



## INSTRUÇÕES DE USO (Versão Ago/18)

# BILIRRUBINA DIRETA

(Malloy-Evelyn) - Método Colorimétrico

### FINALIDADE

O conjunto é um sistema que se destina à determinação quantitativa da bilirrubina direta no soro animal baseado na reação de Malloy-Evelyn. Exclusivo para uso em diagnóstico "in vitro".

### PRINCÍPIO DE AÇÃO

O ácido sulfanílico reage com o nitrito de sódio para formar o ácido sulfanílico diazotado (diaz). A bilirrubina reage com o diazo formando um produto de acoplamento vermelho na presença do dimetilsulfóxido. A bilirrubina indireta (ligada à albumina) e a bilirrubina direta (ligada ao ácido glicurônico) são dosadas após a ação de um agente solubilizante e catalizador da mistura. 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 110 mL:

1. **Bilirrubina Direta:** 02 frascos contendo 50 mL cada, de solução de ácido sulfanílico 35 mmol/L, ácido clorídrico 180 mmol/L. Conservar entre 2-8°C.

2. **Nitrito:** 02 frascos contendo 5 mL cada, de solução de nitrito de sódio 33 mmol/L, azida sódica 0,095% p/v. Conservar entre 2-8°C.

### 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.

### 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. Não comer, beber, fumar, armazenar ou preparar alimentos, ou aplicar cosméticos dentro da área de trabalho onde reagentes e amostras estiverem sendo manuseados.
8. Usar luvas descartáveis quando manusear amostras clínicas ou reagentes. Lavar sempre as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.
9. 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.
10. Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante.

### AMOSTRA

#### Soro

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

### PROCEDIMENTO

Pipetar em tubos de ensaio:

	Branco Reagente	Branco Amostra	Amostra/ Calibrador
R1-Bilirrubina Direta	1000 µL	1000 µL	1000 µL
R2- Nitrito	---	---	30 µL
Amostra/Calibrador	---	50 µL	50 µL

Homogeneizar bem e aguardar 5 minutos na temperatura ambiente (15-25°C). Determinar as absorvâncias do Calibrador, Branco do Calibrador, Amostra e Branco da Amostra em 550 nm (530-570), acertando o zero com o branco de reagente. A cor formada é estável por 30 minutos.

**Nota:** Para teste em amostra pediátrica com bilirrubina acima de 3.0 mg/dL, avaliar amostra após diluição 1:1 com salina e multiplicar o resultado por 2.

### CÁLCULOS

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

#### Com Calibrador

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

#### Exemplo:

Concentração do Calibrador = 5,16 mg/dL

Absorvância da Amostra = 0,206

Absorvância Branco da Amostra = 0,026

Absorvância do Calibrador = 0,289

Absorvância Branco Calibrador = 0,013

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = \frac{0,206 - 0,026}{0,289 - 0,013} \times 5,16 = 3,36 \text{ mg/dL}$$

### 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.

**Recém-nascidos, filhotes, Adolescentes e Adultos:** Até 0,4mg/dL

Conversão para Unidade do Sistema Internacional (SI): µmol/L

Bilirrubina (mg/dL) x 17,1 = Bilirrubina (µmol/L)

### LINEARIDADE

A reação é linear até 18 mg/dL.

## DADOS ESTATÍSTICOS DE DESEMPENHO DO TESTE

**Sensibilidade:** 98%

**Exatidão:** A comparação com método similar validado demonstrou um coeficiente de correlação,  $r$ , igual a 0,950 a partir da análise de amostras aleatórias oriundas de pacientes de ambulatório. A equação de regressão obtida foi:  $y=1,0458x - 0,006$  e  $r$ , igual a 0,972, demonstrando uma exatidão de 95%.

## Precisão

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

Repetibilidade	Amostra
Média	0,77
Desvio Padrão	0,07
Coefficiente de Variação (%)	9,7

**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:

Reprodutibilidade	Amostra
Média	0,78
Desvio Padrão	0,07
Coefficiente de Variação (%)	9,0

**Sensibilidade analítica:** 0,092 mg/dL

## AUTOMAÇÃO

Aplicações para analisadores automáticos estão disponíveis quando 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

Evitar o uso de amostra hemolisada, pois a hemoglobina produz resultados falsamente diminuídos. Evitar o uso de amostras com valores de Triglicérides >150 mg/dL. Todos anticoagulantes interferem na dosagem. Uma lista de drogas e outras substâncias interferentes com bilirrubina foi descrita por Motta<sup>5</sup>.

## 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.Motta, V.T. Bioq. Clin. Para Laboratório - Ed. Med. Missau:2003.
- 6.Katal: Dados de arquivo

## APRESENTAÇÃO

110 mL	Volume
1. Bilirrubina Direta	2 x 50 mL
2. Nitrito	2 x 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 TÉCNICA

Para esclarecimentos de dúvidas e Assessoria Técnica ligue:

(31) 3309-9262

e-mail: [biofocovet@focovet.com.br](mailto:biofocovet@focovet.com.br)



CNPJ: 71.437.917/0001-04

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