



INSTRUÇÕES DE USO (Versão Jul/23)

BILIRRUBINA DIRETA

Colorimétrico – DCA

FINALIDADE

O conjunto é um sistema que se destina à determinação quantitativa da bilirrubina direta no soro humano baseado por formação e azobilirrubina com diclorofenil diazônio. Exclusivo para uso em diagnóstico “in vitro”.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O diclorofenil diazônio reage com a bilirrubina direta formando um azocomposto, de coloração avermelhada, com máximo de absorção em 546 nm. A concentração de bilirrubina é diretamente proporcional à intensidade da cor formada.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A bilirrubina é produzida durante a degradação normal ou patológica de eritrócitos no sistema reticulo-endotelial. O produto desta reação é a bilirrubina indireta (não conjugada) que é encaminhada ao fígado e convertida em bilirrubina direta (conjugada). Algumas doenças adquiridas ou hereditárias, além do uso de certos medicamentos podem comprometer o mecanismo de metabolização e excreção da bilirrubina, levando à icterícia, caracterizada pelo aumento de sua concentração sérica. 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

- 1. **Tampão:** Contém: Ácido Sulfâmico <150 mmol/L e estabilizantes. Conservar entre 2-8°C.
- 2. **Reagente de Cor:** Contém: Diclorofenil Diazônio <10 mmol/L e estabilizantes. Conservar entre 2-8°C.
- 3. **Calibrador:** Contém bilirrubina em matriz liofilizada. A concentração do calibrador varia lote a lote.

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 ponteiras 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

Preparo dos reagentes

Adicionar exatamente 1,00 mL de água deionizada ao frasco do R3 – Calibrador. Homogeneizar suavemente, com movimentos circulares, e aguardar 10 minutos até completa dissolução. Os demais reagentes já são prontos para uso.

Pipetar em tubos de ensaio:

|                 | Branco  | Calibrador | Teste   |
|-----------------|---------|------------|---------|
| R1-Tampão       | 1,0 mL  | 1,0 mL     | 1,0 mL  |
| Amostra         | ---     | ---        | 0,10 mL |
| R3 - Calibrador | ---     | 0,10 mL    | ---     |
| Água deionizada | 0,10 mL | ---        | ---     |

Homogeneizar bem e incubar em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Determinar somente as absorbâncias do teste e do calibrador em 546 nm (530 – 550nm), acertando o zero com água deionizada. Essa será a Absorbância 1 (A<sub>1</sub>).

|                      | Branco  | Calibrador | Teste   |
|----------------------|---------|------------|---------|
| R2 – Reagente de Cor | 0,25 mL | 0,25 mL    | 0,25 mL |

Homogeneizar bem e incubar em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Determinar somente as absorbâncias do teste e do calibrador em 546 nm (530 – 550nm), acertando o zero com o branco. Essa será a Absorbância 2 (A<sub>2</sub>).

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.

Corrigir o valor de A<sub>1</sub> do Teste e do Calibrador pelo fator de diluição 0.81.

Teste: A<sub>1</sub> x 0,81 = A<sub>1corrigida</sub>

Calibrador: A<sub>1</sub> x 0,81 = A<sub>1corrigida</sub>

A absorbância final é obtida através da subtração do valor de A<sub>2</sub> por A<sub>1corrigida</sub>

Bilirrubina(mg/dL)=  $\frac{\text{Abs Teste } (A_2 - A_{1\text{corrigida}})}{\text{Abs Calibrador } (A_2 - A_{1\text{corrigida}})} \times \text{Conc. Cal (mg/dL)}$

Exemplo:

Amostra:  
A<sub>1</sub>: 0,108  
A<sub>2</sub>: 0,164  
A<sub>1corrigida</sub>: 0,108 x 0,81 = 0,088  
Absorbância do Teste: 0.164 – 0,088 = 0,076

Calibrador  
Concentração: 1,29 mg/dL  
A<sub>1</sub>: 0,144  
A<sub>2</sub>: 0,374  
A<sub>1corrigida</sub>: 0,144 x 0,81 = 0,117  
Absorbância do Calibrador: 0,374 – 0,117 = 0,257

Bilirrubina Direta (mg/dL) =  $\frac{0,076}{0,257} \times 1,29 = 0,38 \text{ mg/dL}$

Cálculo com Fator

Fator =  $\frac{\text{Conc. Calibrador}}{\text{Absorbância do Calibrador}}$

Bilirrubina Direta (mg/dL) = Absorbância do Teste x Fator

Exemplo:

Fator:  $\frac{1,29}{0,257} = 5,019$

Bilirrubina Direta (mg/dL) = 0,076 x 5,019 = 0,38 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, Crianças, Adolescentes e adultos: Até 0,4 mg/dL

Conversão para Unidade do Sistema Internacional (SI):  $\mu\text{mol/L}$

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

### LINEARIDADE

A reação é linear até 12 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 0,9907 a partir da análise de amostras aleatórias oriundas de pacientes de ambulatório. A equação de regressão obtida foi  $y=0,9052x + 0,0098$ , demonstrando uma exatidão de 98%.

### 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                        | 0,55    |
| Desvio Padrão                | 0,03    |
| Coefficiente de Variação (%) | 5,0     |

**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                        | 0,56    |
| Desvio Padrão                | 0,01    |
| Coefficiente de Variação (%) | 4,4     |

**Sensibilidade analítica:** 0,005 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 os 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

| Reagentes          | Volume    |
|--------------------|-----------|
| 1. Tampão          | 1 x 80 mL |
| 2. Reagente de Cor | 1 x 24 mL |
| 3. Calibrador      | 1 x 1 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](mailto: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.: 10377390233

**Data da última revisão: 03/07/2023**

| SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA PRODUTOS DIAGNÓSTICOS<br>“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                                    |