



BILIRRUBINA D + T

INSTRUÇÕES DE USO

MÉTODO:

Colorimétrico, Sims-Horn.

FINALIDADE:

Kit para a determinação quantitativa da Bilirrubina Direta e Total em soro.

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 a 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 0,2 mmol/L, Benzoato de Sódio 0,4 mol/L e Acetato de Sódio 0,7 mol/L

R2 - SULFANÍLICO: Contém Ácido Sulfanílico 6 mmol/L e Ácido Clorídrico 130 mmol/L.

R3 - NITRITO: Contém nitrito de sódio 70 mmol/L;

R4 - PADRÃO: Bilirrubina de concentração determinada no rótulo do frasco. Armazenar entre 2 e 8 °C;

R5 - DILUENTE DO PADRÃO: Dimetilsulfóxido 99,5%.

ESTABILIDADE:

Os reagentes individuais são estáveis até sua data de validade, mesmo após abertos se mantidos em 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 se conservado entre 15 e 25 °C ou até 2 meses à temperatura de -20 °C protegido da luz. Descongelar apenas uma vez.

PREPARO DO REAGENTE DE USO:

Padrão de USso: Reconstituir utilizando exatamente o volume de R5

-Diluído do Padrão, indicado no rótulo do padrão. Homogeneizar e aguardar 30 minutos a 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 temperatura de -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 sob as condições de temperatura descritas acima 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;
- Não misturar reagentes de lotes diferentes;
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, evitando contaminação cruzada;
- Hemólise mesmo que discreta interfere na dosagem.

MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:

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

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

- **SORO, PLASMA (EDTA, HEPARINA) e 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

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, acertado 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. Ober 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;

4.1.2. Técnica Micro

4.1.2.1. 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 - Sulfanilico | 0,15 mL | - | - |
| Diazo | - | 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. | | | |

4.1.2.2. Cálculos

Seguir o exemplo da técnica macro.

5. 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.

5.1. 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 - Sulfanilico | 0,5 mL | - |
| Diazo | - | 0,5 mL |
| Homogeneizar bem. Deve ser lida em até 30 minutos em 530 nm, acertando o zero com o "B" - Branco. | | |

5.2. 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 orientação. É recomendado que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

3. Sensibilidade

0,12 mg/dL

4. 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.

4.1. Repetibilidade Bilirubina 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 |

4.2. Repetibilidade Bilirubina 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 |

4.3. 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 |

4.4. 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 |

5. 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, pelo método de Sims-Horn, pode ser utilizado.

APRESENTAÇÃO DO KIT

| CATÁLOGO | REAGENTE | VOLUME | NÚMERO DE DETERMINAÇÕES |
|-------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| 100/165-110 | R1 - ACELERADOR | 1 X 250 mL | 110 a 275 |
| | R2 - SULFANILICO | 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 eineindirecte reaktion 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 doeng. 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, DATA DE VALIDADE VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

PRODUZIDO E DISTRIBUÍDO POR:VIDA Biotecnologia

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

Resp Técn.: Renato Silva CRBIO4 -57360/04-D
 Reg. M.S.: 80785070028

Rev.: 02/2016

| 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 |