



## BIURRUBI NA DRETA E TOTAL

Responsible Técnico: Dr. Gílson Sérgio Rozo
CRF MG - 5310
MS 80027310205

Kit destinado a detecção de Bilirrubina Direta e Total no soro. Uso em diagnóstico in vitro

- CONDICÕES 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 detecção baseada na reação do azul que quantifica colorimetricamente a formação de azobilirrubina, de coloração vermelha, quando a bilirrubina reagida sob determinadas condições com o sulfanilico é azotada. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de bilirrubina na amostra. Na presença de metil sulfóxido (acelerador reagente para a indireta (não conjugada) e a forma direta (monocorada, direta conjugada e ligada à proteína), detectando-se a Bilirrubina Total. A forma direta é detectada 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

Table with 2 columns: Symbol (RBD, RBT, RNI) and Description (Azul de sulfanilico > 10mmol/L, etc.)

ESTABILIDADE E MUISO
- Após abertura o produto (RBD, RBT e RN) é estável até a validade impressa no rótulo q, desde que seguiu as condições de armazenamento e recomendadas (2 a 8°C).
- Os reagentes devem permanecer fora da temperatura especificada somente o tempo necessário para a realização dos testes.

TREATAMENTO E MANUSEIO DO PRODUTO
A) PREPARAÇÃO DOS REAGENTES
RBD, RBT e RN: 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 controle 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 Laboratório recomenda-se o uso do soro cali-brador e dos soros controle abaixo.
Soro Cali-brador - Autocal H 13.002.00
Soro Controle e Norm ml - Quanti nor ml 13.003.00
Soro Controle e Pad d g - Co - Quanti d t 13.004.00

PROCEDIMENTO DE ENSAIO, CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO
A) BIURRUBINA DIRETA
1. Pipetar em tubos de ensaio

Table with 4 columns: Sample, Branco, Branco Amostra, Amostra. Rows for RBD, RN, and Amostra/Calibrador.

- 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) BIURRUBINA TOTAL
1. Pipetar em tubos de ensaio
Table with 3 columns: Sample, Branco, Branco Amostra, Amostra. Rows for RBT, RN, and Amostra/Calibrador.
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 cali-brador Autocal H Ref. 13.002.00. A concentração de Bilirrubina no cali-brador é rastreável ao Standard Reference Material (SRM) 916a do National Institute of Standards and Technology (NIST).

D) CÁLCULOS
Bilirrubina (ng/dL) = (Abs. Amostra - Abs. Branco Amostra) x Valor Cali-brador (ng/dL) / (Abs. Cali-brador - Abs. Branco Cali-brador)

Exemplo
Concentração do Cali-brador = 4,62 ng/dL
Absorbância da Amostra = 0,194
Absorbância do Branco da Amostra = 0,040
Absorbância do Cali-brador = 0,234
Absorbância do Branco Cali-brador = 0,024
Bilirrubina (ng/dL) = (0,194 - 0,040) x 4,62 = 3,39 ng/dL
0,234 - 0,024

Coeficiente de Calibração
Fator de Calibração = Concentração Cali-brador (mg/dL) / (Abs. Cali-brador - Abs. Branco Cali-brador)

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

Exemplo
Fator de Calibração = 4,62 = 22
0,234 - 0,024

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

E) INTERPRETAÇÃO
A bilirrubina é um pigmento derivado da degradação do hem. 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 glucuronídeos 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 crônica. O aumento da bilirrubina não conjugada (indireta) geralmente é causado por processos hemolíticos ou por uma redução do metabolismo no fígado.

INTERFERÊNCIAS OU LIMITAÇÕES
Hemólise, Ictericidade e Ipernia: Triglicérides ≥ 150 mg/dL, Hemólise interfere nas dosagens de Bilirrubina Direta e Bilirrubina Total.

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

Table with 3 columns: Sample, Bilirrubina Direta, Bilirrubina Total. Rows for Limit of Detection and Limit of Quantification.

Especificidade Analítica: O produto detecta na especificamente a Bilirrubina Direta e Total na presença de outras substâncias interferentes na amostra, até as concentrações inferiores adadas.

Exatidão: O método foi comparado com método similar pela detecção de 40 amostras e 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 coridas em duplicata por dia durante 20 dias, sendo obtidos:

Table with 5 columns: Amostrs (ng/dL), Repetições, Pred são intra-corrida SD (ng/dL) %CV, Pred são total SD (ng/dL) %CV. Rows for 0,767, 3,455, 12,218.

Table with 5 columns: Amostrs (ng/dL), Repetições, Pred são intra-corrida SD (mg/dL) %CV, Pred são total SD (mg/dL) %CV. Rows for 1,0471, 5,4074.

Table with 6 columns: 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 EP'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 RSPQ do produto.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenament especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis específicos para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O laboratório deve estabelecer os requisitos químicos, microbiológicos e de partícula para a água antes do seu uso para uma das suas aplicações e deve definir as especificações ou tipos de água que atenda. Uma vez que a pureza necessária a tenha sido definida, o sistema de purificação deve ser validado e 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.

Table with 3 columns: Recém nascido, Idade, Pre maturo, Ter mo. Rows for 0-1 dia, 1-2 dias, 3-5 dias.

Table with 2 columns: Adultos, mg/dL. Rows for Bilirrubina Direta, Bilirrubina Total.

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 instruções de Descarte, Segurança e Precauções Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (RSPQ) deste produto disponível em www.biocentrica.ind.br 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 Biocétrica 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 de sena-automáticos com preparo de Reagentes de Trabalho, dados relativos ao Controle de Qualidade deste produto (lote impresso nas etiquetas dos frascos de reagentes) ou qual quer dúvida na utilização deste kit, entrar em contato com a Assessoria Genética da Biocétrica Ltda, através do telefone +55 35 3214 4646 ou pelo email sac@biocentrica.com.br

AUTOMAÇÃO
Este procedimento é automatizável na maioria dos analisadores.
Os procedimentos estão disponíveis em www.biocentrica.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 azo reaction, which colorimetrically quantifies the reaction of azobilirrubina when bilirubin reacts under certain conditions with azotized sulfanilic acid. The intensity of the formed color is proportional to the concentration of bilirubin in the sample and in the presence of methyl sulfoxide (accelerator), the indirect form (unconjugated) and the direct form (nonconjugated, conjugated 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.

Table with 2 columns: Symbol (RBD, RBT, RNI) and Description (Sulfamic acid > 10mmol/L, hydrochloric acid > 0.5% v/v, etc.)

STABILITY IN USE
- Once opened, the product (RBD, RBT and RN) 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 RN: Ready-to-use reagents.

B) OPERATIONAL INTERVAL
The operational 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 mM 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
Norma Control Serum Quantinorm 13.003.00
Serum Pathologic Control - Quanti d t 13.004.00

TEST PROCEDURE, CALCULATION AND INTERPRETATION

Table with 4 columns: Symbol (RBD, RN, Sample/Calibrador) and Description (B ank, Blank Sample, Sample). Rows for 1,0 mL, 30 µL, 50 µL.

2. Homogenize well and keep the tubes for 5 minutes at room temperature.
3. Measure the absorbance of the Calibrador, Calibrador Blank, Sample and Sample Blank again at 550 nm (530-570). Color is stable for 5 minutes.

Table with 4 columns: Symbol (RBT, RN, Sample/Calibrador) and Description (B ank, Blank Sample, Sample). Rows for 1,0 mL, 30 µL, 50 µL.

2. Homogenize well and keep the tubes for 5 minutes at room temperature.
3. Measure the absorbance of the Calibrador, Calibrador White, Sample and Sample Blank again 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
Bilirrubina (ng / dL) = (Sample Abs - Sample White Abs) x Calibrador Value (ng / dL) / (Calibrador Abs - White Calibrador Abs)

Exemplo
Calibrador Concentration = 4,62 mg / dL
Sample Absorbance = 0,194
Sample Blank Absorbance = 0,040
Calibrador Absorbance = 0,234
Absorbance Blank Calibrador = 0,024
Bilirrubina (ng / dL) = 0,194 - 0,040 x 4,62 = 3,39 ng / dL
0,234 - 0,024

With Calibrators Factor
Calibrators Factor = Calibrador Concentration (mg / dL) / (Calibrador Abs - White Calibrador Abs)

Bilirrubina (ng / dL) = (Sample Abs - Abs Sample White) x Calibrators Factor
Exemplo
Calibrators Factor = 4,62 = 22
0,234 - 0,024
Bilirrubina (ng / dL) = (0,194 - 0,040) x 22 = 3,39 ng / dL.

Q) INTERPRETATION
Bilirubin is a pigment derived from hemoglobin 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 > 150 ng / 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
Detect on 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:

**Direct Bilirubin**

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

**Total Bilirubin**

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 RISKS, WARNINGS AND PRECAUTIONS**

- Use PPE according to Good Clinical Laboratory Practice
- Do not mix reagents from different lots.
- Do not exchange reagent bottles 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 ( ng/dL )	
Age	Pre mature	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.
- Cock or Stopwatch.
- Test tubes.

**ALERTS AND PRECAUTIONS REGARDING PRODUCT DISPOSAL**

• Dispose, Safety and First Aid information are described in the Individual Product Safety Data Sheet (MSDS) for this product, available at [www.bioteccalindbr.com](http://www.bioteccalindbr.com) or by telephone (35) - 3214-4646.

• Dispose of leftover reactions in accordance with Good Clinical Laboratory Practice (BPLC) and Health Service Waste Management Program (PGSS).

**QUALITY ASSURANCE / CUSTOMER TECHNICAL SERVICE**

Before being approved for use Biotecca reagents are tested in the Quality Control Department. The quality of the reagents is assured up to the expiry 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 Biotecca Ltda, by phone +55 35 3214 4646 or by email [sac@bioteccaltda.com.br](mailto:sac@bioteccaltda.com.br).

**AUTOMATION**

This procedure is automated in most analyzers. The applications are available at [www.bioteccaltda.ind.br](http://www.bioteccaltda.ind.br)

**ESPAÑOL**

**FRANCUÉS**

**ITALIANO**

**DEUTSCH**

**PORTUGUÊS**

**CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD**

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

**PROCEDIMIENTO DEL MÉTODO**

La detección inicial se basa en la reacción de azúcar, que cuantifica cada métrica mediante la formación de azobilirubina, de color dorado, cuando la bilirrubina en reacción bajo determinadas condiciones con ácido sulfanílico de azotado. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina en la muestra. En presencia de metilsulfóxido (acetarador) reacciona con la forma indirecta (no conjugada) y la forma directa (monocongugada, biconjugada y la fracción unida a proteínas), determinándose la Bilirrubina Total. La forma directa se determina sin acetarador.

**MUESTRAS: TIPO, COLECCIÓN, MANEJO, 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 infeccioso. Inmediatamente después de recolectada, proteger la muestra de la acción de la luz.

**Conservación:** La bilirrubina en suero, es estable y se conserva en temperatura de 4 a 8 ° C 6 meses a -20 ° C.

**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO**

RBD	BT	RNI
Ácido sulfanílico > 10 mmol/L, ácido ortofosfórico > 0.5 % v/v.	Ácido sulfanílico > 10 mmol/L, ácido ortofosfórico > 0.1 % v/v, metilsulfóxido > 30 % v/v.	Nitrito de sodio > 10 mmol/L, (sacarosa > 2 mg/L), conservante.

**ESTABILIDAD EN USO**

- Después de abrir el producto (RBD, RBT, RN) en uso se 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 RN:** 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 control de debe ser práctica rutinaria en el laboratorio. Se sugiere usar un control en el intervalo de referencia o decisión y otro con valor de significación clínica. 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 - Cuantitativo	13.003.00
Suero Control Patológico - Cuantitativo	13.004.00

**PROCEDIMIENTO DE ENSAYO, CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN**

**A) BIURUBINA DIRECTA**

1. Patear en tubos de ensayo:

	Blanco	Banco Muestra	Muestra
RBD	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RN	---	---	30 µL
Muestra/Calibrador	---	50 µL	50 µL

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

**B) BIURUBINA TOTAL**

1. Patear en tubos de ensayo:

	Blanco	Banco Muestra	Muestra
RBT	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
RN	---	---	30 µL
Muestra/Calibrador	---	50 µL	50 µL

- Homogeneizar bien en cubrar los tubos 5 minutos en temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia del Calibrador, Banco de Calibrador, Muestra y Banco de Muestra elevando a cero el aparato con el Banco 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 se rastrea en el Standard Reference Material (SRM) 916a del National Institute of Standards and Technology (NIST).

**D) CÁLCULOS**

Bilirrubina (ng/dL) =  $\frac{(\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Banco Muestra}) \times \text{Val or Calibrador (ng/dL)}}{(\text{Abs. Calibrador} - \text{Abs. Banco Calibrador})}$

**Ejemplo**

Concentración del Calibrador = 4.62 mg/dL  
Absorbancia de la Muestra = 0.194  
Absorbancia de Banco Muestra = 0.040  
Absorbancia del Calibrador = 0.234  
Absorbancia del Banco Calibrador = 0.024  
Bilirrubina (ng/dL) =  $\frac{0.194 - 0.040}{0.234 - 0.024} \times 4.62 = 3.39 \text{ mg/dL}$

**Con Factor de Calibración**

Factor de Calibración =  $\frac{\text{Concentración Calibrador (mg/dL)}}{(\text{Abs. Calibrador} - \text{Abs. Banco Calibrador})}$   
Bilirrubina (ng/dL) =  $(\text{Abs. Muestra} - \text{Abs. Banco Muestra}) \times \text{Factor de Calibración}$

**Ejemplo**

Factor de Calibración =  $\frac{4.62}{0.234 - 0.024} = 22$   
Bilirrubina (ng/dL) =  $(0.194 - 0.040) \times 22 = 3.39 \text{ mg/dL}$

**Q) INTERPRETACIÓN**

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

**INTERFERENCIAS O LIMITACIONES**

**Hemólisis, Ictericidad y Lipemia:** Triglicéridos > 150 mg/dL, Hemólisis y Lipemia interfieren en el ensayo.

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

**CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO**

**Sensibilidad:**

Límite de Detección	Bilirrubina Directa	Bilirrubina Total
	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 que interfieren en la muestra, hasta las concentraciones indicadas anteriormente.

**Exactitud:** El método fue comparado con otros similares 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:

**Bilirrubina Directa:**

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

**Bilirrubina Total:**

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

**RESGOS RESIDUALES, CUADROS Y PRECAUCIONES**

- Utilizar los ER'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, afin de evitar contaminación cruzada.
- No usar el reactivo cuando presente característica visual en desacuerdo con lo especificado en la RSPQ 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 a las especificaciones y mantener control de períodos.
- 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**

Reducción de	Bilirrubina Total (ng/dL)	
Edad	Pre maturo	Adulto

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 o automáticas.
- Tubos de ensayo.
- Reloj 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 (RSPQ) de este producto, disponible en [www.bioteccalindbr.com](http://www.bioteccalindbr.com) o por el teléfono +55 (35)-3214-4646.
- Deshechar 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 Biotecca 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 (objetivos 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 Biotecca Ltda, a través del teléfono +55 35 3214 4646 o por el email [sac@bioteccaltda.com.br](mailto:sac@bioteccaltda.com.br)

**AUTOMACIÓN**

Este procedimiento es automatizado en la mayoría de los analizadores. Los protocolos están disponibles en [www.bioteccaltda.com.br](http://www.bioteccaltda.com.br).

**PRESENTACIONES / PRESENTACIONES / PRESENTACIONES**

1	RBD RBT RN	1 x 50 mL 1 x 50 mL 1 x 5 mL		50 (1 mL)
2	RBD RBT RN	1 x 250 mL 1 x 250 mL 2 x 13 mL		250 (1 mL)

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS / REFERENCIAS / REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BURTS, CA; ASHWOOD, ER; BRUNS, DE Tietz: Fundamentos de Química Clínica 6. ed. R de Janeiro Saunders Bréveir, 2008. 959 p.
- DOUMAS, et al. Candate Reference Method for Determination of Total Bilirubin in Serum Development and Validation. **Clin Chem** 31/11, 1779-1789 (1985).
- MALLOY H.; EVELYN K A The Determination of Bilirubin with photometric colorimeter. **J. Biol. Chem** v.119, p.481-90. 1937.
- SHULL, B; C; LEES, H; U, P.K. Mechanism of interference by Hemoglobin in the Determination of Total Bilirubin in. **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 p.493-501, 1981.
- YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2. 5 ed. Washington DC: AACCPress, 2003.

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

	Consultar Instruções de Uso Consult Instructions for use Consultar Instrucciones de Uso		Conteúdo suficiente para <=> testes Content is sufficient for <=> tests Conteúdo suficiente para <=> ensaios
<b>REF</b>	Código Code Código		Límite de temperatura Temperatura limite Temperatura limite
<b>LOT</b>	Número del lote Batch code Denominación del lote		Data límite de utilização (último día do mês) Use by (last day of the month) Estable hasta (último día del mes)
<b>IVD</b>	Para uso diagnóstico <i>in vitro</i> <i>For in vitro</i> diagnóstico médico Para uso diagnóstico <i>in vitro</i>		Noivo/Irritante Harml/Irritant Noivo/Irritante
<b>R</b> <->	Reagente e seu número de abreviação Reagent and its number/abreviação Reactivo y su número de abreviación		Corrosivo Corrosive Corrosivo