmol / L, hydrochloric acid ≥ 0.1% v / v, Dimethylsulfoxide ≥ 30% v / v.	
R NI	Sodium nitrite ≥ 10 mmol / L, sucrose ≥ 2 mol / L, preservative.	

STABILITY IN USE

- Once opened, the product (RBD, RBT and RNI) in use is stable to the expiration date printed on the label, since recommended storage conditions (2 to 8 °C) are followed.
- Reagents should remain outside the specified temperature only for the time required to perform the tests.

TREATMENT AND HANDLING OF THE PRODUCT

A) REAGENT PREPARATION

RBD, RBT e RNI: Ready-to-use reagents.

B) OPERATING INTERVAL

The operating range of Direct Bilirubin is from 0.17 mg / dL to 15.0 mg / dL.

The operational range of Total Bilirubin is from 0.18 mg / dL to 15.0 mg / dL.

For higher values, dilute the sample with 150 mL NaCl (0.9%), carry out a new dosage and multiply the result obtained by the dilution factor.

QUALITY CONTROL

The use of controls should be routine practice in the laboratory. It is suggested to use one control in the reference range or at the decision level and another control with value in another range of clinical significance. For Calibration and Internal Laboratory Quality Control it is recommended to use the calibrator serum and the control sera below:

Serum Calibrator - Autocal H	13.002.00
Normal Control Serum- Quantinorm	REF 13.003.00
Serum Pathological Control - Quantialt	13.004.00

TEST PROCEDURE, CALCULATION AND INTERPRETATION

A) DIRECT BILIRRUBIN

1 - Pipette into test tube.

	Blank	Blank Sample	Sample
RBD	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RNI	---	---	30 µL
Sample/Calibrator	---	50 µL	50 µL

2. Homogenize well and keep the tubes for 5 minutes at room temperature.

3. Measure the absorbance of the Calibrator, Calibrator Blank, Sample and Sample Blank against white at 550 nm (530-570). Color is stable for 5 minutes.

B) TOTAL BILIRRUBIN

1. Pipette into test tubes:

	Blank	Blank Sample	Sample
RBT	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RNI	---	---	30 µL
Sample/Calibrator	---	50 µL	50 µL

2. Homogenize well and keep the tubes for 5 minutes at room temperature.

3. Measure the absorbance of the Calibrator, Calibrator White, Sample and Sample Blank against white at 550 nm (530-570). Color is stable for 30 minutes.

C) CALIBRATION

Use Calibrator Autocal H Ref.13.002.00. The concentration of Bilirubin in the calibrator is traceable to the Standard Reference Material (SRM) 916a of the National Institute of Standards and Technology (NIST).

D) CALCULATIONS

Bilirubin (mg / dL) = $\frac{(\text{Sample Abs} - \text{Sample White Abs})}{(\text{Calibrator Abs} - \text{White Calibrator Abs})}$ x Calibrator Value (mg / dL)

Exemple:

Calibrator Concentration = 4,62 mg / dL

Sample Absorbance = 0,194

Sample Blank Absorbance = 0,040

Calibrator Absorbance = 0,234

Absorbance Blank Calibrator = 0,024

Bilirubin (mg / dL) = $\frac{0,194 - 0,040}{0,234 - 0,024}$ x 4,62 = 3,39 mg / dL

With Calibration Factor

Calibration Factor = $\frac{\text{Calibrator Concentration (mg / dL)}}{(\text{Calibrator Abs} - \text{White Calibrator Abs})}$

Bilirubin (mg / dL) = (Sample Abs - Abs Sample White) x Calibration Factor

Exemple:

Calibration Factor = $\frac{4,62}{0,234 - 0,024}$ = 22

Bilirubin (mg / dL) = (0,194-0,040) x 22 = 3,39 mg / dL

C) INTERPRETATION

Bilirubin is a pigment derived from heme degradation. Bilirubin is transported to the liver, poorly associated with albumin, in its unconjugated form. Carried into the hepatocyte it is rapidly conjugated to produce the bilirubin glucuronides, which are then excreted into the bile. Elevations of conjugated (direct) bilirubin are usually specific markers of hepatic dysfunction, acute hepatitis, or cholestasis. Increased unconjugated (indirect) bilirubin is usually caused by hemolytic processes or by a reduction in liver metabolism.

INTERFERING AND LIMITATIONS

Hemolysis, Jaundice and Lipemia: Hemoglobin \geq 150 mg / dL, hemolysis interferes in the dosages of direct bilirubin and total bilirubin.

Medications: consult recommended literature reference (Young, 2000).

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity:

	Direct Bilirubin	Total Bilirubin
Detection Limit	0,14 mg/dL	0,13 mg/dL
Qualification Limit	0,17 mg/dL	0,18 mg/dL

Analytical Specificity: The product specifically determines Direct and Total Bilirubin in the presence of other interfering substances in the sample up to the concentrations reported above.

Accuracy: The method was compared with a similar method by the determination of 40 samples in duplicate. The results are as follows:

Direct Bilirubin: Regression equation $y = 1,017x - 0,008$ and correlation coefficient $r = 0,9909$. Using this equation the estimated total systematic error of 0,9% for a level of 1,0 mg / dL and 1,6% for a level of 8,0 mg / dL.

Total Bilirubin: Regression equation $y = 1,014x - 0,010$ and correlation coefficient $r = 0,9901$. Using this equation the total systematic error estimated was 1,20% for a level of 5,0 mg / dL and 1,32% for a level of 13,0 mg / dL.

Precision: It was determined using samples at 03 decision levels, two runs in duplicate per day for 20 days, obtaining:

Samples (mg/dL)	Repetitions	Within-run precision		Total Precision	
		SD (mg/dL)	%CV	SD (mg/dL)	%CV
0,767	80	0,032	4,2	0,039	5,1
3,455	80	0,072	2,1	0,181	5,2
12,218	80	0,067	0,5	0,172	1,4

Samples (mg/dL)	Repetitions	Within-run Precision		Total Precision	
		SD (mg/dL)	%CV	SD (mg/dL)	%CV
1,0471	80	0,0135	1,3	0,0135	1,3
5,4074	80	0,0519	1,0	0,0623	1,2
13,4034	80	0,0463	0,3	0,1097	0,8

% CV: Coefficient of variation expressed as a percentage; SD: Standard Deviation

RESIDUAL RISK, WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Use PPE according to Good Clinical Laboratory Practice.
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not exchange reagent bottle caps to avoid cross-contamination.
- Do not use the reagent when it has a visual characteristic that is not in accordance with the product's MSDS requirements.
- Avoid leaving the reagents out of the specified storage conditions when they are not in use.
- Use specific glass pipettes and disposable tips for each sample, control, standard / calibrator and reagent.
- The laboratory shall establish the chemical, microbiological and particulate requirements for water prior to use for each of its applications and shall define the specifications or types of water that meets them. Once the required purity has been defined, the purification system must be validated and it is important to ensure that the water obtained continues to meet the specifications by means of periodic checks.
- Proper cleaning and drying of the used material are fundamental factors for the stability of the reagents and obtaining correct results.

REFERENCE RANGES

Newborn		Total Bilirubin (mg/dL)	
Age	Premature	Normal	
0-1 day	1,0 to 8,0	2,0 to 6,0	
1-2 day	6,0 to 12,0	6,0 to 10,0	
3-5 day	10,0 to 14,0	4,0 to 8,0	

Adults		mg/dL
Direct Bilirubin		0,0 to 0,2
Total Bilirubin		0,0 to 2,0

These values are for guidance only and it is recommended that each laboratory establishes its own reference range.

MATERIALS REQUIRED TO CARRY OUT THE TEST

- Spectrophotometer or photometer for reading at 550 nm (530-570).
- Glass and / or automatic pipettes.
- Clock or Stopwatch.
- Test tubes

ALERTS AND PRECAUTIONS REGARDING PRODUCT DISPOSAL

- Disposal, Safety and First Aid information are described in the Individual Product Safety Data Sheet (MSDS) for this product, available at www.bioteecnica.ind.br or by telephone + 55 35 3214 4646.
- Dispose of leftover reactions in accordance with Good Clinical Laboratory Practice (BPLC) and Health Service Waste Management Program (PGRSS).

QUALITY ASSURANCE / CUSTOMER TECHNICAL SERVICE

Before being approved for use Biotécnica reagents are tested in the Quality Control Department. The quality of the reagents is assured up to the expiring date stated in the label of the external packaging, since it is stored and transported in the specified conditions. Adaptations of semi-automatic protocols with preparation of Working Reagents, data concerning the Quality Control of this product (lot printed on the labels of the reagent bottles) or any doubt in the use of this kit, contact the Scientific Advisory Board of Biotécnica Ltda, by phone +55 35 3214 4646 or by email sac@biotecnicatda.com.br.

AUTOMATION

This procedure is automated in most analyzers. The applications are available at www.biotecnicatda.ind.br

ESPAÑOL

FINALIDAD

Kit destinado a la determinación de Bilirrubina Directa y Total en suero. Uso en diagnóstico *in vitro*.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

- Conservar de 2 a 8 °C.
- Mantener al abrigo de la luz.
- Estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.
- No usar reactivos cuya fecha de vencimiento haya expirado.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La determinación se basa en la reacción diazo, que cuantifica coloriméricamente la formación de azobilirrubina, de coloración roja, cuando la bilirrubina reacciona bajo determinadas condiciones con ácido sulfanílico diazotado. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina en la muestra. En presencia de dimetilsulfóxido (acelerador) reaccionan la forma indirecta (no conjugada) y la forma directa (monoconjugada, biconjugada) y la fracción unida a proteínas), determinándose la Bilirrubina Total. La forma directa se determina sin el acelerador.

MUESTRAS: TIPO, RECOLECCIÓN, MANIPULACIÓN, PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN

Tipo de Muestra: Suero.

Recolección, manipulación y preparación: Realizar la recolección de las muestras de acuerdo con las Buenas Prácticas del Laboratorio Clínico. Las muestras analizadas deben ser tratadas como material potencialmente infectantes. Inmediatamente después de recolectada, proteger la muestra de la acción de la luz.

Conservación: la bilirrubina en suero, es estable 7 días conservada en temperatura de 4 a 8 °C o 6 meses a -20°C.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

R BD	Ácido sulfanílico \geq 10mmol/L, ácido clorhídrico \geq 0,5% v/v.
R BT	Ácido sulfanílico \geq 10mmol/L, ácido clorhídrico \geq 0,1% v/v, Dimetilsulfóxido \geq 30% v/v.
R NI	Nitrato de sodio \geq 10mmol/L, (sacarosa \geq 2mol/L), conservante.

ESTABILIDAD EN USO

- Después de abierto, el producto (RBD, RBT, RNI) en uso es estable hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja, almacenado en las condiciones recomendadas (2 a 8°C).
- Los reactivos deben permanecer fuera de la temperatura especificada solamente el tiempo necesario para la realización de los ensayos.

INSTRUCCIONES PARA USO

A)PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

RBD, RBT, y RNI: Reactivos listos para uso.

B) INTERVALO OPERACIONAL

El intervalo operacional para Bilirrubina Directa es de 0,17 mg/dL a 15,0 mg/dL. El intervalo operacional para Bilirrubina Total es de 0,18 mg/dL a 15,0 mg/dL. Para valores superiores, diluir la muestra con NaCl 150 mM (0,9%), realizar nuevo ensayo y multiplicar el resultado por el factor de dilución.

CONTROL DE CALIDAD

El uso de controles debe ser práctica rutinaria en el laboratorio. Se sugiere usar un control en el intervalo de referencia o decisión y otro con valor de significado clínico. Para Calibración y Control Interno de Calidad del Laboratorio se recomienda el uso de los siguientes sueros:

Suero Calibrador - Autocal H	13.002.00
Suero Control Normal - Quantinorm	13.003.00
Suero Control Patológico - Quantialt	13.004.00

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO, CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN

A) BILIRUBINA DIRECTA

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Blanco Muestra	Muestra
RBD	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RNI	---	---	30 μ L
Muestra/Calibrador	---	50 μ L	50 μ L

- Homogeneizar bien e incubar los tubos 5 minutos en temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia del Calibrador, Blanco de Calibrador, Muestra y Blanco de Muestra llevando a cero el aparato con el blanco en 550 nm (530-570). El color es estable 5 minutos.

B) BILIRUBINA TOTAL

- Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Blanco Muestra	Muestra
RBT	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RNI	---	---	30 μ L
Muestra/Calibrador	---	50 μ L	50 μ L

- Homogeneizar bien e incubar los tubos 5 minutos en temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia del Calibrador, Blanco de Calibrador, Muestra y Blanco de Muestra llevando a cero el aparato con el blanco en 550 nm (530-570). El color es estable 30 minutos.

C) CALIBRACIÓN

Utilizar calibrador Autocal H Ref.13.002.00. La concentración de Bilirrubina es rastreada al Standard Reference Material (SRM) 916a del National Institute of Standards and Technology (NIST).

D) CÁLCULOS

Bilirrubina (mg/dL) = $\frac{(\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Blanco Muestra}) \times \text{Valor Calibrador (mg/dL)}}{(\text{Abs. Calibrador} - \text{Abs. Blanco Calibrador})}$

Ejemplo:

Concentración del Calibrador = 4,62 mg/dL
Absorbancia de la Muestra = 0,194
Absorbancia Blanco Muestra = 0,040
Absorbancia del Calibrador = 0,234
Absorbancia del Blanco Calibrador = 0,024
Bilirrubina (mg/dL) = $\frac{0,194 - 0,040}{0,234 - 0,024} \times 4,62 = 3,39$ mg/dL

Con Factor de Calibración

Factor de Calibración = $\frac{\text{Concentración Calibrador (mg/dL)}}{(\text{Abs. Calibrador} - \text{Abs. Blanco Calibrador})}$

Bilirrubina (mg/dL) = (Abs. Muestra - Abs. Blanco Muestra) x Factor de Calibración.

Ejemplo:

Factor de Calibración = $\frac{4,62}{0,234 - 0,024} = 22$

Bilirrubina (mg/dL) = $(0,194 - 0,040) \times 22 = 3,39$ mg/dL

C) INTERPRETACIÓN

La bilirrubina es un pigmento derivado de la degradación del grupo hemo. Es transportada para el hígado, por la albumina, en su forma no conjugada. En el interior de los hepatocitos es rápidamente conjugada con ácido glucurónico siendo excretada por la bilis. Las elevaciones de bilirrubina conjugada (directa) generalmente constituyen marcadores específicos de disfunción hepática, hepatitis aguda, o colestasis. El aumento de bilirrubina no conjugada (indirecta) generalmente es causado por procesos hemolíticos o por una reducción del metabolismo en el hígado.

INTERFERENTES O LIMITACIONES

Hemólisis, Ictericia y Lipemia: Triglicéridos \geq 150 mg/dL, Hemólisis y Lipemia interfieren en el ensayo.

Medicamentos: consultar la referencia recomendada (Young, 2000).

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

Sensibilidad:

	Bilirrubina Directa	Bilirrubina Total
Límite de Detección	0,14 mg/dL	0,13 mg/dL
Límite de Cuantificación	0,17 mg/dL	0,18 mg/dL

Especificidad Analítica: El producto determina específicamente Bilirrubina Directa y Total ante la presencia de otras sustancias interferentes en la muestra, hasta las concentraciones indicadas anteriormente.

Exactitud: El método fue comparado con otro similar determinando 40 muestras en duplicado, con los siguientes resultados:

Bilirrubina Directa: Ecuación de regresión: $y = 1,017x - 0,008$ con un coeficiente de correlación $r = 0,9909$. Utilizando esta ecuación el error sistemático total es de 0,9% para un nivel de 1,0 mg/dL y 1,6% para un nivel de 8,0 mg/dL.

Bilirrubina Total: Ecuación de regresión: $y = 1,014x - 0,010$ con un coeficiente de correlación $r = 0,9901$. Utilizando esta ecuación el error sistemático total es de 1,20% para un nivel de 5,0 mg/dL y 1,32% para un nivel de 13,0 mg/dL.

Precisión: Fue determinada utilizando muestras en 3 niveles de decisión, en dos determinaciones diarias en duplicado durante 20 días, con los siguientes resultados:

Muestras (mg/dL)	Repeticiones	Precisión intra-corrida		Precisión total	
		SD (mg/dL)	%CV	SD (mg/dL)	%CV
0,767	80	0,032	4,2	0,039	5,1
3,455	80	0,072	2,1	0,181	5,2
12,218	80	0,067	0,5	0,172	1,4

Muestras (mg/dL)	Repeticiones	Precisión intra-corrida		Precisión total	
		SD (mg/dL)	%CV	SD (mg/dL)	%CV
1,0471	80	0,0135	1,3	0,0135	1,3
5,4074	80	0,0519	1,0	0,0623	1,2
13,4034	80	0,0463	0,3	0,1097	0,8

%CV: Coeficiente de variación expresado en porcentaje; SD: Desviación Estándar

RIESGOS RESIDUALES, CUIDADOS E PRECAUCIONES

- Utilizar los EPI's de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico.
- No mezclar reactivos de lotes diferentes.
- No cambiar las tapas de los frascos de los reactivos, a fin de evitar contaminación cruzada.
- No usar el reactivo cuando presente característica visual en desacuerdo con lo especificado en la FISPQ del producto.
- Evitar dejar los reactivos fuera de las condiciones de almacenamiento especificadas, cuando los mismos no estén en uso.
- Usar pipetas de vidrio y punteras desechables específicas para cada muestra, control, Standard/calibrador y reactivo.
- Cada laboratorio debe establecer requisitos químicos, microbiológicos y de partículas para el agua antes de su uso en cada una sus aplicaciones y definir las especificaciones o tipos de agua que atiendan sus requisitos. Una vez que la pureza requerida fue establecida, el sistema de purificación debe ser validado y es importante para asegurar que el agua resultante continúa atendiendo las especificaciones implementando controles periódicos.
- La limpieza y secado adecuados del material utilizado son factores fundamentales para la estabilidad de los reactivos y obtención de resultados correctos.

INTERVALO DE REFERENCIA

Recién nacido	Bilirrubina Total (mg/dL)	
Edad	Prematuro	A término
0-1 día	1,0 a 8,0	2,0 a 6,0

1-2 días	6,0 a 12,0	6,0 a 10,0
3-5 días	10,0 a 14,0	4,0 a 8,0

Adultos		mg/dL
Bilirrubina Directa		0,0 a 0,2
Bilirrubina Total		0,0 a 2,0

Estos valores son únicamente para orientación, siendo recomendable que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

MATERIAL NECESARIO PARA REALIZAR EL ENSAYO

- Espectrofotómetro o fotómetro para lectura en 550 nm (530-570).
- Pipetas de vidrio y/o automáticas.
- Tubos de ensayo.
- Reloj o Cronómetro.

ALERTAS Y PRECAUCIONES PARA EL DESCARTE DEL PRODUCTO

- Las informaciones de Descarte, Seguridad y Primeros Socorros están descritas en la Ficha Individual de Seguridad de Productos Químicos (FISPQ) de este producto, disponible en www.bioteecnica.ind.br o por el teléfono +55 35 3214 4646.
- Desear las sobras de las reacciones de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio Clínico (BPLC) y Programa de Gestión de Residuos de Servicio de Salud (PGRSS).

GARANTÍA DE CALIDAD / SAC - SERVICIO DE ASISTENCIA AL CLIENTE

Antes de ser liberados para el consumo, todos los reactivos Biotécnica son ensayados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de vencimiento mencionada en el envase, desde que almacenados y transportados en las condiciones especificadas. Los datos relativos al Control de Calidad de este producto (lote impreso en las etiquetas de los frascos de reactivos) o cualquier duda en la utilización de este kit, entrar en contacto con la Asesoría Científica de la Biotécnica Ltda, a través del teléfono +55 35 3214 4646 o por el mail sac@biotecnicatda.com.br.

AUTOMACIÓN

Este procedimiento es automatizado en la mayoría de los analizadores.

Los protocolos están disponibles en www.bioteecnica.ind.br.

APRESENTACIONES / PRESENTATIONS / PRESENTACIONES

1	RBD RBT RNI	1 x 50 mL 1 x 50 mL 1 x 6 mL		50 (1 mL)
2	RBD RBT RNI	1 x 250 mL 1 x 250 mL 1 x 27 mL		250 (1 mL)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES/REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. Tietz: Fundamentos de Química Clínica. 6. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2008. 959 p.
- DOUMAS, et al. Candidate Reference Method for Determination of Total Bilirubin in Serum: Development and Validation. *Clin.Chem.* 31/11, 1779-1789 (1985).
- MALLOY H. T.; EVELYN K. A. The Determination of Interference by bilirubin with photoelectric colorimeter. *J. Biol. Chem.* v.119, p.481-90, 1937.
- SHULL, B.C.; LEES, H.; LI, P.K. Mechanism of Interference by Hemoglobin in the Determination of Total Bilirubin. I. Method of Malloy-Evelyn. *Clin.Chem.* 26/1, 22-25 (1980).
- WESTGARD, J. O. et al. A multi-rule shewhart chart quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* v.27, 493-501, 1981.
- YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2, 5 ed. Washington DC: AAC Press, 2000.

TABELA DE SÍMBOLOS INTERNACIONAIS / TABLE OF INTERNATIONAL SYMBOLS / TABELA DE SÍMBOLOS INTERNACIONALES

	Consultar Instruções de Uso Consult Instructions for use Consultar Instrucciones de Uso		Conteúdo suficiente para «v»-testes Contains sufficient for «v»-tests Conteúdo suficiente para «v»ensayos
REF	Código Code Código		Límite de temperatura Temperature limit Temperatura limite
LOT	Numero de lote Batch code Denominación de lote		Data limite de utilização (último dia do mês) Use by (last day of the month) Estable hasta (ultimo día del mes)
IVD	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i> For <i>in vitro</i> diagnostic medical device Para uso en diagnóstico <i>in vitro</i>		Nevo / Irritante Harmful / Irritant Nevo / Irritante
R	Reagente e seu número/abreviação Reagent and its number/abbreviation Reactivo y su número/abreviación		Corrosivo Corrosive Corrosivo
	Reagente e seu número/abreviação Reagent and its number/abbreviation Reactivo y su número/abreviación		Fabricado por Manufactured by Elaborado por