



## BILIRRUBINA D + T

### INSTRUÇÕES DE USO

#### MÉTODO:

Colorimétrico, Sims-Horn.

#### FINALIDADE:

Kit para a determinação quantitativa da Bilirrubina Direta e Total em soro, plasma e líquido amniótico. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

#### FUNDAMENTO:

A bilirrubina acopla com o ácido sulfanílico diazotado formando um complexo de coloração vermelha, a azobilirubina. A bilirrubina total (direta e indireta) é dosada em uma mistura de cafeína e benzoato, que solubiliza a bilirrubina indireta (não conjugada), que é insolúvel em meio aquoso. A bilirrubina direta (conjugada) é solúvel em meio aquoso, sendo dosada diretamente. A cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina e apresenta ponto máximo de absorção em 530 nm.

#### SIGNIFICADO CLÍNICO:

A degradação do heme da hemoglobina leva a formação da bilirrubina. A bilirrubina formada, ou bilirrubina indireta, que é insolúvel em água, é carregada pela albumina até o fígado. No fígado ela se liga ao ácido glicurônico, formando a bilirrubina conjugada ou direta. A bilirrubina conjugada é então excretada pelas vias biliares até o intestino. No intestino a bilirrubina se transforma em estercobilinogênio por ação da flora bacteriana residente.

A bilirrubina total é a soma das frações direta e indireta. A dosagem da bilirrubina total e das suas respectivas frações é de extrema valia no diagnóstico e acompanhamento das hepatopatias, quadros hemolíticos, obstrução das vias biliares e icterícia do recém-nascido. Diversas outras condições patológicas como deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, esferocitose, galactosemia, sífilis, toxoplasmose, citomegalia e rubéola podem causar icterícia no recém-nascido.

#### IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES:

Conservar entre 15 e 30 °C

**R1 – Acelerador:** Cafeína 34,1 g/L, Benzoato de Sódio 51,8 g/L e Acetato de Sódio 51,8 g/L.

**R2 – Reagente Sulfanílico:** Ácido Sulfanílico 1 g/L, Ácido Clorídrico 0,2N.

**R3 – Nitrito:** Nitrito de sódio 5 g/L.

**R4 – Padrão:** Bilirrubina de concentração determinada no rótulo do frasco.

**R5 – Diluente do Padrão:** Dimetilsulfóxido 99,5%.

#### ESTABILIDADE:

Os reagentes individuais são estáveis até sua data de validade, mesmo após abertos se mantidos sob temperatura de 15 a 30°C. Os frascos devem ser imediatamente tampados após seu uso. Não deixar os frascos expostos ao ar por períodos maiores que o necessário.

O reagente de uso (Diazoreagente) deve ser preparado e utilizado no mesmo dia. Sobras de reagentes devem ser descartadas após a conclusão da bateria de testes.

Após a reconstituição, o PADRÃO DE USO é estável por até 12 horas entre 15 e 25 °C ou até 2 meses à -20 °C protegido da luz. Descongelar apenas uma vez.

#### PREPARO DO REAGENTE DE USO:

**Padrão de Uso:** Reconstituir utilizando exatamente o volume de R5 – Diluente do Padrão, indicado no rótulo do padrão. Homogeneizar bem e aguardar 30 minutos à temperatura ambiente. Homogeneizar bem antes do uso. O reagente é estável por até 12 horas entre 15 e 25 °C ou até 2 meses à -20 °C protegido da luz. Descongelar apenas uma vez.

**Diazo:** Calcular o volume a ser utilizado e preparar um volume aproximado. Adicionar uma gota (50 µL) do R3 - Nitrito a 1,5 mL do R2 – Reagente Sulfanílico, homogeneizar

bem e utilizar no dia do preparo.

#### TRANSPORTE:

O kit não é afetado pelo transporte desde que seja entregue ao destinatário no período máximo de 07 dias e em uma temperatura de até 37 °C.

#### TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:

O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado conforme descrito no item "IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES" e em sua embalagem original.

#### PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS:

- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação do reagente.
- Recomendamos a aplicação das Boas Práticas de Laboratórios Clínicos para a execução do teste;
- De acordo com as instruções de biossegurança, todas as amostras devem ser manuseadas como materiais potencialmente infectantes;
- Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugerimos utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental;
- Hemólise mesmo que discreta interfere na dosagem;
- Não misturar reagentes de lotes diferentes;
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, evitando contaminação cruzada.

#### MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:

- Espectrofotômetro UV/VIS;
- Tubos e pipetas;
- Cronômetro.

#### AMOSTRAS BIOLÓGICAS

##### • SORO, PLASMA (EDTA, HEPARINA), LÍQUIDO AMNIÓTICO

As amostras devem ser protegidas da luz imediatamente após a coleta. A Bilirrubina é estável por até 8 horas se a amostra for armazenada em temperatura de 10 a 30 °C, 12 horas se conservada entre 2 e 8 °C ou 24 horas em temperaturas abaixo de 0 °C.

#### INTERFERÊNCIAS

Mesmo pequenas quantidades de hemólise podem interferir na dosagem do reagente. Triglicérides > 170 mg/dL interfere na dosagem.

#### PROCEDIMENTO DO TESTE

##### 1. Observações

- A observação minuciosa da limpeza e secagem da vidraria, da estabilidade dos reagentes, da pipetagem, da temperatura e do tempo de reação é de extrema importância para se obter resultados precisos e exatos;
- A água utilizada nos laboratórios clínicos deve ser purificada utilizando-se métodos adequados para as finalidades de uso. Colunas deionizadoras saturadas liberam diversos íons, amins e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

##### 2. Leitura do teste

Comprimento de onda: 530nm;

Cubeta: 1cm;

Temperatura: 15 a 25 °C;

Medição: Para cada tubo teste, um tubo branco deverá ser realizado.

##### 3. Método de Análise

###### 3.1. Curva de Calibração

Faça cada tubo padrão em triplicata. Identificar seis tubos com P1, P2, P3 – Padrão e B1, B2, B3 – Branco.

Tubo	Concentração mg/dL	Reagente			
		R4 USO	R1	R2	Diazo
P1	1,0	0,030mL	4,5 mL	-	0,5 mL
B1	-	0,030mL	4,5 mL	0,5 mL	-
P2	5,0	0,150mL	4,5 mL	-	0,5 mL
B2	-	0,150mL	4,5 mL	0,5 mL	-
P3	10,0	0,300mL	4,5 mL	-	0,5 mL
B3	-	0,300mL	4,5 mL	0,5 mL	-

Homogeneizar bem, e aguardar 5 minutos entre 15 e 25 °C. Efetuar as leituras fotométricas em 530 nm, acertando o zero com cada tubo branco para cada tubo padrão. Traçar a curva de calibração usando a média de cada absorção.

###### 3.2. Fator de Calibração

###### 3.2.1. Técnica Macro

Realize triplicatas do tubo P – Padrão. Identificar dois tubos de ensaio como B – Branco

e P - Padrão

Reagente	B - Branco	P – Padrão
R4 USO	0,300 mL	0,300 mL
R1 - Acelerador	4,5 mL	4,5 mL
R2 – Sulfanílico	0,5 mL	-
Diazo	-	0,5 mL
Homogeneizar bem, aguardar 5 minutos e efetuar as leituras fotométricas em 530, acertando o zero com o tubo B – Branco. Obter a média das absorbâncias.		

###### 3.2.2. Técnica Micro

Realize triplicatas do tubo P – Padrão. Identificar dois tubos de ensaio como B – Branco e P - Padrão

Reagente	B - Branco	P – Padrão
R4 USO	0,050 mL	0,050 mL
R1 – Acelerador	1,8 mL	1,8 mL
R2 – Sulfanílico	0,150 mL	-
Diazo	-	0,150 mL
Homogeneizar bem, aguardar 5 minutos e efetuar as leituras fotométricas em 530, acertando o zero com o tubo B – Branco. Obter a média das absorbâncias.		

###### 3.2.3. Cálculo

FC = 10/ Ap;

FC = Fator de Calibração;

10 = Concentração do Padrão;

Ap = Absorbância do Padrão.

#### 4. Método de Análise:

##### 4.1. Dosagem no plasma ou soro:

Se o plasma ou soro estiverem lipêmicos ou hemolisados, adicionar 1,0 mL do reagente de Fehling II a todos os tubos, aguardar 5 minutos e efetuar nova leitura fotométrica a 630 nm, acertando o zero com o tubo "B" – Branco.

##### 4.1.1 Técnica Macro

###### 4.1.1.1 Colorimetria

Identificar três tubos de ensaio "B" – Branco, "D" – Direta e "T" – Total e proceder:

Reagente	B - Branco	Direta	Total
Água	4,5 mL	4,5 mL	-
R1 - Acelerador	-	-	4,5 mL
R2 – Sulfanílico	0,5 mL	-	-
Diazo	-	0,5 mL	0,5 mL
Plasma/Soro	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL
Homogeneizar bem. A fração "D" – Direta deve ser lida exatamente com 5 minutos a 530 nm, acertando o zero com "B" – Branco. A fração "T" – Total pode ser lida com até 30 minutos, também em 530 nm, acertando o zero com o "B" – Branco.			

###### 4.1.1.2. Cálculos

FC = 10/ Ap;

FC = Fator de Calibração;

Ap = Absorbância do Padrão;

At = Absorbância da Total;

Ad = Absorbância da Direta;

Bilirrubina Total (mg/dL) = At X FC

Bilirrubina Direta (mg/dL) = Ad X FC

Bilirrubina Indireta (mg/dL) = Total – Direta

Exemplo:

Ap = 0,500

At = 0,039

Ad = 0,018

FC = 10/ Ap = 10/0,500 = 20;

Bilirrubina Total = At X FC = 0,039 X 20 = 0,78 mg/dL;

Bilirrubina Direta = Ad X FC = 0,018 X 20 = 0,36 mg/dL;

Bilirrubina Indireta = Total – Direta = 0,78 – 0,36 = 0,42 mg/dL;

##### 5.1.2 Técnica Micro

###### 5.1.2.1 Colorimetria

Identificar três tubos de ensaio "B" – Branco, "D" – Direta e "T" – Total e proceder:

Reagente	B - Branco	Direta	Total
Água	1,8 mL	1,8 mL	-
R1 - Acelerador	-	-	1,8 mL

R2 – Sulfanílico	0,15 mL	-	-
Diázo	-	0,15 mL	0,15 mL
Plasma/Soro	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
Homogeneizar bem. A fração “D” – Direta deve ser lida exatamente com 5 minutos a 530 nm, acertando o zero com “B” – Branco. A fração “T” – Total pode ser lida com até 30 minutos, também em 530 nm, acertando o zero com o “B” – Branco.			

### 5.1.2.2 Cálculos

Seguir o exemplo da técnica macro.

## 5.2 Dosagem no Líquido Amniótico

A amostra deve ser protegida da ação da luz e centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. Utilizar o sobrenadante para a dosagem.

### 5.2.1. Colorimetria

Marcar 2 tubos de ensaio como “B” – Branco, “T” – Total e proceder

Reagente	B - Branco	T - Total
R1 - Acelerador	1,5 mL	1,5 mL
Amostra	3,0 mL	3,0 mL
R2 - Sulfanílico	0,5 mL	-
Diázo	-	0,5 mL
Homogeneizar bem. Deve ser lida em até 30 minutos em 530 nm, acertando o zero com o “B” – Branco.		

### 5.2.2. Cálculos:

Seguir o exemplo utilizado na técnica para dosagem em soro ou plasma e dividir por 10 o valor obtido.

## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

### 1. Linearidade da reação:

A linearidade do método é de até 15 mg/dL na técnica macro. Na técnica micro é de 45 mg/dL. Para amostras com concentrações mais elevadas, diluir as amostras com 1 + 1 com solução salina a 0,9% e repetir a determinação. Multiplicar o resultado por 2.

### 2. Valores de referência

Soro:	
Direta:	Até 0,4 mg/dL
Total:	Até 1,2 mg/dL
Líquido Amniótico:	
Idade Gestacional (semanas)	
15:	Até 0,13 mg/dL
25:	Até 0,14 mg/dL
40:	Até 0,04 mg/dL
Valores Críticos no Soro	
Recém nascidos a termo:	> 15 mg/dL
Recém nascidos pré-termo:	10 - 15 mg/dL

Estes valores devem ser utilizados como uma orientação. É recomendado que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

### 3. Sensibilidade

Bilirrubina Direta 0,11 mg/dL

Bilirrubina Total 0,24 mg/dL

### 4. Comparação de métodos

O kit para a dosagem da Bilirrubina Direta e Total foi comparado com outros comercialmente disponíveis. Amostras diversas foram utilizadas na comparação dos testes, dentre essas, soros controle e amostras de pacientes. Os resultados obtidos mostraram boa concordância.

### 5. Repetibilidade e reprodutibilidade

Foram utilizados soros controle comercialmente disponíveis para a avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade do kit. Os soros foram reconstituídos e/ou preparados seguindo as recomendações do fabricante. Trinta determinações dos soros controle foram realizadas com o kit de Bilirrubina Direta e Total da VIDA Biotecnologia para a determinação da repetibilidade e 10 determinações por soro controle para a reprodutibilidade. As médias das determinações foram calculadas e comparadas com os valores alvo.

### 5.1. Repetibilidade Bilirrubina Direta

Soro Controle	N	Média dos valores obtidos	DP	CV
SC1	30	0,22	0,01	3,61
SC2	30	0,84	0,01	0,94

### 5.2. Repetibilidade Bilirrubina Total

Soro Controle	N	Média dos valores obtidos	DP	CV
SC1	30	0,43	0,01	2,23
SC2	30	3,23	0,01	0,37

### 5.3. Reprodutibilidade Bilirrubina Direta

Soro Controle	N	Média dos valores obtidos	DP	CV
SC1	10	0,22	0,01	2,59
SC2	10	0,84	0,01	0,69

### 5.4. Reprodutibilidade Bilirrubina Total

Soro Controle	N	Média dos valores obtidos	DP	CV
SC1	10	0,85	0,039	4,59
SC2	10	1,59	0,051	3,21

## 6. Controle de qualidade

Foram utilizados soros controle comercialmente disponíveis para a avaliação do kit. Os soros foram reconstituídos e/ou preparados seguindo as recomendações do fabricante. Dez determinações dos soros controle foram realizadas com o kit de Bilirrubina Direta e Total da VIDA Biotecnologia. As médias das determinações foram calculadas e comparadas com os valores alvo.

Soro Controle	Valor alvo	Média dos valores obtidos	% de Recuperação
SC1	1,1	1,1	100,0%
SC2	4,6	4,8	104,3%

Todo soro controle com valores determinados para Bilirrubina Direta e Total, pelo método de Sims-Horn, pode ser utilizado.

## RISCOS RESIDUAIS IDENTIFICADOS

As medidas de redução dos riscos foram implementadas e o produto não apresenta riscos maiores que os benefícios obtidos com o seu uso; e se usado por profissionais qualificados e treinados, cientes das precauções descritas nos produtos, desempenhará suas funções com qualidade, segurança e eficácia.

## APRESENTAÇÃO DO KIT

CÓDIGO	REAGENTE	VOLUME	NÚMERO DE DETERMINAÇÕES
100/165-110	R1 – ACELERADOR	1 X 250 mL	110 a 275
	R2 – SULFANÍLICO	1 X 120 mL	
	R3 – NITRITO	1 X 5,0 mL	
	R4 – PADRÃO	1 X 3 a 4 mL	
	R5 – DILUENTE DO PADRÃO	1 X 3,5 a 4,5 mL	

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- HIJMANS VAN DEN BERGH, A. A.: MULLER, P. Ubereinedirecte und eineindirectedizoreaction auf bilirubin. Biochem. Z. v.77, p.90-103, 1916.
- BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Tietz textbook of clinical chemistry, 4 ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1994. 836p.
- GUYTON, A.C. HALL, J.E. Fisiol. humana e mecanismos das doenç. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. 580p.
- YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2, 5 ed. Washington DC: AACC Press, 2000.
- WESTGARD, J.O. et al. A multi-rule shewhart chart quality control in clinical chem. Clin. Chem. v.27 p.493-501, 1981

## INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR:

A VIDA Biotecnologia garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nessa instrução sejam seguidos corretamente.

Nº DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E DATA DE VALIDADE, VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

## PRODUZIDO E DISTRIBUÍDO POR: VIDA Biotecnologia LTDA

CNPJ: 11.308.834/0001-85

Avenida José Cândido da Silveira 2100 – Horto Florestal – CEP 31035-536; Belo Horizonte.















Minas Gerais – www.vidabiotecnologia.com.br

Departamento de Serviços Associados | (31)34663351; dsa@vidabiotecnologia.com.br

Responsável Técnico: Renato Silva CRBIO4 – 57360/04-D

Reg. M.S.: 80785070028

Rev.: 01/2022

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NO RÓTULO DO PRODUTO	
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data limite de utilização do produto (dd/mm/aaaa)
	Material Calibrador
	Limite de temperatura (conservar a)
	Consultar instruções de uso
	Código do Produto
	Produto para Diagnóstico In Vitro
	Liofilizado
	Corrosivo
	Risco Biológico
	Tóxico
	Reagente
	Data de Fabricação (mm/aaaa)
	Número de Lote