

## Método

Colorimétrico Sims-Horn.

## Finalidade

Sistema para a determinação quantitativa da bilirrubina direta e total no soro ou plasma por reação de ponto final.

**Somente para uso diagnóstico in vitro.**

## Princípio

A reação da Bilirrubina com o reagente diazo forma Azobilirrubina que é um complexo de coloração vermelha. A intensidade de cor formada é diretamente proporcional à concentração de Bilirrubina na amostra. A Bilirrubina Total é dosada em presença de um acelerador (Cafeína e Benzoato), enquanto a Bilirrubina Direta é dosada em meio aquoso.

## Significado Clínico

O aumento da bilirrubina está ligado a doenças hepatocelulares e as obstruções das vias biliares. Aumento da bilirrubina é observado nas diversas causas da hemólise, diminuição do transporte por ação de medicamentos e anticorpos, defeito na captação da bilirrubina (bloqueio das lingandinas), ou por defeito na conjugação da bilirrubina (icterícia do recém-nascido, doença de Gilbert entre outras).

## Reagentes

**1 - Acelerador** - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Benzoato de sódio 260 mmol/L, Cafeína 130 mmol/L, Acetato de Sódio 460 mmol/L, detergentes e estabilizantes.

**2 - Sulfanílico** - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Ácido Sulfanílico 6 mmol/L e estabilizantes.

**3 - Nitrito de Sódio** - Conservar entre 15 e 30°C. Contém: Nitrito de Sódio 70 mmol/L e estabilizantes.

## 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

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- 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.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiros descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.

## Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analisador bioquímico semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiros;
- Estantes;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro.

## Amostra

Soro ou plasma (EDTA/Heparina). O analito é estável por 4 dias armazenada entre 2 e 8°C e 3 meses a 20°C negativos, quando livres de contaminação.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos deve-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

## Interferências e Limitações

As bilirrubinas são oxidadas por ação da luz, portanto as amostras de sangue devem ser protegidas da exposição direta à luz artificial ou solar. Amostras hemolisadas produzem valores falsamente diminuídos na determinação da bilirrubina direta.

Valores de triglicérides entre 250 e 1192 mg/dL apresentam interferência, levando a resultados falsamente diminuídos.

Hemoglobina acima de 130 mg/dL apresentam resultados falsamente elevados na bilirrubina. Presença de ácido ascórbico produzem interferência significativa.

## Procedimento Técnico

Os procedimentos usados para calibração e teste devem ser idênticos.

**Nota:** Para avaliar a precisão das dosagens, recomendamos o uso do Controle N – Ref. BA115 e Controle P – Ref. BA118. *Devido a Bilirrubina ser um composto extremamente fotossensível, recomendamos ainda, o uso dos Controles recém reconstituídos e que não tenham sido expostos a luz, evitando assim baixa nos resultados.*

## Preparo do Diazo Reagente

Adicionar 0,01 mL de Nitrito de Sódio (3) a 0,3 mL do Ácido Sulfanílico (2). Homogeneizar e utilizar logo após o preparo. Não guardar para uso posterior.

Identificar 3 tubos de ensaio: B (Branco), D (Direta), T (Total) e proceder como a seguir:

Reagentes	Branco	Direta	Total
Água Deionizada	1,0 mL	1,0 mL	---
Acelerador (1)	---	---	1,0 mL
Ácido Sulfanílico	0,1 mL	-	-
Diazo Reagente	---	0,1 mL	0,1 mL
Amostra	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL

Homogeneizar bem e esperar 5 minutos. Ler a absorbância das bilirrubinas direta e total em 525 nm (500 - 540 nm), acertando o zero com o Branco. A cor é estável por 30 minutos.

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.

## Cálculos

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = (\text{Absorbância do Teste} \div \text{Absorbância do padrão}) \times \text{Concentração do Padrão}$$

## Exemplos com Padrão

Absorbância do Teste = 0,168

Absorbância do Padrão = 0,339

Concentração do Padrão = 10 mg/dL

$$\text{Bilirrubina} = (0,168 \div 0,339) \times 10 = 4,96 \text{ mg/dL}$$

## Exemplos com Fator de Calibração

$$F_c = 10 \div 0,339 = 29,5$$

$$\text{Bilirrubina} = 0,168 \times 29,5 = 4,96 \text{ mg/dL}$$

**A Bilirrubina Indireta é obtida pela diferença entre as Bilirrubinas Total e Direta.**

## 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 Bilirrubina Direta ( $y$ ) =  $-0,003 + 1,021^* \text{Método comparativo (x)}$  e coeficiente de correlação igual a 0,992 e Bilirrubina Total ( $y$ ) =  $-0,041 + 1,043^* \text{Método comparativo (x)}$  e coeficiente de correlação igual a 0,994.

## Sensibilidade

Uma amostra proteica não contendo Bilirrubina Direta, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 0,0265 mg/dL equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,0032 mg/dL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método, corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 0,0361 mg/dL.

Uma amostra proteica não contendo Bilirrubina Total, foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio. A média encontrada foi 0,0415 mg/dL equivalente a 20 determinações, com desvio padrão de 0,0024 mg/dL. A sensibilidade, que indica o limite de detecção do método,

corresponde à média mais 3 vezes o desvio padrão, que é igual a 0,0488 mg/dL.

### Linearidade

A reação é linear até 20 mg/dL. Para amostras com valores acima de 20 mg/dL, diluir a amostra com Cloreto de Sódio 150 mmol/L (0,85%), repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

### Repetitividade

A repetitividade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

<b>Bilirrubina Direta</b>	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,11	0,35	0,92
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,01
Coefficiente de Variação (%)	6,77	2,24	1,37

<b>Bilirrubina Total</b>	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,27	0,95	4,51
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,02
Coefficiente de Variação (%)	4,09	1,43	0,39

### Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi calculada a partir de 20 determinações sucessivas durante 20 dias consecutivos, utilizando 3 amostras com concentrações diferentes, obtendo-se os seguintes resultados:

<b>Bilirrubina Direta</b>	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,08	0,26	1,39
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,03
Coefficiente de Variação (%)	8,11	3,26	1,84

<b>Bilirrubina Total</b>	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração Média (mg/dL)	0,32	0,87	8,26
Desvio Padrão (mg/dL)	0,01	0,01	0,23
Coefficiente de Variação (%)	2,33	1,23	2,77

### Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável

### Adultos, crianças e adolescentes

Bilirrubina Total: até 1,2 mg/dL  
Bilirrubina Direta: até 0,4 mg/dL

**Recém-nascidos** - Bilirrubina Direta: até 0,4 mg/dL

### Recém-nascidos - Bilirrubina Total

1 dia: até 5,1 mg/dL  
1 a 2 dias: até 7,2 mg/dL  
3 a 5 dias: até 10,3 mg/dL

Os resultados fornecidos por este kit devem ser interpretados pelo profissional médico responsável, não sendo o único critério para a determinação do diagnóstico e/ou tratamento do paciente.

### 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 controle e calibradores 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 megaohms ou condutividade < 10 microsiemens. No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna 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.

### Referências Bibliográficas

1. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC: Pediatric Reference Ranges, 5ª edição, Washington: AACC Press, 2005:42-43.
2. SIMS, F. H. e Horn, C., Am. J. Clin. Path. 1958;29: 412.
3. Malloy HT. e Evelyn KA. - J. Biol. Chem. 119:481, 1937.
4. Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JW. Clinical Chemistry, Principles and Technics, 2a Ed. New York, Harper & Row, 1974.
5. Powell WN., Am. J. Clin. Path. 8, 55, 1944.
6. Martineck RG Clin Chim Acta 1966; 13:161.
7. 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	Reagente 3
BA031-375	375 mL	1 x 250 mL	1 x 120 mL	1 x 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  
E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br  
CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira  
SAC: 0800 006 8111  
e-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Outubro / 2022.