



Bilirrubina Direta e Total
 Direct & Total Bilirubin | Responsável Técnico:
 Dr. Gilson Sérgio Pizzo
 Bilirrubina Directa y Total
 Ref. 10.003.00
 CRF MG – 5310
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 dimetilsulfoxido (acelerador) reagem a forma indireta (não-conjugada) e a forma direta (monoconjugada, dicongugada 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, Dimetilsulfoxido ≥ 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	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 absorvância 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 absorvância 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) = $\frac{(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco Amostra})}{(\text{Abs. Calibrador} - \text{Abs. Branco Calibrador})} \times \text{Valor Calibrador (mg/dL)}$

Exemplo:
 Concentração do Calibrador = 4,62 mg/dL
 Absorvância da Amostra = 0,194
 Absorvância Branco da Amostra = 0,040
 Absorvância do Calibrador = 0,234
 Absorvância Branco Calibrador = 0,024
 Bilirrubina (mg/dL) = $\frac{0,194 - 0,040}{0,234 - 0,024} \times 4,62 = 3,39$ 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

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, Ictericia 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 os 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.biotecnica.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@biotecnicaltda.com.br

AUTOMATICAÇÃO
 Este procedimento é automatizável na maioria dos analisadores. Os protocolos estão disponíveis em www.biotecnica.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, diconguate 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 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 Laboratorial 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 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) CALBRATION
 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) = $\frac{(\text{Sample Abs} - \text{Sample White Abs})}{(\text{Calibrator Abs} - \text{White Calibrator Abs})} \times \text{Calibrator Value (mg / dL)}$

Example:
 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) = $\frac{0,194 - 0,040}{0,234 - 0,024} \times 4,62 = 3,39$ 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

Example:
 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.

