



INSTRUÇÕES DE USO (Versão Ago/23)

BILIRRUBINA

(Sims-Horn) - Método Colorimétrico

FINALIDADE

O conjunto é um sistema que se destina à determinação da bilirrubina no soro ou plasma humano. Exclusivo para uso em diagnóstico "in vitro".

PRINCÍPIO DE AÇÃO

A bilirrubina reage com o sal de diazônio do ácido sulfanílico formando um produto de acoplamento vermelho com máximo de absorção em 525 nm. A bilirrubina indireta (ligada à albumina) e a bilirrubina direta (ligada ao ácido glicurônico) são dosadas após a ação solubilizante e catalizadora da mistura cafeína/benzoato de sódio. Por outro lado, a bilirrubina direta pode ser especificamente determinada em meio aquoso, sem a necessidade de solubilização ou catálise. A bilirrubina indireta pode ser determinada, portanto, por diferença.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A bilirrubina é produzida durante a degradação, quer normal, quer anômala, de eritrócitos no sistema retículo-endotelial. O produto final desta tarefa é a bilirrubina indireta (não conjugada) a qual é encaminhada ao fígado para que este possa transformá-la em bilirrubina direta (conjugada) para que possamos eliminá-la. Em algumas situações, o fígado não consegue dar conta de metabolizar toda a bilirrubina e então, esta se acumula no nosso organismo produzindo a icterícia.

As determinações de bilirrubina são utilizadas no diagnóstico de doenças hepáticas, na detecção de anemia hemolítica e na avaliação do grau de gravidade da icterícia.

REAGENTES

Apresentação com 300 mL:

- 1. Acelerador:** 01 frasco com 200 mL, de solução de cafeína 130 mmol/L, benzoato de sódio 260 mmol/L e acetato de sódio 460 mmol/L. Conservar entre 2-8°C.
 - 2. Ácido sulfanílico:** 01 frasco com 96 mL, de solução de ácido sulfanílico 5,75 mmol/L em ácido clorídrico 180 mmol/L. Conservar entre 2-8°C.
 - 3. Nitrito de sódio:** 01 frasco com 4,0 mL, de solução de nitrito de sódio 72,4 mmol/L. Conservar entre 2-8°C.
 - 4. Padrão:** 01 frasco com 0,3 mg, de bilirrubina dessecada. Conservar entre 2-8°C.
 - 5. Solvente:** 01 frasco com 3,5 mL de dimetilsulfóxido anidro. Conservar entre 2-8°C.
- Nota : O solvente congela sob refrigeração (2 -8°C). Deixar em repouso durante 10 minutos na temperatura ambiente antes do uso.**

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

Espectrofotômetro
Centrífuga
Cronômetro
Vidraria
Pipetas manuais ou automáticas
Água destilada ou deionizada

CUIDADOS NO ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DOS REAGENTES

As datas de fabricação e validade aparecem no rótulo da embalagem. Não usar reagentes cuja data de validade tenha expirado.

Antes da manipulação, todos os reagentes devem ser mantidos sob refrigeração, na faixa de 2-8°C, podendo ser transportados na temperatura de 2-25°C, até um limite de 48 horas. À exceção do **Padrão (4)**, que deve ser conservado entre 2-8°C antes do preparo. Em caso de necessidade os demais reagentes podem ser mantidos a temperatura ambiente, na faixa de 2-25°C.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS

1. Somente para uso diagnóstico "in vitro".
2. Evitar contaminação com íons metálicos ou agentes oxidantes.
3. O espectrofotômetro ou mesmo equipamentos automatizados devem ficar livres de contaminação microbiana, serem calibrados corretamente e receberem manutenção de acordo com as instruções do fabricante.
4. Não misturar ou trocar diferentes lotes de reagentes.
5. Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação.
6. Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis separadas para cada amostra, controle (se utilizado) e reagente e não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
7. O **Padrão (4)** é fornecido em concentração usual fixa. O desempenho do ensaio pode ser afetado se este reagente for modificado ou não for armazenado nas condições recomendadas. Ver cuidados no armazenamento e transporte dos reagentes.
8. Não comer, beber, fumar, armazenar ou preparar alimentos, ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho onde reagentes e amostras estiverem sendo manuseados.
9. Usar luvas descartáveis quando manusear amostras clínicas ou reagentes. Lavar sempre as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.
10. As amostras devem ser descartadas, após o uso, em recipientes específicos. Não dispensar em coletores de lixo comuns ou nas redes de água e esgotos.
11. Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante.

AMOSTRA

Soro ou plasma (Heparina ou EDTA).

A bilirrubina é um composto extremamente fotossensível. A sua determinação deve ser feita, portanto, imediatamente após a coletas do sangue. Se isto não for possível, separar o soro ou plasma, envolver o frasco com papel aluminizado e manter refrigerado (2-8°C) até o momento da dosagem, que **deve ser realizada no mesmo dia**.

Nota: Em virtude de sua sensibilidade, não se recomenda o método proposto para a dosagem de bilirrubina no líquido amniótico. Neste caso, é recomendável o método espectrofotométrico direto, em 450 nm, com correção espectral que inclui as leituras em 365 nm e 550 nm. Esta metodologia está disponível sob requisição.

PROCEDIMENTO

1. Preparo dos reagentes:

A. Diazo Reagente : Adicionar 50 µL de **Nitrito de Sódio (3)** a 1,5 mL do **Ácido Sulfanílico (2)**. Misturar e usar no dia da preparação.

B. Padrão: Manipular ao abrigo da luz direta. Adicionar 3,0 mL do **Solvente (5)** ao frasco do **Padrão (4)**. Agitar. Deixar em repouso durante cinco minutos e agitar novamente. A concentração do Padrão, será igual a **10 mg/dL**. O Padrão assim preparado é estável 30 dias a - 20°C. Pode ser congelado e descongelado uma única vez.

2. Calibração (Dosar o padrão em triplicata):

	A. Método Macro		B. Método Micro	
	Branco	Padrão	Branco	Padrão
Acelerador	4,5 mL	4,5 mL	1,8 mL	1,8 mL
Ácido Sulfanílico	0,5 mL	-	0,15 mL	-
Diazo Reagente	-	0,5 mL	-	0,15 mL
Padrão	0,3 mL	0,3 mL	0,05 mL	0,05 mL

Homogeneizar bem e aguardar **5 minutos à temperatura ambiente (15-25°C)**. Determinar as absorbâncias dos padrões em 525 nm, acertando o zero com o branco. A cor formada é estável por 30 minutos.

3. Dosagem (Soro ou Plasma):

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	A. Método Macro			B. Método Micro		
	Branco	Direta	Total	Branco	Direta	Total
Água destilada	4,5 mL	4,5 mL	-	1,8 mL	1,8 mL	-
Acelerador	-	-	4,5 mL	-	-	1,8 mL
Ácido Sulfanílico	0,5 mL	-	-	0,15 mL	-	-
Diazo Reagente	-	0,5 mL	0,5 mL	-	0,15 mL	0,15 mL
Amostra	0,3 mL	0,3 mL	0,3 mL	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL

Homogeneizar bem e aguardar **5 minutos na temperatura ambiente (15-25°C)**. Determinar as absorbâncias das bilirrubinas direta e total em 525 nm, acertando o zero com o Branco. A cor formada é estável por 30 minutos.

CÁLCULOS

Os cálculos abaixo se referem às bilirrubinas total e direta. A bilirrubina indireta é calculada pela diferença da total menos a direta.

Deverão ser calculados separadamente os fatores de calibração para os métodos Macro e Micro.

- Bilirrubina (mg/dL) = (Abs. da Amostra ÷ Abs. do Padrão) x 10
- Fator de calibração = 10 ÷ Média das absorbâncias do padrão
- Bilirrubina (mg/dL) = Absorbância da amostra x Fator.
- Bilirrubina (mmol/L) = mg/dL x 0,0171

Exemplo (método micro):

- Média das absorbâncias do Padrão : 0,201
- Absorbância do Teste : 0,310
- Bilirrubina (mg/dL) = (0,310 ÷ 0,201) x 10
- Bilirrubina (mg/dL) = 15,4
- Fator de calibração = 10 ÷ 0,201 = 49,75
- Bilirrubina (mg/dL) = 0,310 x 49,75 = 15,4

VALORES DE REFERÊNCIA

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de referência na sua população atendida. Os valores abaixo são fornecidos como orientação.

Bilirrubina total (mg/dL)

	RN Prematuros	RN a termo	Crianças/Adolescentes/Adultos
1 dia	<8,0	1,4 – 8,7	Até 1,2
1-2 dias	<12,0	3,4 – 11,5	
3-5 dias	<16,0	1,5 – 12,0	

Bilirrubina direta (mg/dL)

Recém-nascidos, Crianças, Adolescentes e Adultos: Até 0,4

LINEARIDADE

A reação é linear entre 0,3 e 18 mg/dL no método Macro, e entre 1 e 40 mg/dL no método Micro.

DADOS ESTATÍSTICOS DE DESEMPENHO DO TESTE

Sensibilidade: 99%

Exatidão: A comparação com método similar validado demonstrou um coeficiente de correlação, r, igual a 0,98 a partir da análise de amostras aleatórias oriundas de pacientes de ambulatório. A equação de regressão obtida foi: $y=0,9977x - 0,0395$, para Bilirrubina Direta e r, igual a 0,99 e equação obtida: $y=0,993x + 0,163$, para Bilirrubina Total. Esses resultados demonstram uma exatidão de 98% para Bilirrubina Direta e 99% para Bilirrubina Total.

Precisão

Repetibilidade: A realização de 20 determinações de uma mesma amostra, com valor dentro da faixa de referência, obtendo-se os seguintes resultados:

	Bilirrubina Direta	Bilirrubina Total
Repetibilidade	Amostra	Amostra
Média	1,3	4,4
Desvio Padrão	0,1	0,1
Coefficiente de Variação (%)	3,5	3,3

Reprodutibilidade: A realização de 20 determinações de uma mesma amostra, realizada por operador diferente, utilizando o mesmo equipamento de medição, com valores dentro da faixa de referência, obtendo-se os seguintes resultados:

	Bilirrubina Direta	Bilirrubina Total
Reprodutibilidade	Amostra	Amostra
Média	1,5	4,3
Desvio Padrão	0,1	0,1
Coefficiente de Variação (%)	2,5	1,7

Sensibilidade analítica: O método apresenta uma variação de absorvância em 525 nm igual a 0,045 em cada acréscimo de 1mg/dL na concentração de bilirrubina para o método Macro e de 0,020 para o método Micro. O limite de detecção dos métodos são 0,3 mg/dL e 1mg/dL para os métodos Macro e Micro respectivamente.

AUTOMAÇÃO

Aplicações para analisadores automáticos estão disponíveis, se solicitadas.

CONTROLE DA QUALIDADE

O laboratório deve ter como prática de rotina o uso de soros controle comerciais. Preferivelmente deve participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC.

INTERFERENTES

Resultados falsamente diminuídos: Ácido ascórbico acima de 7 mg/dL, Hemoglobina acima de 800 mg/dL (hemólise acentuada).

Resultados falsamente elevados: Hemoglobina acima de 150 mg/dL até cerca de 800 mg/dL, (hemólise significativa), aumentando os valores em até 20%.

Hemólise discreta não interfere.

Drogas que podem aumentar medições de bilirrubina: Alopurinol, esteróides anabólicos, alguns antibióticos, antimalaríais, azatioprina, clorpropamida, colinérgicos, codeína, diuréticos, epinefrina, meperidina, metotrexato, metildopa, inibidores da MAO, morfina, ácido nicotínico, contraceptivos orais, fenotiazinas, quinidina, rifampina, salicilatos, esteróides, sulfonamidas e teofilina.

Drogas que podem diminuir medições de bilirrubina: Barbitúricos, cafeína, penicilina e doses altas de salicilatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Sims,F.H. , Horn,C. Am. J. Clin. Path. 29:412,1958
- 2.Malloy,H.T., Evelyn,K.A. J. Biol. Chem. 119:481,1937
- 3.Botwell, J.H. Clin. Chem. 10(3):197,1964
- 4.Fevery, j. et. al. Clin. Chim. Acta 17(1):63,1963
- 5.Katal: Dados de arquivo

APRESENTAÇÃO

300 mL	Volume
1. Acelerador	1 x 200 mL
2. Ácido Sulfanílico	1 x 96 mL
3. Nitrito de Sódio	1 x 4 mL
4. Padrão	1 x 0,3 mg
5. Solvente	1 x 3,5 mL

CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

O desempenho deste sistema diagnóstico, medido pelas propriedades descritas nesta Instrução de Uso, está garantido até a sua data de vencimento, desde que obedecidas as seguintes condições:

- 1.A adesão estrita, pelo usuário, ao quadro de procedimento técnico.
- 2.As condições de armazenamento estarem de acordo com o recomendado nesta Instrução de Uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos com o produto, estarem em boas condições de uso.

ASSESSORIA CIENTÍFICA

Para esclarecimentos de dúvidas e Assessoria Científica ligue:

(31) 3157-3688 ou (11) 99217-8407

e-mail: sac@katal.com.br



Katal Biotecnológica Ind. Com. Ltda.

Rua: Leiria, 1.160 - CEP 31255-100.

Belo Horizonte - MG – Brasil – CNPJ: 71.437.917/0001-04

Responsável Técnica: Raquel Miranda Gonzaga – CRBio 076936/04-D

MS.:10377390199

Data da última revisão: 29/08/2023

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA PRODUTOS DIAGNÓSTICOS “IN VITRO”	
	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
	Fabricado por
	Número de Lote