

Instruções de Uso

cepa

Bilirrubina Cepa - Colorimétrica .

Método

Método colorimétrico (Sims-Horn) para dosagem das bilirrubinas direta e total.

Finalidade

Kit para determinação da bilirrubina (direta e total) em amostras de soro ou plasma.

Princípio do método

A bilirrubina é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525 nm. A bilirrubina direta (ligada ao ácido glicurônico) é dosada em meio aquoso e a bilirrubina total (direta e indireta) é dosada por ação de solubilizador de ação catalizadora. A bilirrubina indireta pode ser determinada pela diferença entre as bilirrubinas total e direta. O padrão utilizado segue as especificações do "Joint Bilirubin Committee"

Reagentes fornecidos

1. Acelerador - Solução de Cafeína 130 mmol/L, Benzoato de sódio 260 mmol/L e Acetato de sódio 460 mmol/L (1 X 250mL).
2. Ácido sulfanílico - Solução de Ácido sulfanílico 5,75 mmol/L em ácido clorídrico 180 mmol/L (1 x 125 mL).
3. Nitrito de sódio - Solução de nitrito de sódio 72,4 mmol/L (1 x 5,0 mL).
4. Padrão - Bilirrubina dessecada (1 x 0,30 mg).
5. Solvente - Dimetilsulfóxido (1 x 4,0 mL).

Condições de uso e armazenagem

A data de validade aparece no rótulo da embalagem. Não usar reagentes cuja data de validade tenha expirado.

Todos os reagentes devem ser mantidos entre a faixa de 15 a 30°C. Manter ao abrigo da luz.

Insumos e equipamentos necessários não fornecidos

- Água destilada ou deionizada
- Banho-maria
- Cronômetro
- Espectrofotômetro
- Pipetas manuais ou automáticas
- Ponteiras descartáveis
- Vidria

Precações e cuidados especiais

- Somente para uso diagnóstico "in vitro".
- Devido à alta fotossensibilidade da bilirrubina, manter o padrão ao abrigo da luz durante seu preparo e armazenagem.
- Não misturar ou trocar lotes de reagentes diferentes.
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação.
- Caso haja contato com quaisquer reagentes lavar a área afetada com água em profusão. Em caso de ingestão de reagentes procurar auxílio médico imediato munidos desta instrução de uso.
- Utilizar equipamentos de proteção individual segundo normas de biossegurança.
- A água (destilada ou deionizada) utilizada na limpeza do material ou nos procedimentos deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.
- Certificar-se das condições adequadas de funcionamento dos equipamentos de análise.
- O descarte do material utilizado deve ser feito segundo os critérios de biossegurança.
- Lavar as mãos após trabalhar com material potencialmente infecioso.
- A calibração deve ser feita periodicamente para se verificar alterações ou desvios nos analisadores ou espectrofotômetro.

Amostra biológica

- Soro ou Plasma

A bilirrubina em soro ou plasma é estável durante 3 dias quando mantida entre 2 a 8°C e protegida da luz.

Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante. Usar luvas descartáveis durante a manipulação do material biológico. As amostras devem ser descartadas, após o uso, em recipientes específicos para este fim. Não dispensar em coletores de lixo comuns ou nas redes de esgoto.

Procedimento

Ler cuidadosamente, as instruções desta bula.

• Calibração

Preparo do Padrão

Devido à alta fotossensibilidade da bilirrubina, manter o padrão ao abrigo da luz durante seu preparo e armazenagem.

Transferir 3,0 mL do solvente para o frasco de padrão e agitar. Deixar em repouso durante 5

minutos, agitando ocasionalmente.

O padrão assim preparado, protegido da luz, é estável durante 30 dias à -20°C. Congelar e descongelar apenas uma vez. Se conservado em temperatura ambiente, e ao abrigo da luz, o padrão é estável somente por 12 horas. A concentração do padrão, após preparo, é equivalente a 10 mg/dL.

Procedimento

Método Macro:

Dosar o padrão em triplicata.

1. Pipetar, em diferentes tubos de ensaio, como a seguir:

	Branco	Padrão
Acelerador	4,5mL	4,5mL
Ác. Sulfanílico	0,5mL	-
Diazo Reag.	-	0,5mL
Padrão	0,3mL	0,3mL

2. Homogeneizar bem e aguardar 5 minutos à temperatura ambiente. Determinar as absorbâncias dos padrões em 525 nm, acertando o zero com o branco. A cor formada é estável durante 30 minutos.

Método Micro:

Dosar o padrão em triplicata.

1. Pipetar, em diferentes tubos de ensaio, como a seguir:

	Branco	Padrão
Acelerador	1,8 mL	1,8mL
Ac. Sulfanílico	0,15mL	-
Diazo Reag.	-	0,15mL
Padrão	0,05mL	0,05mL

2. Homogeneizar bem e aguardar 5 minutos à temperatura ambiente. Determinar as absorbâncias dos padrões em 525 nm, acertando o zero com o branco. Deverão ser calculados separadamente os fatores de calibração para os métodos Macro e Micro. (VER CÁLCULOS)

• Ensaio

Preparo dos reagentes:

Preparo do Diazo Reagente: Adicionar 50 µL (1 gota) de Reagente nº3 (Nitrito de Sódio) a 1,5 mL do Reagente nº 2 (Ácido Sulfanílico). Homogeneizar e usar no dia da preparação.

Dosagem em soro ou plasma

Método Macro:

1. Pipetar, em diferentes tubos de ensaio, como a seguir:

	Branco	Bilirrubina Direta	Bilirrubina Total
Ácido Sulfanílico	0,5 mL	-	-
DiazoReagente	-	0,5 mL	0,5 mL
Água Destilada	4,5 mL	4,5 mL	-
Acelerador	-	-	4,5 mL
Amostra	300 µL	300 µL	300 µL

2. Homogeneizar e aguardar 5 minutos à temperatura ambiente. Determinar as absorbâncias das bilirrubinas direta e total em 525 nm, acertando o zero com o Branco. A cor formada é estável 30 minutos.

- Obter os valores em mg/dL para as bilirrubinas direta e total utilizando o fator de calibração Macro obtido com o Padrão.

Método Micro:

Utilizar a técnica Micro quando houver suspeita de bilirrubina acima de 10 mg/dL.

1. Pipetar, em diferentes tubos de ensaio, como a seguir:

	Branco	Bilirrubina Direta	Bilirrubina Total
Ácido Sulfanílico	150 µL	-	-
DiazoReagente	-	150 µL	150 µL
Água Destilada	1,8 mL	1,8 mL	-
Acelerador	-	-	1,8mL
Amostra	50 µL	50 µL	50 µL

2. Homogeneizar e aguardar 5 minutos à temperatura ambiente. Determinar as absorbâncias das bilirrubinas direta e total em 525 nm, acertando o zero com o Branco. A cor formada é estável 30 minutos.

- Obter os valores em mg/dL para as bilirrubinas direta e total utilizando o fator de calibração Micro obtido com o Padrão.

Cálculos

Deverão ser calculados separadamente os fatores de calibração para os métodos Macro e Micro.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{(\text{Concentração do Padrão})}{(\text{Abs. do Padrão})}$$

Bilirrubina (mg/dL) = Absorbância da amostra x Fator de calibração.

Bilirrubina (mmol/L) = mg/dL x 0,0171

Bilirrubina indireta = Bilirrubina total – Bilirrubina direta

Linearidade

A reação é linear até 15 mg/dL no método Macro e até 45 mg/dL no método Micro.

Para valores maiores diluir com NaCl 0,85% e repetir a determinação. Multiplicar o valor obtido pelo fator de diluição.

Obs: Diluir a amostra de tal modo que o valor encontrado fique entre 4 e 10 mg/dL para a técnica macro e 10 e 30 mg/dL para a técnica micro

Valores de referência

- Bilirrubina direta: até 0,4 mg/dL*

- Bilirrubina total: até 1,2 mg/dL*

*Estes valores são dados apenas a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência.

Controle de 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.

Dados estatísticos de desempenho do teste

Coeficiente de variação intra-ensaio (repetitividade): 7,5% para valores dentro da faixa de referência e 2,12% para valores elevados (acima de 7 mg/dL).

Coeficiente de variação inter-ensaio (reprodutibilidade): devido à instabilidade da amostra, os dados inter-ensaio não oferecem condições para um tratamento estatístico rigoroso. Entretanto, os resultados obtidos são próximos daquelas da variação intra-ensaio.

Especificidade analítica: O método proposto é bastante específico para a bilirrubina direta.

Sensibilidade analítica: O método Macro é sensível a partir de valores de 0,2 mg/dL de bilirrubina na amostra. Não é recomendável a utilização da técnica Micro para valores normais de bilirrubina.

Interferentes

Ácido ascórbico acima de 7 mg/dL interfere levando a resultados falsamente diminuídos. Hemoglobina de 150 mg/dL até cerca de 800 mg/dL, (hemólise significativa) interfere positivamente, aumentando os valores em até 20%. Hemoglobina acima de 800 mg/dL (hemólise acentuada) interfere negativamente. Hemólise discreta não interfere.

Bibliografia

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

Apresentação

Número de testes Macro: 55

Número de testes Micro: 138

Automação

Os reativos podem ser utilizados em quase todos os analisadores automáticos. Vide programação no verso ou solicite informações ao seu distribuidor.

Dados do fabricante

MBiolog Diagnósticos Ltda

Rua Gama, 337 – Vila Paris – Contagem – MG – CEP 32372-120

Resp. Técnico: Fabricio Galvão de Brito – CRF-MG 9587

SAC - Serviço de Atendimento ao Cliente

3507-0707

sac@mbiolog.com.br

COBAS MIRA/ PLUS®

GENERAL	
MEASUREMENT MODE	ABSORB
REACTION MODE	R-S - SR1
CALIBRATION MODE	FACTOR
REAGENT BLANK	REAG/DIL
CLEANER	BEFORE
WAVELENGTH	550 nm
DECIMAL POSITION	2
UNIT	mg/dL
ANALYSIS	
POST. DIL FACTOR	3
CONC. FACTOR	NO
SAMPLE CYCLE	1
VOLUME	10,4 µL
DILUTION NAME	H2O - 0
VOLUME	6,7 µL
REAGENT CYCLE	1
VOLUME	150 µL
START REAGENT 1 CICLE	3
VOL / DIL /	16,6 / 3,4
CALCULATION	
SAMPLE LIMIT	0,2
REACTION DIRECTION	INCREASE - 1
CHECK	OFF
CONVERSION FACTOR	1
OFFSET / TEST RANGE LOW	0 / 0
HIGH	15 mg/dL
NORMAL RANGE LOW	NO
HIGH	NO
NUMBER OF STEPS	1
CALCULATION STEP A	ENDPOINT -1
READING FIRST	2
LAST	14
CALIBRATION	
CALIBRATION INTERVAL	ON REQUEST - 3
TIME	NO - SPACE
REAGENTE RANGE LOW	NO - SPACE
HIGH	NO - SPACE
BLANK RANGE LOW	NO - SPACE
HIGH	NO - SPACE
FACTOR	60,6
Para calibrar, utilize o modo "Calibrator" ao invés de "Factor". Para "COBAS MIRA PLUS", substituir a opção "CALIBRATOR" por "SLOP AVG".	
• START REAGENT (Bilirrubina Total e Direta): Uma gota de nitrito de sódio (50 µL) para cada 1,5 mL de ácido sulfanílico.	
• MAN REAGENT (BILIRRUBINA TOTAL)-> Acelerador • MAN REAGENT (BILIRRUBINA DIRETA) - 1Parte do sulfanílico para 9 partes de água destilada ou desionizada.	

EXPRESS 550/PLUS®

TEST NAME:	BILIRRUBINA	TEST:	BIL
TEST BAR CODE:	IPU*		
TEST TYPE:	END POINT	CURVE TYPE::	BLAN. LINEAR
UNITS:	mg/dL	Nº OF DECIMAL PLACE:	1
PRIMARY WAVELENGHT:	540	SECONDARY WAVELENGHT:	600
READ TIME / INTERVAL:	20	SAMPLE BLANK:	NO
FACTOR:			
CALIBRATION INTERVAL:	999 h	Nº OF REPLICATES:	1
Nº OF CALIBRATOR:	IPU*		
LOW BLANK A LIMIT:	-0,0100	HIGH BLANK A LIMIT:	0,350
LOW A LIMIT:	-0,100	HIGH A LIMIT:	2,000
LOW NORMAL:	IPU*	HIGH NORMAL:	IPU*
LINEARITY LIMIT:	15	CURVE S.D. LIMIT:	0,2
SAMPLE VOLUME:	15 µL	TEST:	BIL
SAMPLE DILUENTE BOTTLE TYPE:	*	PREDILUTION RATIO:	1
REAGENT DILUENTE BOTTLE TYPE:	*		
REAGENT DILUENT:	VOL. RAG.	BD	DIL
REAGENT 1:	250		20 *
REAGENT 2:	30		300 *
IPU: Inserido Pelo Usuário			
*: Entre com o tipo de frasco utilizado. Plástico ou Vidro			
BILIRRUBINA TOTAL: RI= ACELERADOR			
BILIRRUBINA TOTAL: R2 = Uma gota de nitrito de sódio (50 µL) para cada 1,5 mL de ácido sulfanílico.			
BILIRRUBINA DIRETA: R1= 1Parte do sulfanílico para 9 partes de água destilada ou desionizada.			
BILIRRUBINA DIRETA: R2 = Uma gota de nitrito de sódio (50 µL) para cada 1,5 mL de ácido sulfanílico.			

BIO 2000® & LABQUEST®

MODO	P.F	P1	IPU*
WLI	546	UNDIDAD	mg/dL
WL2		DECIMALS	2
BLANK?	NÃO	LIM LIN MIN	0
BLANK- AMOS – PAD?	SIM/SIM	LIM LIN MAX	15
CUB FLUXO ?	SIM	ABS REAT MIN	0
TEMP?	25 °C	ABS REAT MAX	0,2
VOL ASP	700	ABS PAD MIN	IPU*
RETARDO	3	ABS PAD MAX	IPU*
PADRÃO	*SIM	VR/VN MIN	IPU*
PAD (QUANT)	ÚNICA	VR/VN MAX	IPU*

- Depois de calibrar o equipamento, alterar a opção SIM, para NÃO e insira o valor do fator encontrado para bilirrubina direta e total.

Reagentes de Trabalho: Ver Bula

RA-50®

TEMPERATURA	25 °C
VOLUME DA AMOSTRA	50 µL
VOLUME DO REAGENTE	1000 µL
CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO*	10 mg/dL
TIPO DE REAÇÃO	P.F / BRANCO DA AMOSTRA / BRANCO PADRÃO
UNIDADES	mg/dL
COMPRIMENTO DE ONDA	546 nm
INCLINAÇÃO DA REAÇÃO	CRESCENTE
LINEARIDADE	15 mg/dL
RET. VALOR DO BRANCO	NÃO
PRECISÃO DO RESULTADO	0,1 mg/dL
VOLUME DE ASPIRAÇÃO	700 µL

A opção "PADRÃO" pode ser substituída pela opção "FATOR". Porém, este deve ser calculado previamente.

Reagentes de Trabalho: Ver Bula

BTS-370®

TESTE	BIL	OPÇÕES
UNIDADE	MG/DL	
MODO DE ANÁLISE	MD	VALOR LIMITE DE LINEARIDADE 15
CONSTITUINTE ASSOCIADO	IPU	VALOR LIMITE DE ABS. 0,2 A BRANCO
TIPO DE REAÇÃO	CRESC.	VALOR LIMITE DE BRANCO CINÉTICA -
REPLICATAS DA AMOSTRA	1	LIMITE MÁXIMO DE FATOR -
CALIBRADOR	IPU	LIMITE MÍNIMO DE FATOR -
REP. DE CALIBRADOR E BRANCO	2	LIMITE SUPERIOR REFERÊNCIA -
NÚMERO DE CALIBRADORES	IPU	LIMITE INFERIOR REFERÊNCIA -
CALIBRADOR 1	IPU	NÚMERO DE CONTROLES IPU
DECIMAS	0	TIPO DE CONTROLE IPU
LEITURA	MONO	REPLICATAS DO CONTROLE
COMPRIMENTO DE ONDA PRINCIPAL	546	VOLUME DE LAVAGEM 5 ML
VOLUME DA AMOSTRA	20	
VOLUME DO REATIVO 1	400	
VOLUME DO REATIVO 2	400	
TEMPO DE INCUBAÇÃO 1	300 S	
TEMPO DE INCUBAÇÃO 2	300S	
TEMPO DE ESTABILIZAÇÃO	10	

Bilirrubina Direta: Reag. 1 = 1,0 mL do Ác. Sulfanílico com 9 mL de água. Reag 2 = Misturar 10 µL de nitrito de sódio com 300 µL de ácido sulfanílico e acrescentar 2,7 mL de água destilada.

Bilirrubina Total: Reag. 1 = 1,0 mL do Ác. Sulfanílico com 9 mL de acelerador. Reag 2 = Misturar 10 µL de nitrito de sódio com 300 µL de ácido sulfanílico e acrescentar 2,7 mL de acelerador.

Todos os equipamentos são marcas registradas de seus fabricantes