

EBRAM PRODUTOS LABORATORIAIS LTDA.

Rua Julio de Castilhos, 500 - Belenzinho
São Paulo - SP - Tel.: +55 11 2291 2811
CEP 03059-001 | Indústria Brasileira
CNPJ.: 50.657.402/0001-31

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Nadjara Novaes Longen | CRF-SP - 37.451

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**
11 2291 2811 ou sac@ebram.com
www.ebram.com

**QUIMIBIL - D - Bilirrubina Direta****Método Diazo**

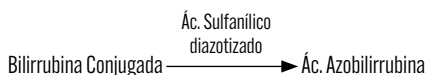
REG. MS: 10159820249

Revisão: Agosto/2020

FINALIDADE. Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina direta em amostras de soro ou plasma humanos. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

PRINCÍPIO. A maioria dos métodos utilizados atualmente para testar a bilirrubina está baseada na reação entre a bilirrubina e as soluções ácidas de sulfanílico diazotizadas. Em soluções aquosas, somente a bilirrubina direta (conjugada) irá reagir desta maneira.

A Bilirrubina Direta EBRAM utilizada o método de ácido diazo, onde a bilirrubina conjugada reage com o ácido sulfanílico diazotizado para produzir um ácido azobilirrubina cuja absorvância é proporcional à concentração da bilirrubina direta na amostra e pode ser medido a 550 nm. Para analisadores bicromáticos a leitura secundária deve ser medida a 660 nm. Temos então a seguinte reação:

**METODOLOGIA.** Diazo

SIGNIFICADO CLÍNICO. A bilirrubina é um pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina, após a destruição (normal ou patológica) das hemácias. Ao passar pelo interior dos hepatócitos, a bilirrubina conjuga-se ao ácido glicurônico, transformando-se em mono e diglicuronídeo de bilirrubina, o que ocorre sob a ação de uma enzima específica, a glicuroniltransferase. Somente a forma conjugada de bilirrubina (fração direta, solúvel em água) é eliminada pelo fígado e rim; a forma indireta não é nem por um nem por outro. Tal noção esclarece várias ocorrências fisiopatológicas de considerável importância clínica, como na insuficiência de glicuroniltransferase ocorre hiperbilirrubinemia porque a bilirrubina indireta não se transforma em direta e nas icterícias causadas por lesão hepatocelular ou hepatocanalicular, bem como na obstrução biliar externa, está presente a eliminação urinária de bilirrubina (urina escura), já que o pigmento retido é de tipo direto.

No recém-nascido é muito comum o aparecimento de uma icterícia considerada como fisiológica, causada principalmente pela imaturidade do sistema enzimático intra-hepático. Tal icterícia, de intensidade muito variável (em geral 5-10 mg/dL), ocorre por conta unicamente da fração indireta, desaparecendo no final da primeira semana de vida.

REAGENTES. Reagente A: Pronto para uso. Conservar entre 2-25°C. Contém: Ácido clorídrico 103 mM e ácido sulfanílico 9,8 mM.

Reagente B: Conservar entre 2-25°C. Contém: Nitrito de sódio 145 mmol/L.

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto.

Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

PREPARO DO REAGENTE PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO:

Utilizar o reagente na forma birreagente, para o Reagente 1 deve-se utilizar o reagente A puro e para Reagente 2 deve-se adicionar

12 gotas do reagente B em 10 mL do reagente A (estável por 7 dias se armazenado de 2-8°C.)

NOTA: O reagente normalmente desenvolve uma leve cor rosada após o preparo.

Padrão (cód 3002): Material liofilizado contendo concentração padrão de bilirrubina direta rastreável ao Material de Referência Padrão 916a. Verifique a concentração no rótulo do frasco. Conservar entre 2-8°C até a data de vencimento impressa no rótulo.

MODO DE PREPARO DO PADRÃO.

1. Golpear o frasco levemente com os dedos para desprender o material liofilizado.
2. Utilizando uma pipeta volumétrica calibrada, adicionar exatamente 1,0 mL de água destilada no frasco.
3. Recolocar a tampa, misturar cuidadosamente e deixar em repouso de 5 à 10 minutos antes de utilizar.

Após reconstituição, o padrão deve ser armazenado em ambiente escuro e é estável por 8 horas de 15 à

25°C, 2 dias de 2 à 8°C e 28 dias à -20°C.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS REQUERIDOS.

Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Não usar o reagente se estiver visualmente turvo, se a absorvância do branco ultrapassar 0.10 (convertido para 1,0 cm de espaço ótico) quando medido a 550 nm, ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO.

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorvância de 550 nm
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soros Controle e Calibradores.
6. Medidor de tempo.

AMOSTRA. Soro ou plasma (colhido com heparina e EDTA): as amostras devem ser protegidas da luz, pois a bilirrubina é fotossensível e, desta maneira, podem ser armazenadas por 3 dias entre 2-8°C.

Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

PREPARO DO PACIENTE. É recomendado jejum mínimo de 4 horas para adultos; em crianças, colher antes da alimentação. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

INTERFERÊNCIAS.

Não devem ser usadas amostras hemolisadas (hemoglobina > 300 mg/dL) ou lipêmicas (triglicérides > 723 mg/dL). Se o teste não for feito imediatamente após a coleta, recomendamos envolver o tubo com papel alumínio para que não haja incidência luminosa. Para interferência de drogas e outras substâncias que podem interferir na dosagem de bilirrubina direta, sugerimos consultar Young et al.

PARÂMETROS DO SISTEMA:

Temperatura	37°C
Comprimento de Onda	550 nm
Tipo de Reação	Ponto final
Direção	Crescente
Relação Amostra/Reativo	1:10
Vol. Amostra	100 µL
Vol. Reagente	1,0 mL
Tempo de Incubação	10 minutos

CALIBRAÇÃO. Utilizar Quimicalib Ebram Cód.7023/12023 ou o padrão que acompanha o kit, para kits com padrão. A concentração de bilirrubina direta no Quimicalib é rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI e no padrão ao Material de Referência Padrão 916a.

PROCEDIMENTO AUTOMATIZADO. Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente. Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual até o item 3 (incubação), em seguida utilizar

o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

PROCEDIMENTO MANUAL.

1. Preparar o **Reagente 1**: Utilizar o RA puro. **Reagente 2**: 3 gotas do RB em 10 mL do RA.
2. Separar 4 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

Tubos	1. Branco	2. Calibrador	3. Branco	4. Amostra/S.C.
Calibrador	100µ	100µL	-	-
Amostra S/C	-	-	100µL	100µL
Reagente 1	1,0mL	-	1,0mL	-
Reagente 2	-	1,0mL	-	1,0mL

3. Homogeneizar os tubos e deixar em Banho-Maria (BM) 37°C por 10 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagente nos tubos de ensaio.
4. Zerar o aparelho com o branco do reagente a 550nm e proceder as leituras registrando as absorvâncias do calibrador, amostra e soro controle (S.C.).

Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10 µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS.

(Abs. = Absorbância)

(Conc. = Concentração)

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) =

$$\frac{\Delta \text{Abs. Amost} - \text{Abs. Branco Amost}}{\Delta \text{Abs. Calib} - \text{Abs. Branco Calib}} \times \text{concentração Calib}$$

EXEMPLO:

Abs. do branco da amostra = 0.005

Abs. amostra = 0.320

Abs. do branco calibrador = 0.009

Abs. calibrador = 0.241

Concentração do calibrador = 1,82 mg/dL

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) =

$$\frac{0.320 - 0.005}{0.241 - 0.009} \times 1,82$$

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) =

$$\frac{0.315}{0.232} \times 1,82$$

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) = 2,47 mg/dL

Obs.: mmol/L = mg/dL x 17.10

LINEARIDADE. Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 20 mg/dL. Amostras com valores superiores a 20 mg/dL ou muito ictericas, devem ser diluídas com solução salina a ponto de seus resultados ficarem entre 0-20 mg/dL com posterior multiplicação pelo fator de diluição.

CONTROLE DE QUALIDADE. Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024/12024 e 7031/12031.

VALORES ESPERADOS.

Adultos e crianças acima de um mês de idade: 0.0-0.2 mg/dL.

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

ESTUDOS COMPARATIVOS. Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziram os seguintes resultados:

Número de amostras	50
Intervalo dos resultados	0,1 19,0 (mg/dL)
Coefficiente de correlação	0,9994
Inclinação	1,026
Intercepta	0,01 (mg/dL)

PRECISÃO. Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 40 vezes

N=40	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	0,20	2,98
D.P. (mg/dL)	0,00	0,00
C.V. (%)	0,00	0,00

EXATIDÃO. As amostras foram processadas em duplicata por 10 dias consecutivos, duas vezes por dia. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=40	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	0,20	2,98
D.P. (mg/dL)	0,00	0,15
C.V. (%)	0,00	5,2

SENSIBILIDADE METODOLÓGICA. 0.0 mg/dL

ESPECIFICIDADE. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

OBSERVAÇÕES.

1. A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II).
3. Para o enxágue da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final utilizar água tipo II.

APRESENTAÇÃO.

Linha Bioquímica Geral: RA:10x10mL + RB:1x5,0mL + P:1x1,0mL










Linha Quimimat 450: R1: 3x20mL + R2: 1x20mL + RB:1x5,0mL

Linha Bulk: 1 x 200mL + 1 x 5mL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

1. Zilva JF, Pannall PR "Liver Disease and Gali Stones" in Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment". Lloyd-Luke 1979; Chap XIII; 286-8.
2. Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition. Burtis CS and Ashwood ER (Eds).WB Saunders Company (1994)
3. Malloy, H., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481-90 (1937)
4. Jendrassik, L. Grof, P., Biochem, Zeit schr.. 297:81-9 (1938)
5. Pearlman FC, Lee RT, Clin Chem 1974; 20:447-53
6. Young, D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Testes, Third Edition, AACC Press 1990.
7. Arquivos da Ebram.

SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

 CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO	 REAGENTE	 FABRICADO POR
 O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES	 DATA DE VALIDADE (ÚLTIMO DIA DO MÊS)	 NÚMERO DO LOTE
 LIMITE DE TEMPERATURA (CONSERVAR A)	 PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO	 NÚMERO DO CATÁLOGO