



## BILIRRUBINA DIRETA

### INSTRUÇÕES DE USO

#### MÉTODO:

Teste colorimétrico baseado na reação de Malloy-Evelyn.

#### FINALIDADE:

Kit para a determinação quantitativa da Bilirrubina Direta em soro.

#### FUNDAMENTO:

Em presença de ácido sulfanílico diazotado, a bilirrubina reage formando azobilirrubina que apresenta coloração vermelha. A bilirrubina direta é dosada em meio aquoso. A bilirrubina total (direta + indireta) é dosada com o auxílio de um agente solubilizante.

A intensidade da coloração do complexo formado está diretamente relacionada a concentração da bilirrubina direta na amostra.

#### 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 2 a 8 °C.

**R1 - REAGENTE DE COR:** Ácido sulfanílico 35,0 mmol/L, ácido clorídrico 180mmol/L.

**R2 - NITRITO:** Nitrito de sódio 33 mmol/L, azida sódica 0,09% p/v.

#### ESTABILIDADE:

Os reagentes individuais são estáveis até sua data de validade, mesmo após abertos se mantidos à temperatura de 2 a 8 °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 deve ser preparado imediatamente antes de seu uso e qualquer sobra de reagente deve ser descartada após a conclusão da bateria de testes. Não utilizar reagente de uso preparado pela manhã na rotina da tarde. Sempre preparar o reagente imediatamente antes de seu uso. O reagente de trabalho desenvolve uma coloração alaranjada, o que não afeta

o resultado final.

#### 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 descritas e em sua embalagem original.

#### PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS:

- Aplicar os cuidados habituais de segurança na manipulação do reagente. O reagente possui azida sódica. Não ingerir ou aspirar. Evitar contato com a pele e mucosa;
- O reagente R2 possui 0,09% de azida sódica como conservante;
- 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;
- Não usar o reagente quando este apresentar característica visual em desacordo com o especificado na FISPQ do produto.

#### MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS:

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

#### AMOSTRAS BIOLÓGICAS

##### • SORO

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

#### INTERFERÊNCIAS

Deve-se evitar o uso de amostras hemolisadas, pois a hemoglobina pode causar resultados falsamente diminuídos. Triglicérides com níveis maiores que 150 mg/dL causam interferência nas leituras. Todos os anticoagulantes interferem 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, aminas e agentes oxidantes que deterioram os reativos.

##### 2. Preparo do reagente

Misturar na proporção de 30 partes do R1 - REAGENTE DE COR

para 1 parte do R2 - NITRITO. Homogeneizar suavemente. O reagente de trabalho é estável por até 4 horas. A coloração laranja apresentada por ele não interfere nos resultados.

#### 3. Leitura do teste

Comprimento de onda: 550nm (530 - 570);

Cubeta: 1cm;

Temperatura: 10 a 30 °C;

Medição: Medir as absorbâncias do Calibrador, Branco do Calibrador, Amostra e Branco da Amostra zerando o fotômetro com o branco do reagente.

#### 4. Procedimento Monoreagente

Pipetar na cubeta	Branco do Reagente	Branco da Amostra	Amostra/ Calibrador
R1 - Reagente de Cor	1,0mL	1,0mL	-
Reagente de Trabalho	-	-	1,0mL
Amostra/Calibrador	-	50µL	50µL

Homogeneizar bem, e aguardar 5 minutos. Ler as absorbâncias do Calibrador, Branco do Calibrador, Amostra e Branco da Amostra zerando o fotômetro com o branco do reagente. A cor é estável por 30 minutos.

#### 5. Procedimento Bireagente

Pipetar na cubeta	Branco do Reagente	Branco da Amostra	Amostra/ Calibrador
R1 - Reagente de Cor	1,0mL	1,0mL	1,0mL
R2 - Nitrito	-	-	30µL
Amostra/Calibrador	-	50µL	50µL

Homogeneizar bem, e aguardar 5 minutos. Ler as absorbâncias do Calibrador, Branco do Calibrador, Amostra e Branco da Amostra zerando o fotômetro com o branco do reagente. A cor é estável por 30 minutos.

#### 5. Cálculos:

##### 5.1 Exemplo com Calibrador

$$\text{Bili. (mg/dL)} = \frac{\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco}}{\text{Amostra}} \times \text{Conc. CAL (mg/dL)}$$

$$\text{Abs. Cal} - \text{Abs. Branco CAL}$$

##### 5.1.1 Exemplo

Concentração do Calibrador: 0,35mg/dL

Absorbância da Amostra: 0,016

Absorbância Branco da Amostra: 0,003

Absorbância do Calibrador: 0,022

Absorbância Branco do Calibrador: 0,002

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = \frac{(0,016 - 0,003)}{(0,022 - 0,002)} \times 0,35$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = 0,22 \text{ mg/dL}$$

##### 5.2 Exemplo com Fator de Calibração

$$\text{FC} = \frac{\text{Concentração do calibrador (mg/dL)}}{\text{Abs. Cal} - \text{Abs. Branco CAL}}$$

$$\text{Abs. Cal} - \text{Abs. Branco CAL}$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = \text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco Amostra} \times \text{FC}$$

##### 5.2.1 Exemplo

$$\text{Fc} = 0,35 / (0,022 - 0,002)$$

$$\text{Fc} = 17,5$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = (0,016 - 0,003) \times 17,5 = 0,22 \text{ mg/dL}$$

#### CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

##### 1. Linearidade da reação:

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

## 2. Valores de referência

Amostra	Valor (mg/dL)	µmol/L
Bilirrubina Direta	≤ 0,25	≤ 4,3
Bilirrubina Total	≤ 1,1	≤ 18,8

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

## 3. Sensibilidade

0,017mg/dL

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

## 4. Repetibilidade e reprodutibilidade

Foram utilizados dos 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 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

Soro Controle	N	Média dos valores obtidos	DP	CV
SC1	30	0,84	0,035	4,17
SC2	30	1,57	0,043	2,74
SC3	30	8,17	0,124	1,52

### 4.2 Reprodutibilidade

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
SC3	10	8,14	0,195	2,40

## 5. Controle de qualidade

Foram utilizados dos 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 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	0,86	0,84	97,7%
SC2	1,58	1,57	100,6%
SC3	8,16	8,15	99,9%

Todo soro controle com valores determinados para Bilirrubina Direta, pelo método de Malloy-Evelyn, pode ser utilizado.

## APRESENTAÇÃO DO KIT

CATÁLOGO	REAGENTE	VOLUME	NÚMERO DE DETERMINAÇÕES
100/150-100	R1 - REAGENTE DE COR	1 X 100mL	100
	R2 - NITRITO	1 X 5 mL	

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- HIJMANS VAN DEN BERGH, A. A.: MULLER, P. Ubereinedirecte

und eine indirect diazoreaction auf bilirubin. Biochem. Z. v.77, p.90-103, 1916.  
2- BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Tietz textbook of clinical chemistry, 4 ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1994. 836p.  
3-GUYTON, A.C. HALL, J.E. Fisiol. humana e mecanismos das doenc. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998. 580p.  
4- YOUNG, D.S. Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2, 5 ed. Washington DC: AACCC Press, 2000.  
5- WESTGARD, J.O. et al. A multi-rule shewhart chart quality control in clinical chem. Clin. Chem. v.27 p.493-501, 1981  
6- TIETZ, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 3rd. Edtion (1987), 676- 679, W.B. Saunders Company Philadelphia.  
7- MALLOY H. T.; EVELYN K. A. Determination of bilirubin with photoelectric colorimeter. J. Biol. Chem. V. 119, p. 481-490, 1937.

## 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](http://www.vidabiotecnologia.com.br)

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

Resp Técn.: Renato Silva CRBIO4-57360/04-D  
Reg. M.S.: 80785070027

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