

BILIRRUBINA

REF K005

INSTRUÇÕES DE USO



FINALIDADE

Método para determinação da Bilirrubina Direta e Total. Teste colorimétrico, somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Sims - Horn

A Bilirrubina, através da reação de acoplamento com o Ácido Sulfanílico Diazotado forma um complexo de coloração vermelha (Azobilirrubina). A Bilirrubina Total (Direta e Indireta) é dosada em presença de um acelerador (Cafeína e Benzoato), que permite a solubilização da Bilirrubina Indireta (não conjugada), insolúvel em água. A Bilirrubina Direta (conjugada) é dosada em meio aquoso.

REAGENTES

Número 1 - Nitrito de Sódio - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Nitrito de Sódio < 250 mmol/L.

Número 2 - Reagente Sulfanílico - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Ácido Sulfanílico < 20 mmol/L e Ácido Clorídrico < 300 mmol/L.

Número 3 - Acelerador - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Acetato de Sódio Anidro < 3 mol/L, Benzoato de Sódio < 2 mol/L, Cafeína Anidra < 700 mmol/L e surfactante.

APRESENTAÇÃO

Reagente	Volume
Nº 1	5 mL
Nº 2	125 mL
Nº 3	250 mL

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Espectrofotômetro ou colorímetro, relógio ou cronômetro, pipetas, tubos de ensaio, kit Bilirrubina Calibração Bioclin, Biocontrol N e Biocontrol P Bioclin. Encontram-se no mercado especializado de artigos para Laboratórios de Análises Clínicas.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento e transporte deverá ser de 15 a 30°C. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso diagnóstico *in vitro* profissional.

2- Seguir com rigor a metodologia proposta para obtenção de resultados exatos.

3- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.

4- Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados.

5- A calibração deve ser repetida periodicamente para verificar alguma alteração na resposta do colorímetro ou do espectrofotômetro.

6- Hemólise, mesmo discreta, interfere na dosagem.

7- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

8- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

9- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

10- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Soro ou plasma (EDTA ou Heparina) livres de hemólise. **A amostra deve ser protegida da luz.** O analito é estável por 3 dias entre 2 e 8°C, e 3 meses a -20°C. A amostra para controle terapêutico deve ser colhida sempre no mesmo horário.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DO DIAZO REAGENTE

Adicionar 1 gota do Reagente Nº 1 a 1,5 mL do Reagente Nº 2. Homogeneizar bem e usar somente no dia do seu preparo.

TÉCNICA

A Bioclin recomenda, para uso do kit, utilizar como calibrador o kit Bilirrubina Calibração Bioclin e como soro controle os kits Biocontrol N e P Bioclin.

TÉCNICA MACRO

Rotular 3 tubos de ensaio como “B” (Branco), “BD” (Bilirrubina Direta) e “BT” (Bilirrubina Total), e proceder como a seguir:

	Branco	BD	BT
Reagente Nº 2	500 µL	---	---
Diazo Reagente	---	500 µL	500 µL
Água Destilada	4,5 mL	4,5 mL	---
Reagente Nº3	---	---	4,5 mL
Amostra	300 µL	300 µL	300 µL

Homogeneizar por agitação, esperar 5 minutos e ler as absorbâncias das Bilirrubinas Direta e Total em 525 nm (500 - 550 nm), ajustando o zero com o branco.

A cor permanece estável por 30 minutos.

Os valores em mg/dL para as Bilirrubinas Direta e Total são obtidos utilizando o Fator de Calibração MACRO, obtido com o Kit Bilirrubina Calibração Bioclin.

TÉCNICA MICRO

Utilizada para dosagem de Bilirrubina com concentração superior a 10 mg/dL (soro de recém-nascidos ictericos). Usar micropipeta de 0,05 mL para pipetar o soro.

Rotular 3 tubos de ensaio como na Técnica Macro e proceder como a seguir:

	Branco	BD	BT
Reagente Nº 2	150 µL	---	---
Diazo Reagente	---	150 µL	150 µL
Água Destilada	1,8 mL	1,8 mL	---
Reagente Nº 3	---	---	1,8 mL
Amostra	50 µL	50 µL	50 µL

Homogeneizar por agitação, esperar por 5 minutos e ler as respectivas absorbâncias das Bilirrubinas Direta e Total em 525 nm (500 - 550 nm), ajustando o zero com o branco. A cor é estável por 30 minutos.

Os valores em mg/dL para as Bilirrubinas Direta e Total são obtidos utilizando o Fator de Calibração MICRO, obtido com o kit Bilirrubina Calibração Bioclin.

CÁLCULOS

Utilizando o kit Bilirrubina Calibração Bioclin*, efetuar o cálculo do fator. Realizar cálculos distintos para a técnica Macro e para a técnica Micro.

Fator de Calibração = $\frac{\text{Concentração do Padrão}^* (10 \text{ mg/dL})}{\text{Absorbância do Padrão}^* (\text{média})}$

mg/dL = Absorbância da Amostra x Fator de Calibração

Bilirrubina Indireta = Bilirrubina Total – Bilirrubina Direta

Exemplo:

Absorbância Média do Padrão = 0,480

Absorbância da Amostra p/ Bilirrubina Total = 0,045

Absorbância da Amostra p/ Bilirrubina Direta = 0,012

Fator de Calibração = $\frac{10 \text{ mg/dL}}{0,480} = 20,83$

Bilirrubina Total = 0,045 x 20,83 = 0,93

Bilirrubina Direta = 0,012 x 20,83 = 0,25

Bilirrubina Indireta = 0,93 - 0,25 = 0,68

LIMITAÇÕES DO PROCESSO

Não utilizar a técnica Micro para valores de Bilirrubina inferiores a 10 mg/dL.

INTERFERENTES

Amostras com hemólise mesmo que discreta interferem na dosagem de Bilirrubina. Algumas drogas como Esteróides Anabolizantes, Ácido Ascórbico, Salicilatos e Vitamina A podem elevar os valores de Bilirrubina. A Cafeína e as Penicilinas podem interferir nas dosagens, diminuindo os valores de Bilirrubina.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

O Laboratório Clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, onde procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente estabelecidos. É importante ressaltar que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica característica, que deve ser monitorada pelos próprios laboratórios. Para tanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens.

RASTREABILIDADE

A Bioclin recomenda o uso do kit Bilirrubina Calibração Bioclin, que é rastreável ao material de referência SRM 916A do NIST (National Institute of Standards and Technology).

VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência, em mg/dL, para o presente método, foram obtidos através da determinação de Bilirrubina em populações sadias do sexo masculino e feminino.

Adulto	
Total	0,1 - 1,2 mg/dL
Direta	até 0,4 mg/dL
Indireta	0,1 - 0,8 mg/dL

Neonatos e Crianças		
Bilirrubina Total	24 h	< 8,8 mg/dL
	2º dia	1,3 - 11,3 mg/dL
	3º dia	0,7 - 12,7 mg/dL
	4º ao 6º dia	10,1 - 12,6 mg/dL
	Crianças > 1 mês	0,2 - 1,0 mg/dL
Bilirrubina Direta	Neonatos e Crianças	até 0,4 mg/dL

Para converter os valores de mg/dL para mmol/L (SI) multiplicar por 0,0171.

Estes valores devem ser usados como orientação, sendo que cada laboratório deverá criar sua faixa de valores de referência, de acordo com a população atendida.

Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

DESEMPENHO DO PRODUTO
CONTROLE DE QUALIDADE

Exatidão
RECUPERAÇÃO

A análise de recuperação foi feita com 05 determinações de amostras. As exatidões foram calculadas, e se encontraram em boa concordância com os valores de referência, obtendo uma recuperação entre 95 e 103%.

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE
METODOLÓGICA

O kit Bilirrubina foi comparado com outros métodos para dosagem de Bilirrubina Total e Direta. Foram realizadas 07 análises e os resultados foram avaliados. Para Bilirrubina Total a equação linear obtida foi $Y = 0,974X + 0,025$ e o coeficiente de correlação 0,998. Para Bilirrubina Direta a equação linear obtida foi $Y = 1,029X - 0,004$ e o coeficiente de correlação 0,997.

Precisão
REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

Bilirrubina Direta			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,22	0,32	0,84
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coeficiente de Variação (%)	3,61	2,47	0,94

Bilirrubina Total			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,43	1,04	3,23
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coeficiente de Variação (%)	2,23	1,02	0,37

REPRODUTIBILIDADE

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 3 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

Bilirrubina Direta			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,22	0,32	0,84
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coeficiente de Variação (%)	2,59	1,79	0,69

Bilirrubina Total			
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,43	1,03	3,21
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,03
Coeficiente de Variação (%)	1,33	0,56	0,90

Sensibilidade

A sensibilidade foi calculada a partir de 20 determinações de uma amostra isenta de Bilirrubina Total e Direta. A média de Bilirrubina Total encontrada foi 0,03600 mg/dL, com desvio padrão de 0,02542 mg/dL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde a média mais 3 vezes o desvio padrão, e é igual a 0,11227 mg/dL. A média de Bilirrubina Direta encontrada foi 0,0330 mg/dL, com desvio padrão de 0,0047 mg/dL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde a média mais 3 vezes o desvio padrão, e é igual a 0,0471 mg/dL.

Linearidade

A reação é linear até 15 mg/dL na Técnica Macro e 45 mg/dL na Técnica Micro. Para valores maiores, diluir a amostra com NaCl 0,85 % e repetir a dosagem. Multiplicar o resultado pelo fator de diluição.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

A Bilirrubina eleva-se no soro na presença de lesões hepáticas, obstrução biliar ou quando a velocidade de destruição dos glóbulos vermelhos está aumentada. O aumento da Bilirrubina Indireta é observado na síndrome hemolítica, na icterícia neonatal, na síndrome de Cligler- Najjar e na doença de Gilbert. A Bilirrubina Direta está aumentada nas hepatites agudas e crônicas, nas reações tóxicas a várias drogas (Clorpromazina, Arsenicais Orgânicos, Metiltestosterona) e nas obstruções do trato biliar.

NÚMERO DE TESTES

110 Testes / 300 µL de Amostra
276 Testes / 50 µL de Amostra

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - JENDRASSIK, H. T. e Grof, P. : Biochem. Zentr. 297:81, 1938.
- 2 - MALLOY, H. T. e EVELYN, K. A. - J. Biol. Chem. 119:481, 1937.
- 3 - MARTINEK, R. G., Clin. Chem. Acta 13, 161, 1966.
- 4 - POWELL, W. N., Am. J. Clin. Path. 8, 55, 1944.
- 5 - SIMS, F. H. e Horn, C., Am. J. Clin. Path. 29, 412, 1958.
- 6 - TONKS, D. B., Clin. Chem. 9, 217, 1983.

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os reagentes **Bioclin** 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 adequadas.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax: (31) 3439.5455
E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

EC REP **OBELIS S.A.**

Bd. Général Wahis, 53
1030 Brussels, Belgium

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente
Tel.: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do kit Bilirrubina na ANVISA:
10269360083

Revisão: Janeiro/2020

SIMBOLOGIA UNIVERSAL



NÚMERO DE CATÁLOGO



FABRICADO POR



NÚMERO DO LOTE



CONTROLE



DATA DE FABRICAÇÃO



CONTROLE POSITIVO



DATA DE VALIDADE
(último dia do mês)



CONTROLE NEGATIVO



LIMITE DE TEMPERATURA
(conservar a)



RISCO BIOLÓGICO



O CONTEÚDO É SUFICIENTE
PARA <N> TESTES



INFLÂMAVEL



CONSULTAR INSTRUÇÕES
DE USO



CORROSIVO



PRODUTO PARA
DIAGNÓSTICO IN VITRO



TÓXICO



REPRESENTANTE
EUROPEU AUTORIZADO



MARCA CE



PROTEGER DA
LUZ E CALOR



NÃO UTILIZAR SE A
EMBALAGEM ESTIVER
DANIFICADA



BILIRRUBINA

REF K005

INSTRUCCIONES DE USO

FINALIDAD

Método para la determinación de la Bilirrubina Directa y Total. Test colorimétrico, solamente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

Metodología: Sims - Horn

La Bilirrubina, através de la reacción de acoplamiento con el Ácido Sulfanílico Diazotado forma un complejo de coloración rojo (Azobilirrubina). La Bilirrubina Total (Directa e Indirecta) es dosificada en presencia de un acelerador (Cafeína y Benzoato), que permite la solubilización de la Bilirrubina Indirecta (no conjugada), insoluble en agua. La Bilirrubina Directa (conjugada) es dosificado en medio acuoso.

REACTIVOS

Número 1 - Nitrito de Sodio - Almacenar entre 15 y 30°C. Contiene: Nitrito de Sodio < 250 mmol/L.

Número 2 - Reactivo Sulfanílico - Almacenar entre 15 y 30°C. Contiene: Ácido Sulfanílico < 20 mmol/L y Ácido Clorídrico < 300 mmol/L.

Número 3 - Acelerador - Almacenar entre 15 y 30°C. Contiene: Acetato de Sodio Anhidro < 3 mol/L, Benzoato de Sodio < 2 mol/L, Cafeína Anhidra < 700 mmol/L y surfactante.

PRESENTACIÓN

Reactivo	Volumen
Nº 1	5 mL
Nº 2	125 mL
Nº 3	250 mL

EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERACIONALES

Espectrofotómetro o colorímetro, reloj o cronómetro, pipetas, tubos de ensayo, kit Bilirrubina Calibración Bioclin, Biocontrol N y Biocontrol P Bioclin. Se encuentran en el mercado especializado de artículos para Laboratorios de Análisis Clínicos.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

La temperatura de almacenamiento y transporte deberá ser de 15 a 30°C. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad.

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso diagnóstico *in vitro* profesional.

2- Seguir con rigor la metodología propuesta para obtención de resultados exatos.

3- El agua utilizada en la limpieza del material debe ser reciente e exenta de agentes contaminantes.

4- Columnas deionizadoras saturadas liberan agua alcalina, iones diversos y agentes oxidantes y reductores, que pueden alterar de forma significativa los resultados.

5- La calibración debe ser repetida periódicamente para verificar alguna alteración en la respuesta del colorímetro o del espectrofotómetro.

6- Hemólisis, mismo discreta, interfiere en la dosificación.
7- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y material biológico se hace de acuerdo con la legislación vigente.

8- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

9- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.
10- Es esencial que los instrumentos y equipos utilizados estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimientos periódicos.

MUESTRAS

Suero o plasma (EDTA o Heparina) libres de hemólisis.
La muestra debe ser protegida de la luz. El analito es estable por 3 días entre 2 y 8°C, y 3 meses la -20°C. La muestra para control terapéutico debe ser cogida siempre en el mismo horario.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

PREPARO DEL DIAZO REACTIVO

Adicionar 1 gota del Reactivo Nº 1 a 1,5 mL del Reactivo Nº 2. Homogenizar bien y usar solamente en el día de su preparo.

TÉCNICA

La Bioclin recomienda, para uso del kit, utilizar como calibrador el kit Bilirrubina Calibración Bioclin y como suero control los kits Biocontrol N y Biocontrol P Bioclin.

TÉCNICA MACRO

Rotular 3 tubos de ensayo como “B” (Blanco), “BD” (Bilirrubina Directa) y “BT” (Bilirrubina Total), y proceder como a seguir:

	Blanco	BD	BT
Reactivo Nº 2	500 μ L	---	---
Diazo Reactivo	---	500 μ L	500 μ L
Agua Destilada	4,5 mL	4,5 mL	---
Reactivo Nº 3	---	---	4,5 mL
Muestra	300 μ L	300 μ L	300 μ L

Homogenizar por agitación, esperar 5 minutos y leer las absorbancias de las Bilirrubinas Directa y Total en 525 nm (500 - 550 nm), ajustando el cero con el Blanco. El color permanece estable por 30 minutos.

Los valores en mg/dL para las Bilirrubinas Directa y Total son obtenidos utilizando el Factor de Calibración MACRO, obtenido con el Kit Bilirrubina Calibración Bioclin.

TÉCNICA MICRO

Utilizada para dosificación de Bilirrubina con concentración superior a 10 mg/dL (suero de recién-nacidos ictericos).

Usar micropipeta de 0,05 mL para pipetear el suero.

Rotular 3 tubos de ensayo como en la Técnica Macro y proceder como sigue:

	Blanco	BD	BT
Reactivo Nº 2	150 μ L	---	---
Diazo Reactivo	---	150 μ L	150 μ L
Agua Destilada	1,8 mL	1,8 mL	---
Reactivo Nº3	---	---	1,8 mL
Muestra	50 μ L	50 μ L	50 μ L

Homogenizar por agitación, esperar por 5 minutos y leer las respectivas absorbancias de las Bilirrubinas Directa y Total en 525 nm (500 - 550 nm), ajustando el cero con el Blanco. El color es estable por 30 minutos.

Los valores en mg/dL para las Bilirrubinas Directa y Total son obtenidos utilizando el Factor de Calibración MICRO, obtenido con el kit Bilirrubina Calibración Bioclin.

CÁLCULOS

Utilizando el kit Bilirrubina Calibración Bioclin*, efectuar el cálculo del factor. Realizar cálculos distintos para la técnica Macro y para la técnica Micro.

Factor de = $\frac{\text{Concentración del Patrón}^* (10 \text{ mg/dL})}{\text{Absorbancia del Patrón}^* (\text{promedio})}$

mg/dL = Absorbancia de la Muestra x Fator de Calibración

Bilirrubina Indirecta = Bilirrubina Total - Bilirrubina Directa

Ejemplo:

Absorbancia Promedio del Patrón = 0,480

Absorbancia de la Muestra p/ Bilirrubina Total = 0,045

Absorbancia de la Muestra p/ Bilirrubina Directa = 0,012

Factor de Calibración = $\frac{10 \text{ mg/dL}}{0,480} = 20,83$

Bilirrubina Total = $0,045 \times 20,83 = 0,93$

Bilirrubina Directa = $0,012 \times 20,83 = 0,25$

Bilirrubina Indirecta = $0,93 - 0,25 = 0,68$

LIMITACIONES DEL PROCESO

No utilizar la técnica Micro para valores de Bilirrubina inferiores a 10 mg/dL.

INTERFERENTES

Muestras con hemólisis mismo que discreta interfieren en la dosificación de Bilirrubina. Algunas drogas como Esteróides Anabolizantes, Ácido Ascórbico, Salicilatos y Vitamina A pueden elevar los valores de Bilirrubina. La Cafeína y las Penicilinas pueden interferir en las dosificaciones, disminuyendo los valores de Bilirrubina.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD

El Laboratorio Clínico debe poseer un programa interno de control de calidad, donde procedimientos, normas, límites y tolerancia para variaciones sean claramente establecidos. Es importante resaltar que todos los sistemas de medición presentan una variabilidad analítica característica, que debe ser vigilada por los propios laboratorios. Por lo tanto, es recomendable la utilización de controles, que permiten la evaluación, la precisión y la exactitud de las dosificaciones.

TRAZABILIDAD

Bioclin recomienda el uso del kit Bilirrubina Calibración Bioclin, que es trazable al material de referencia SRM 916A del NIST (National Institute of Standards and Technology).

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia, en mg/dL, para el presente método, fueron obtenidos através de la determinación de Bilirrubina en poblaciones sanas de sexo masculino y femenino.

Adulto	
Total	0,1 - 1,2 mg/dL
Directa	hasta 0,4 mg/dL
Indirecta	0,1 - 0,8 mg/dL

Neonatos e Niños		
Bilirrubina Total	24 h	< 8,8 mg/dL
	2º día	1,3 - 11,3 mg/dL
	3º día	0,7 - 12,7 mg/dL
	4º al 6º día	10,1 - 12,6 mg/dL
	Niños > 1 mes	0,2 - 1,0 mg/dL
Bilirrubina Directa	Neonatos e Niños	hasta 0,4 mg/dL

Para convertir los valores de mg/dL para mmol/L (SI) multiplicar por 0,0171.

Estos valores deben ser usados como orientación, siendo que cada laboratorio deberá crear su rango de valores de referencia, de acuerdo con la población atendida.

Los resultados proporcionados por este kit deben ser interpretados por el profesional médico responsable, no siendo el único criterio para determinar el diagnóstico y/o tratamiento del paciente.

DESEMPEÑO DEL PRODUCTO
CONTROL DE CALIDAD

Exactitud
RECUPERACIÓN

El análisis de recuperación fue hecha con 05 determinaciones de muestras. Las exactitudes fueron calculadas, y se encontraron en buena concordancia con los valores de referencia, obtenido una recuperación entre 95 y 103%.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y ESPECIFICIDAD
METODOLÓGICA

El kit Bilirrubina fue comparado con otros métodos para dosificación de Bilirrubina Total y Directa. Fueron realizadas 07 análisis y los resultados fueron evaluados. Para Bilirrubina Total la ecuación linear obtenida fue Y = 0,974X + 0,025 y el coeficiente de correlación 0,998. Para Bilirrubina Directa la ecuación linear obtenida fue Y = 1,029X - 0,004 y el coeficiente de correlación 0,997.

Precisión
REPETIBILIDAD

La repetibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

Bilirrubina Directa			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Concentración Promedio(mg/dL)	0,22	0,32	0,84
Desvío Patrón (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coeficiente de Variación (%)	3,61	2,47	0,94

Bilirrubina Total			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Concentración Promedio(mg/dL)	0,43	1,04	3,23
Desvío Patrón(mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coeficiente de Variación (%)	2,23	1,02	0,37

REPRODUCTIBILIDAD

La reproductibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones sucesivas durante 3 días consecutivos, utilizando 3 muestras con concentraciones diferentes, obteniéndose los siguientes resultados:

Bilirrubina Directa			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Concentración Promedio(mg/dL)	0,22	0,32	0,84
Desvío Patrón (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coeficiente de Variación (%)	2,59	1,79	0,69

Bilirrubina Total			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Concentración Promedio(mg/dL)	0,43	1,03	3,21
Desvío Patrón (mg/dL)	0,01	0,01	0,03
Coeficiente de Variación (%)	1,33	0,56	0,90

Sensibilidad

La sensibilidad fue calculada a partir de 20 determinaciones de una muestra exenta de Bilirrubina Total y Directa.

El promedio de Bilirrubina Total encontrado fue 0,03600 mg/dL, con desvío patrón de 0,02542 mg/dL. La sensibilidad, que indica el limite de detección del método, corresponde al promedio más 3 veces el desvío patrón, y es igual a 0,11227 mg/dL. El promedio de Bilirrubina Directa encontrado fue 0,0330 mg/dL, con desvío patrón de 0,0047 mg/dL. La sensibilidad, que indica el limite de detección del método, corresponde al promedio más 3 veces el desvío patrón, y es igual a 0,0471 mg/dL.

Linealidad

La reacción es linear hasta 15 mg/dL en la Técnica Macro y 45 mg/dL en la Técnica Micro. Para valores mayores, diluir la muestra con NaCl 0,85 % y repetir la dosificación. Multiplicar el resultado por el factor de dilución.

SIGNIFICADO DIAGNÓSTICO

La Bilirrubina se eleva en el suero en la presencia de lesiones hepáticas, obstrucción biliar o cuando la velocidad de destrucción de los glóbulos rojos está aumentada. El aumento de la Bilirrubina Indirecta es observado en el síndrome hemolítico, en la ictericia neonatal, en el síndrome de Cligler- Najjar y en la dolencia de Gilbert.

La Bilirrubina Directa está aumentada en las hepatitis agudas y crónicas, en las reacciones tóxicas a várias drogas (Clorpromazina, Arsenicais Orgánicos, Metiltestosterona) y en las obstrucciones del trato biliar.

NÚMERO DE PRUEBAS

110 Pruebas / 300 µL de Muestra
276 Pruebas / 50 µL de Muestra

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - JENDRASSIK, H. T. e Grof, P. : Biochem. Zentr. 297:81, 1938.
- 2 - MALLOY, H. T. e EVELYN, K. A .- J. Biol. Chem. 119:481, 1937.
- 3 - MARTINEK, R. G., Clin. Chem. Acta 13, 161, 1966.
- 4 - POWELL, W. N., Am. J. Clin. Path. 8, 55, 1944.
- 5 - SIMS, F. H. e Horn, C., Am. J. Clin. Path. 29,412,1958.
- 6 - TONKS, D. B., Clin. Chem. 9, 217, 1983.

GARANTÍA DE CALIDAD

Antes de ser liberado para el consumo, todos los reactivos **Bioclin** son probados por el Departamento de Control de Calidad. La calidad de los reactivos es asegurada hasta la fecha de valides mencionada en la caja de presentación, desde que sean almacenados y transportados en condiciones adecuadas.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: +55 (31) 3439.5454 - Fax: +55 (31) 3439.5455
E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Industria Brasileira



OBELIS S.A.

Bd. Général Wahis, 53
1030 Brussels, Belgium

ATENDIMIENTO AL CONSUMIDOR

Servicio de Asesoría al Cliente
Tel.: 08000 315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro del kit Bilirrubina en la ANVISA:
10269360083

Revisión: Enero/2020

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL



NÚMERO DEL CATÁLOGO



ELABORADO POR



NÚMERO DE LOTE



CONTROL



FECHA DE FABRICACIÓN



CONTROL POSITIVO



ESTABLE HASTA
(último día del mês)



CONTROL NEGATIVO



TEMPERATURA LIMITE
(conservar a)



RIESGO BIOLÓGICO



CONTENIDO SUFICIENTE
PARA <N> TESTES



INFLAMABLE



CONSULTAR INSTRUCCIONES
DE USO



CORROSIVO



DISPOSITIVO DE
DIAGNÓSTICO IN VITRO



TÓXICO



EUROPEA REPRESENTANTE
AUTORIZADO



MARCADO CE



PROTEGER DEL
LUZ Y CALOR



NO UTILICE SI EL
EMBALAJE ESTA
DAÑADA



BILIRUBIN

REF K005

USAGE INSTRUCTIONS

FUNCTION

Method for determination of Direct and Total Bilirubin. Colorimetric test, for *in vitro* diagnostic only.

PRINCIPLE OF ACTION

Methodology: Sims - Horn

The Bilirubin through the reaction of attachment with the Sulphanilic Diazotized Acid forms a complex of red color (Azobilirubin). The Total Bilirubin (Direct and Indirect) is dosed in the presence of an accelerator (Caffeine and Benzoate) that allows the solubilization of the Indirect Bilirubin (not conjugated) insoluble in water. The Direct Bilirubin (conjugated) is dosed in a wet environment.

REAGENTS

Number 1 - Sodium Nitrate - Store between 15 and 30°C. Contains: Sodium Nitrate < 250 mmol/L.

Number 2 - Sulphanilic Reagent - Store between 15 and 30°C. Contains: Sulphanilic Acid < 20 mmol/L and Chloridric Acid < 300 mmol/L.

Number 3 - Accelerator - Store between 15 and 30°C. Contains: Anhydrous Sodium Acetate < 3 mol/L, Sodium Benzoate < 2 mol/L, Caffeine Anhydrous < 700 mmol/L and surfactant.

PRESENTATION

Reagent	Volume
Nº 1	5 mL
Nº 2	125 mL
Nº 3	250 mL

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL INPUTS

Spectrophotometers or colorimeter, watch and stopwatch, pipettes, test tubes, Bilirubin Calibration Bioclin kit, Biocontrol N and Biocontrol P Bioclin Kits. They can be found at markets specialized in laboratories of clinical analysis.

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The storage and transport temperature should be between 15 and 30°C. Protect from light and avoid moisture.

SPECIAL CARE

1- For professional *in vitro* diagnostic use only.

2- Strictly follow the methodology proposed to obtain exact results.

3- Water used in material cleaning must be recent and free of contaminants.

4- Saturated deionizer columns release alkaline water, many ions, oxidizing agents and reducers that may alter the results significantly.

5- The calibration shall be repeated periodically to verify any change in the colorimeter response or spectrophotometer.

6- Hemolysis, even discrete, interferes in the dosage.

7- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.

8- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.

9- Do not use the product in case of damaged packaging.

10- It is essential that the instruments and equipments used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Serum or plasma (EDTA or Heparin) free of hemolysis.

Sample must be protected from light. The analyte is stable for 3 days between 2 and 8°C, and 3 months at -20°C. The sample for therapeutical control must be collected always in the same time.

PROCESS DESCRIPTION

DIAZO REAGENT PREPARATION

Add 1 drop of Reagent Nº 1 at 1,5 mL of Reagent Nº 2. Homogenized well and use only on the day of preparation.

TECHNIQUE

Bioclin recommends using the kit Bilirubin Calibration Bioclin as calibrator and as control serum, Biocontrol N and Biocontrol P Bioclin Kits.

MACRO TECHNIQUE

Label 3 test tubes: "B" (Blank), "BD" (Direct Bilirubin) and "BT" (Total Bilirubin) and proceed as follows:

	Blank	BD	BT
Reagent Nº2	500 µL	---	---
Diazo Reagent	---	500 µL	500 µL
Dist. Water	4,5 mL	4,5 mL	---
Reagent Nº3	---	---	4,5 mL
Sample	300 µL	300 µL	300 µL

Homogenize by mixing, wait 5 minutes and read the Total and Direct Bilirubin absorbancies at 525 nm (500 - 550 nm), adjusting the zero with the Blank. The color is stable for 30 minutes.

The values in mg/dL for Direct and Total Bilirubin are obtained by the Calibration Factor MACRO, acquired with the Bilirubin Calibration Bioclin kit.

MICRO TECHNIQUE

Used in bilirubin dosages with concentration superior to 10 mg/dL (jaundiced recently born serum). Use a 0,05 mL micropipette to pipette the serum.

Label 3 test tubes and proceed as follows:

	Blank	BD	BT
Reagent Nº 2	150 µL	---	---
Diazo Reagent	---	150 µL	150 µL
Distilled Water	1,8 mL	1,8 mL	---
Reagent Nº 3	---	---	1,8 mL
Sample	50 µL	50 µL	50 µL

Homogenize by mixing, wait 5 minutes and read the Direct and Total Bilirubin absorbancies at 525 nm (500 - 550 nm), adjusting the zero with the Blank. The color is stable for 30 minutes.

The values in mg/dL for Direct and Total Bilirubin are obtained by the Calibration Factor MACRO, acquired with the Bilirubin Calibration Bioclin kit.

CALCULATIONS

Using the Bilirubin Calibration Bioclin* kit, efectuate the calculation factor. Carry out distinct calculations for Macro technique and Micro technique.

$$\text{Calibration Factor} = \frac{\text{Standard Concentration* (10 mg/dL)}}{\text{Standard Absorbance*}}$$

$$\text{mg/dL} = \text{Sample Absorbance} \times \text{Calibration Factor}$$

$$\text{Indirect Bilirubin} = \text{Total Bilirubin} - \text{Direct Bilirubin}$$

Example:

$$\text{Satndard Average Absorbance} = 0,480$$

$$\text{Total Bilirubin Sample Absorbance} = 0,045$$

$$\text{Direct Bilirubin Sample Absorbance} = 0,012$$

$$\text{Calibration Factor} = \frac{10 \text{ mg/dL}}{0,480} = 20,83$$

$$\text{Total Bilirubin} = 0,045 \times 20,83 = 0,93$$

$$\text{Direct Bilirubin} = 0,012 \times 20,83 = 0,25$$

$$\text{Indirect Bilirubin} = 0,93 - 0,25 = 0,68$$

PROCEDURE LIMITATIONS

Do not use the Macro technique for Bilirubin values below 10 mg/dL.

INTERFERENCES

Samples with Hemolysis, even discrete, interferes in the dosage of Bilirubin. Some compounds as Anabolic Steroids, Ascorbic Acid, Salicylates and Vitamin A can elevate the Bilirubin values. The Caffeine and the Penicillin can interfere in the dosages reducing the Bilirubin.

INTERNAL QUALITY CONTROL

The Clinical Laboratory must have an internal quality control, where all procedures, rules, limits and tolerance to variations be clearly established. It is important to mention that all measurement systems present a analytical variety, and it must be monitor by the laboratory. Therefore, it is recommendable the use of controls, allowing the precision and accuracy of the dosages.

TRACEABILITY

Bioclin recommends the usage of the Bioclin Bilirubin Calibration kit, which is traceable to the reference material NIST (National Institute of Standards and Technology) SRM 916A.

REFERENCE VALUES

The reference values in mg/dL, for this method were obtained through the determination of Bilirubin in healthy populations of male and female.

Adults	
Total	0,1 - 1,2 mg/dL
Direct	up to 0,4 mg/dL
Indirect	0,1 - 0,8 mg/dL

Newborns and Childrens		
Bilirubin Total	24 h	< 8,8 mg/dL
	2º day	1,3 - 11,3 mg/dL
	3º day	0,7 - 12,7 mg/dL
	4º to 6º day	10,1 - 12,6 mg/dL
	Childrens > 1 month	0,2 - 1,0 mg/dL
Bilirubin Direct	Newborns and Childrens	up to 0,4 mg/dL

To convert the values of mg/dL to mmol/L (SI) multiply by 0,0171.

These values should be used as guidelines, each laboratory should establish its range of reference values, according to the population served.

The results provided by this kit must be interpreted by the medical professional responsible, not being the only criterion for the determination of diagnosis and/or treatment of the patient.

PRODUCT PERFORMANCE
QUALITY CONTROL

Accuracy
RECOVERY

The recovery analysis was made with 5 sample determinations. The accuracies were calculated, and if they are found in a good concordance with the reference values, obtaining a recovery between 95 and 103%.

COMPARISON OF METHODS AND METHODOLOGY SPECIFICITY

The Bilirubin kit was compared with other commercially available methods for measurement of Total and Direct Bilirubin. 07 analyzes were performed and the results were evaluated.

For Total Bilirubin the linear equation obtained was Y = 0,974X + 0,025 and correlation coefficient 0,998. For Direct Bilirubin the linear equation obtained was of Y = 1,029X - 0,004 and correlation coefficient 0,997.

Precision
REPEATABILITY

The repeatability was calculated from 20 successive determinations, using 3 samples with different concentrations, obtaining the following results:

Direct Bilirubin			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Average Concentration (mg/dL)	0,22	0,32	0,84
Standard Deviation (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coefficient of Variation (%)	3,61	2,47	0,94

Total Bilirubin			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Average Concentration (mg/dL)	0,43	1,04	3,23
Standard Deviation (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coefficient of Variation (%)	2,23	1,02	0,37

REPRODUCIBILITY

The reproducibility was calculated from 20 successive determinations for 3 consecutive days, using 3 samples with different concentrations, obtaining the following results:

Direct Bilirubin			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Average Concentration (mg/dL)	0,22	0,32	0,84
Standard Deviation (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coefficient of Variation (%)	2,59	1,79	0,69

Total Bilirubin			
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Average Concentration (mg/dL)	0,43	1,03	3,21
Standard Deviation (mg/dL)	0,01	0,01	0,03
Coefficient of Variation (%)	1,33	0,56	0,90

Sensitivity

The sensitivity was calculated from twenty (20) determinations of a sample free of Total and Direct Bilirubin.

The average of the Total Bilirubin found was 0,03600 mg/dL with standard deviation of 0,02542 mg/dL. The sensitivity, which indicates the method detection limit, corresponds to the average plus 3 times the standard deviation, and is equal to 0,11227mg/dL.

The average of the Direct Bilirubin found was 0,0330 mg/dL with standard deviation of 0,0047 mg/dL. The sensitivity, which indicates the method detection limit, corresponds to the average plus 3 times the standard deviation, and is equal to 0,0471 mg/dL.

Linearity

The reaction is linear up to 15,0 mg/dL for the Macro Technique and 45 mg/dL for Micro Technique. For samples with higher values dilute the sample with NaCl 0,85% and repeat the dosage. Multiply the result by the dilution factor.

DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE

The Bilirubin lift on plasma in the presence of hepatic injuries, bile obstruction or when the speed of destruction of red globule is increased. The increase of the Indirect Bilirubin is observed on the hemolytic syndrome, neonatal jaundice, Cligler-Najjar syndrome, Gilbert disease. The Direct Bilirubin is increased on acute and chronicle hepatitis,thetoxicreactionstomanydrugs(Chlorpromazine, Arsenicals Organics, Methyltestosterone), in bile obstruction treatment.

NUMBER OF TESTS

110 Tests / 300 µL of Sample
276 Tests / 50 µL of Sample

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- 1 - JENDRASSIK, H. T. e Grof, P. : Biochem. Zentr. 297:81, 1938.
- 2 - MALLOY, H. T. e EVELYN, K. A. - J. Biol. Chem. 119:481, 1937.
- 3 - MARTINEK, R. G.,Clin. Chem. Acta 13, 161, 1966.
- 4 - POWELL, W. N., Am. J. Clin. Path. 8, 55, 1944.
- 5 - SIMS, F. H. e Hom, C., Am. J. Clin. Path. 29, 412, 1958.
- 6 - TONKS, D. B., Clin. Chem. 9, 217, 1983.

QUALITY ASSURANCE

Before being released for consumption, all **Bioclin** reagents are tested by the Department of Quality Control. The quality of reagents is assured until expiration date stated on the presentation packaging, when stored and transported under appropriate conditions.



QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda

Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Phone: +55 (31) 3439.5454 - Fax: +55 (31) 3439.5455
E-mail: bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Made in Brazil



OBELIS S.A.

Bd. Général Wahis, 53
1030 Brussels, Belgium

CUSTOMER SERVICE

Customer Advisory Service
Phone: 0800 0315454
E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for Bilirubin kit: 10269360083

Review: January/2020

UNIVERSAL SYMBOLOGY



CATALOG NUMBER



MANUFACTURED BY



BATCH CODE



CONTROL



DATE OF MANUFACTURE



POSITIVE CONTROL



USED BY
(last day of month)



NEGATIVE CONTROL



TEMPERATURE LIMITATION
(store at)



BIOLOGICAL RISK



CONTAINS SUFFICIENT
FOR <N> TESTS



INFLAMMABLE



CONSULT INSTRUCTIONS
FOR USE



CORROSIVE



IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE



POISON



EUROPEAN AUTHORIZED
REPRESENTATIVE



CE MARK



KEEP AWAY
FROM SUNLIGHT



DO NOT USE IF
PACKAGE IS
DAMAGED