

### FINALIDADE

Sistema colorimétrico para determinação das bilirrubinas no soro ou plasma.

**Somente para uso diagnóstico *in vitro*.**

### PRINCÍPIO

A bilirrubina presente no soro é constituída por 4 frações:

Bilirrubina livre não conjugada -  **$\alpha$  bilirrubina**;

Bilirrubina monoconjugada -  **$\beta$  bilirrubina**;

Bilirrubina diconjugada -  **$\gamma$  bilirrubina**;

Bilirrubina ligada covalentemente à albumina -  **$\delta$  bilirrubina**.

As frações  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  são hidrossolúveis e reagem, diretamente, com o diazo reagente e são chamadas no conjunto de **bilirrubina direta**.

A fração  $\alpha$  da bilirrubina é insolúvel na água. Sua solubilidade é alcançada com aditivos (cafeína, álcool, cetrimide, etc) chamados de aceleradores e representa o que se chama de **bilirrubina indireta**.

A bilirrubina dosada na presença de solução **aceleradora** é chamada de **bilirrubina total** pois representa a soma das **bilirrubinas direta e indireta**.

### PARTICULARIDADES DO SISTEMA

**Bilirrubina Doles** é uma modificação da técnica de Sims-Horn permitindo a determinação da bilirrubina total e frações em apenas 3 minutos. Os reagentes são todos estáveis à temperatura ambiente. A simplicidade da técnica permite que o diazo-reagente seja preparado dentro do próprio tubo de reação, através de um sistema de conta gotas.

### METODOLOGIA

Sims-Horn

### REAGENTES

**Solução aceleradora:** solução de Benzoato de Cafeína tamponada. Contém por litro: Benzoato de Sódio 0,13M e Cafeína 0,13M.

**Reagente sulfanílico:** solução de Ácido Sulfanílico 0,04M em Ácido Clorídrico 0,45M.

**Nitrito de Sódio:** cada frasco contém 0,45mmol de Nitrito de Sódio.

**Solução padrão 10mg/dL:** cada frasco contém 0,00346mmol de N-1-naftiletilenodiamina liofilizado.

### APRESENTAÇÃO

Solução aceleradora	1 x 210mL
Reagente sulfanílico	1 x 30mL
Nitrito de Sódio	1 x 20mL
Solução padrão 10mg/dL (após reconstituição)	1 x 5mL

### NÚMERO DE TESTES

Técnica Macro - 104 testes

Técnica Micro - 208 testes

### EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 530nm ou filtro verde.
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas 50 $\mu$ L ou 200 $\mu$ L.
- Ponteiras descartáveis.
- Água destilada ou deionizada.
- Cronômetro.

### ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES DE USO

**Solução aceleradora:** armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

**Reagente sulfanílico:** armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

**Nitrito de Sódio:** armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

**Solução padrão 10mg/dL:** na forma liofilizada, armazenar à temperatura de 20-30°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. Após a reconstituição, estável por 8 dias, se armazenada entre 2-8°C.

### CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se o contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação acidental, lavar a área afetada em água corrente. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Corrosivo



Irritante

### AMOSTRA

Soro ou plasma (colhido com heparina), isento de hemólise e lipemia. Até a realização do teste, **o soro deve ser mantido refrigerado e ao abrigo da luz**. Se protegida da luz, a bilirrubina permanece estável por 3 dias, entre 2-8°C, e por 3 meses a 10°C negativos.

**Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como sendo potencialmente infectantes.**

### PROCEDIMENTO TÉCNICO

**Solução padrão 10mg/dL:** reconstituir a solução pela adição de 5mL de água destilada e agitar. **Após 10 minutos**, a solução está pronta para uso. Estável por 8 dias, sob refrigeração (2-8°C).

### DETERMINAÇÃO DO FATOR (F)

**Como a diluição do soro é diferente nas técnicas macro e micro, faz-se necessária a determinação de um fator para cada modalidade logo que a solução padrão seja preparada.**

### TÉCNICA MACRO

Rotular um tubo de ensaio com **P (padrão)** e adicionar:

<b>Nitrito de Sódio</b>	2 gotas
<b>Reagente sulfanílico</b>	4 gotas
<b>Água destilada</b>	4 mL
<b>Solução Padrão</b>	200 $\mu$ L



Misturar, deixar repousar por 3 minutos e ler o tubo **P**, zerando o aparelho com **água destilada**, em **530nm** ou **filtro verde**.

#### TÉCNICA MICRO

Rotular um tubo de ensaio com **P (padrão)** e adicionar:

<b>Nitrito de Sódio</b>	1 gota
<b>Reagente sulfanílico</b>	2 gotas
<b>Água destilada</b>	2 mL
<b>Solução Padrão</b>	50µL

Misturar, deixar repousar por 3 minutos e ler o tubo **P**, zerando o aparelho com **água destilada**, em **530nm** ou **filtro verde**.

#### DETERMINAÇÃO DA AMOSTRA

##### TÉCNICA MACRO

Antes de iniciar as dosagens ler atentamente os itens a seguir:

- A ordem de adição dos reagentes é de fundamental importância para a obtenção de resultados satisfatórios. A alteração da adição dos reagentes compromete a formação do diazo-reagente tendo como consequência resultados falsamente diminuídos.
- No gotejamento dos reagentes nitrito de sódio e sulfanílico, o frasco deve ser mantido na posição vertical, afim de se evitar que a gota caia pelas paredes do tubo, o que levará ao comprometimento da formação do diazo-reagente.

Identificar 3 tubos de ensaio com **B (branco)**, **BD (bilirrubina direta)**, **BT (bilirrubina total)**.

Proceder como segue:

	<b>B</b>	<b>BD</b>	<b>BT</b>
<b>Nitrito de Sódio</b>	-	2 gotas	2 gotas
<b>Reagente sulfanílico</b>	4 gotas	4 gotas	4 gotas
<b>Água destilada</b>	4 mL	4 mL	-
<b>Solução aceleradora</b>	-	-	4 mL
<b>Amostra</b>	200µL	200µL	200µL

Misturar por agitação o conteúdo dos 3 tubos e deixar repousar por 3 minutos (20-30°C). Ler as absorvâncias de **BD** e **BT**, em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, ajustando o zero do aparelho com o respectivo **branco** em **530nm** ou **filtro verde**. A cor final permanece estável por 30 minutos, à temperatura de 20-30°C.

**A sensibilidade do sistema está diretamente relacionado com a sensibilidade do equipamento de leitura.**

#### TÉCNICA MICRO

Antes de iniciar as dosagens ler atentamente os itens a seguir:

- Utilizar a técnica micro somente para dosagens em amostras com bilirrubinas elevadas (amostras ictericas). Atenção! A técnica micro é inadequada para dosagem de bilirrubinas em amostras de soro com aspecto físico normal.

• A ordem de adição dos reagentes é de fundamental importância para a obtenção de resultados satisfatórios. A alteração da adição dos reagentes compromete a formação do diazo-reagente tendo como consequência resultados falsamente diminuídos.

• No gotejamento dos reagentes nitrito de sódio e sulfanílico, o frasco deve ser mantido na posição vertical, afim de se evitar que a gota caia pelas paredes do tubo, o que levará ao comprometimento da formação do diazo-reagente.

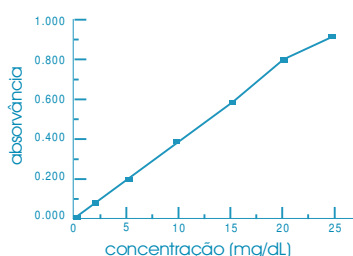
Identificar 3 tubos de ensaio com **B (branco)**, **BD (bilirrubina direta)**, **BT (bilirrubina total)**.

Proceder como segue:

	<b>B</b>	<b>BD</b>	<b>BT</b>
<b>Nitrito de Sódio</b>	-	1 gota	1 gota
<b>Reagente sulfanílico</b>	2 gotas	2 gotas	2 gotas
<b>Água destilada</b>	2 mL	2 mL	-
<b>Solução aceleradora</b>	-	-	2 mL
<b>Amostra</b>	50µL	50µL	50µL

Misturar por agitação o conteúdo dos 3 tubos e deixar repousar por 3 minutos (20-30°C). Ler as absorvâncias de **BD** e **BT**, ajustando o zero do aparelho com o respectivo **branco** em **530nm** ou **filtro verde**. A cor final permanece estável por 30 minutos, à temperatura de 20-30°C.

#### CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (gm/dL)
1	0.000	0
2	0.078	2
3	0.198	5
4	0.395	10
5	0.590	15
6	0.800	20
7	0.910	25

**Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.**

• A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico, em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.

As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 530nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.

• A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F), de acordo com a Lei de Beer.

• **A reação é linear entre 0 e 20mg/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, dilui-se a amostra com solução fisiológica e procede-se à nova**



**dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**

- **O kit de Bilirrubina Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia de Sims-Horn. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F), de acordo com o exemplo estabelecido nos cálculos.**
- **O fator deve ser feito a cada lote do produto.**

## CÁLCULOS

$$\text{Fator (F)} = \frac{10}{\text{absorvância P}}$$

$$\text{Bilirrubina total (mg/dL)} = \text{absorvância BT} \times F$$

$$\text{Bilirrubina direta (mg/dL)} = \text{absorvância BD} \times F$$

$$\text{Bilirrubina indireta (mg/dL)} = \text{BT} - \text{BD}$$

**Exemplo:**

Leituras:

$$\text{Padrão: } 0,395 \quad F = \frac{10}{0,395} = 25,31$$

Teste:

$$\text{BD: } 0,010$$

$$\text{BT: } 0,040$$

$$\text{Bilirrubina total (mg/dL)} = 0,040 \times 25,31 = 1,01$$

$$\text{Bilirrubina direta (mg/dL)} = 0,010 \times 25,31 = 0,25$$

$$\text{Bilirrubina indireta (mg/dL)} = 1,01 - 0,25 = 0,76$$

## EXPRESSÃO EM UNIDADES S.I.

$$\text{Bilirrubina } (\mu\text{mol/L}) = \text{Bilirrubina (mg/dL)} \times 17,1$$

## LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- A bilirrubina indireta não é hidrossolúvel e para reagir com o diazo-reagente é necessário a adição de um componente que a torne hidrossolúvel. A solução aceleradora torna a fração indireta hidrossolúvel, possibilitando a reação com o diazo-reagente. Além da aceleradora fatores interferentes podem torná-la hidrossolúvel antes mesmo de proceder a reação, o que levaria neste caso uma **BD alterada** não por motivos biológicos. Os interferentes mais conhecidos são luz e temperatura.  
A literatura relata que a **bilirrubina  $\alpha$**  possui uma estrutura conformacional chamada **trans**. **Na presença de luz a conformação desta molécula muda de trans para cis** (posição que torna a bilirrubina hidrossolúvel). Nestas condições, porções de bilirrubina indireta, solubilizadas, reagem de maneira idêntica à bilirrubina direta. Em pacientes anictéricos pode haver um aumento artificial da bilirrubina direta, tendo resultados finais de bilirrubina direta próxima ou até superior a total.
- Amostras com teor de Triglicérides entre 170 - 3500mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos.
- Amostras com teor de Hemoglobina entre 30 e 180mg/dL produzem resultados falsamente elevados na Bilirrubina total e falsamente diminuídos na determinação da Bilirrubina direta.
- Avaliação da concentração de Hemoglobina em uma amostra hemolisada:  
1- Adicionar 50 $\mu$ L da amostra em 2,0mL de solução fisiológica.

2-Ler a absorvância em 405 ou 415nm. Zerar o aparelho com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hb (mg/dL)} = \text{Absorvância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hb (mg/dL)} = \text{Absorvância}_{415} \times 467$$

- Algumas drogas podem elevar o nível de bilirrubina. Entre elas estão: o alopurinol, esteróides anabolizantes, ácido ascórbico, clopramida, colinérgicos, codeína, dextran, diuréticos, epinefrina, metrotexate, metildopa, inibidores da MAO, morfina, quinidina, rifampicina, salicilatos, sulfonamidas, teofilina e vitamina A.
- Algumas drogas podem diminuir o nível de bilirrubina total. Entre elas estão: os barbitúricos, cafeína, penicilina e salicilatos em altas doses.
- A bilirrubina é extremamente fotossensível, devendo o soro ser mantido ao abrigo da luz e refrigerado.
- O uso de plasma cujo sangue foi colhido com anticoagulante à base de EDTA é contra-indicado. O sal EDTA reage com Benzoato de Sódio formando-se Ácido Benzóico. Este, insolúvel, precipita-se e turva a solução. À leitura, no espectrofotômetro, teremos resultados falsamente elevados.

## CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos. **Resquícios de produtos de limpeza nos tubos de ensaio podem ocasionar resultados falsamente elevados**
2. A água utilizada na limpeza do material, no preparo dos reagentes e na dosagem, deve ser de boa qualidade.
3. Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, amins e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.
5. O uso de soro controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar um soro controle com valor na faixa de normalidade (**soro controle N - Doles**) e outro soro controle de valor elevado (**soro controle P - Doles**).
6. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a sensibilidade do equipamento de leitura.

## VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida. Como orientação sugerimos os seguintes valores:  
Bilirrubina direta até 0,4mg/dL  
Bilirrubina total até 1,2mg/dL

## SIGNIFICADO CLÍNICO

A bilirrubina é o produto final da degradação da hemoglobina. Como esse processo ocorre nas células hepáticas, níveis alterados de bilirrubina indicam alterações hepatocelulares, obstrução biliar ou icterícia hemolítica.  
A hiperbilirrubinemia ocorre nas seguintes condições: no recém nascido, podendo atingir 12mg/dL, na icterícia obstrutiva, na icterícia hepatocelular (parenquimatosa), nas hepatites por vírus e na necrose hepática aguda, havendo predominância da bilirrubina direta (BD).  
As icterícias por hemólise são secundárias à anemia hemolítica, hemoglobinúria paroxística, policitemia, má-lária, transfusão de sangue incompatível e anemia hemolítica do recém nascido (eritroblastose fetal). Nessas situações a BD está pouco elevada, havendo nítida predominância da bilirrubina indireta (BI).  
A determinação da bilirrubina no líquido amniótico é de importância fundamental no diagnóstico pré natal da enfermidade hemolítica. Valores menores que 0,1 mg/dL são considerados normais, enquanto que valores entre 0,1 e 0,27mg/dL são encontrados somente em presença de eritroblastose fetal.



## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 44 testes em amostras cujo teor de bilirrubina se situava no intervalo de 0,45 a 23mg/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit de Bilirrubina Doles (Y) com a metodologia mencionada (X) deu origem à seguinte equação de regressão linear:  $Y = 0,30 + 1,01X$ , sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Testes de recuperação mostraram índice de recuperação equivalente a  $97 \pm 3,5\%$ .

O erro da média foi de 1,96%.

**Repetitividade:** foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com 2 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
<b>Concentração (mg/dL)</b>	1,21	16,00
<b>Desvio padrão</b>	0,06	0,32
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	4,96	2,00

**Reprodutibilidade:** foram realizadas 20 dosagens, durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
<b>Concentração (mg/dL)</b>	1,21	17,90
<b>Desvio padrão</b>	0,06	0,54
<b>Coefficiente de variação (%)</b>	4,96	3,01

**Especificidade:** a presente metodologia é das mais específicas entre as utilizadas na determinação da bilirrubina. A metodologia de Sims-Horn é específica para determinação de bilirrubina, sendo a mesma detectada em baixas concentrações.

**Sensibilidade:** a absorvância encontrada, de 0,005, corresponde a 0,125mg/dL de bilirrubina direta e a absorvância encontrada, de 0,010, corresponde a 0,25mg/dL de bilirrubina total, quando realizados os testes em espectrofotômetro, a 530nm. A sensibilidade do sistema está diretamente relacionada com a do aparelho utilizado no laboratório.

**Diluição da matriz:** estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia de Sims-Horn.

**Substâncias interferentes:** a dosagem de bilirrubina total em plasma contendo EDTA apresenta resultados elevados. O EDTA existente no plasma reage com Benzoato de Sódio, com formação de Ácido Benzoico. Este, insolúvel, fica em suspensão na amostra, gerando graus variados de turbidez, responsável pelo aumento artificial da bilirrubina total. Acentuada hemólise pode levar a resultados falsamente elevados.

## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Jendrassik, L., e Grof, P.: *Biochem. Z.* 297,81, 1938.
- Sims, F.H., Horn, C.: *Am.J. Clin. Path.* 29: 412, 1958.
- Malloy, H.T. e Evelyn, K.A., J.: *Biol. Chem.* 119, 481, 1973.
- Tibúrcio, H.M.: *Controle Interno da Qualidade Analítica*, 1ªed. março/1995.
- Henry, J.B.: *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 19ª ed, 258-260, 1996.
- BURTIS, Carla., ASHWOOD, Edward R. *Tiez Textbook of Clinical Chemistriz*. 3ª ed. Philadelphia: Saunder, 1999.p.1133-1136.
- Doles: dados de arquivo.

## TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**.

Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- 1.O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
- 2.As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

**Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.**

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.  
CNPJ: 01.085.513/0001-05  
Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07,Chácara Retiro  
CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil  
Caixa Postal 1051  
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810035

Revisão: 15 (08/2009)

**NBR ISO 9001**  
**Sistema da Qualidade**  
**certificado desde 1999**

