

Ref. BA034

MS 81666810032

## Método

Colorimétrico Sims -Horn.

## Finalidade

Sistema para a padronização da dosagem da bilirrubina.

**Somente para uso diagnóstico in vitro.**

## Princípio

A Bilirrubina Padrão é dosada em presença de um acelerador (Cafeína e Benzoato), sendo acoplado ao ácido sulfanílico diazotado formando um complexo de cor vermelha.

## Reagentes

**Reagente Nº 1 - Padrão** - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Bilirrubina 0,3 mg. Proteger contra ação da luz.

**Reagente Nº 2 - Diluente** - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Dimetilsulfóxido 3,5 mL.

## Estabilidade e Condições de Armazenamento

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto e na embalagem externa quando conservados na temperatura recomendada, bem vedados e se evitado a contaminação durante o uso. A temperatura de armazenamento deverá ser de 15 a 30°C.

## Cuidados Especiais e Precauções

- O reagente (2) Diluente pode se apresentar em estado sólido em temperatura abaixo de 20°C. Caso isso ocorra aquecer a 37°C até a total liquefação. Homogeneizar bem.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em [www.bioanalitica.com.br](http://www.bioanalitica.com.br) ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- Usar pipetas de vidro e ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.
- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

## Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Especrofotômetro ou fotômetro para leitura em 525 nm (500 - 540);
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Cronômetro;
- Tubos de ensaio;
- Kit Bilirrubina Ref. BA031 da Bioanalítica.

## Influências pré-analíticas

A Bilirrubina é muito sensível a luz direta ou indireta, manter o frasco ao abrigo da luz durante o preparo e manuseio do padrão.

**NOTA: Os procedimentos usados para calibração e teste devem ser idênticos.**

## Preparo do Padrão

Transferir todo o conteúdo de frasco 2 para um tudo de ensaio limpo e seco, medir 3,0 mL e adicionar ao frasco Padrão (1), contendo 0,3 mg e bilirrubina. Homogeneizar bem, deixar em repouso durante 5 minutos e homogeneizar novamente para completa dissolução da bilirrubina.

Protegido da luz, o padrão é estável por 12 horas entre 2 – 8 °C após reconstituído e 1 mês a 20 °C negativos após reconstituído.

O Padrão só deverá ser congelado e descongelado uma vez.

A concentração final da solução Padrão é de 10 mg/dL.

## Técnica

Realizar a técnica com o kit de Bilirrubina Ref. BA031 Bioanalítica, utilizando o Reagente 2, Reagente 3 e o Diazo Reagente que deve ser preparado e utilizado no mesmo dia.

## Preparo do Diazo Reagente

Adicionar 0,01 mL de Nitrito de Sódio (3) a 0,3 mL do Ácido Sulfanílico (2). Homogeneizar e utilizar somente no dia da preparação. Não guardar para uso posterior.

Dosar o padrão em triplicata. É importante observar que a variação entre as absorbâncias seja inferior a 3% para que a média possa ser utilizada no cálculo do fator de calibração.

Reagentes	Branco	Padrão
Acelerador (1)	1,0 mL	1,0 mL
Ácido Sulfanílico (2)	0,1 mL	-----
Diazo Reagente	-----	0,1 mL
Padrão	0,05 mL	0,05 mL

Homogeneizar bem e esperar 5 minutos. Ler a absorbância dos padrões em 525 nm (500 - 540 nm), acertando o zero com o Branco.

Esta técnica é adequada para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Verificar a necessidade de ajuste do volume, e modificar proporcionalmente para não alterar os cálculos e o desempenho do teste. Volumes de amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais, pois aumentam a imprecisão da medição.

## Cálculo

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{10}{\text{Absorbância do padrão (média)}}$$

## Características do Desempenho

### Comparação de Métodos

O método foi comparado com outro produto com metodologia semelhante através de 40 amostras de soro humano. Através de modelos estatísticos, os resultados foram analisados e resultaram na equação de regressão linear onde Método Bioanalítica ( $y$ ) =  $-0,698 + 1,073^*$  Método comparativo ( $x$ ) e coeficiente de correlação igual a 0,992.

## Repetitividade/Reprodutibilidade

A repetitividade/reprodutibilidade foram calculadas a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando a Bilirrubina Padrão, obtendo-se os seguintes resultados:

Repetitibilidade		Reprodutibilidade	
Média:	9,91	Média:	9,92
DP:	0,04	DP:	0,10
CV%	0,43	CV%	1,05

## Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores da Bioanalítica.

## Observações

- A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/cm ou condutividade < 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens. No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna de deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Ref. BA034

MS 81666810032

## Referências Bibliográficas

- 1 - Recommendations of the College of American Pathologists Standards Committee: Aunifor Bilirubin Standard. Am. J. Clin. Pathol. 39.90, (1963).
- 2 - Doumas, BT., Perry, BW. Sasse, EA., Straumfjord Jr., J. V., Clin. Chem. 19: 984, 1973.
- 3 - SIMS, F. H. e Horn, C., Am. J. Clin. Path. 1958;29: 412.
- 4 - Malloy HT. e Evelyn KA. - J. Biol. Chem. 119:481, 1937.
- 5 - Recommendations on a Uniform Bilirubin Standard. Clin. Chem. 1962; 8:405.
- 6 - Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

## Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicadas nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

## Apresentação

Ref.	Volume	Reagente 1	Reagente 2
BA034-3	3 mL	1 x 0,3 mg	1 x 3,5 mL

## Bioanalítica Diagnóstica S/A.

Rua Álvares da Silva, 12 - União  
CEP: 31.160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil  
Tel. +55 31 3657-0051 –  
[www.bioanalitica.com.br](http://www.bioanalitica.com.br)  
E-mail: [bioanalitica@bioanalitica.com.br](mailto:bioanalitica@bioanalitica.com.br)  
CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira  
SAC: 0800 006 8111  
e-mail: [sac@bioanalitica.com.br](mailto:sac@bioanalitica.com.br)

Revisão: Ourubro / 2022.