



QUIMIBIL - D - Bilirrubina Direta Método Diazo

Finalidade:

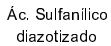
Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina direta em amostras de soro ou plasma humanos. Somente para uso diagnóstico "in vitro".

Princípio:

A maioria dos métodos atualmente usados para testar a bilirrubina está baseada na reação entre a bilirrubina e as soluções ácidas de sulfanilico diazotizadas.

Em soluções aquosas, somente a bilirrubina direta (conjugada) irá reagir desta maneira.

A Bilirrubina Direta EBRAM usa um método de ácido diazo. A Bilirrubina conjugada reage com o ácido sulfanilico diazotizado para produzir um ácido azobilirrubina cuja absorbância 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:



Bilirrubina Conjugada -----> Ác. Azobilirrubina

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 diglicuronido 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: HCL 103 mmol/L e Ácido Sulfanilico 9,8 mmol/L.

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.

Padrão (cód 3002): solução aquosa contendo concentração de bilirrubina direta rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI. Verifique a concentração no rótulo do frasco. Conservar entre 2 - 8°C até a data de vencimento impressa no rótulo. A solução deverá ser utilizada logo após a abertura da ampola, ela não possui estabilidade após aberta.

PREPARO DO REAGENTE PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO: Utilizar o reagente na forma Bireagente, 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.

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 absorbância 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 absorbância 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 foto sensível e desta maneira podem ser armazenadas por 3 dias entre 2 - 8°C.

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 (triglicerídeos > 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 uL
Volume Reagente: 1.0 mL
Tempo de Incubação: 10 minutos

Calibração:

Utilizar Quimicalib Ebram Cód.7023/12023 ou o padrão que acompanha o kit do cód 3002. A concentração de bilirrubina direta nos calibradores são rastreáveis ao método de referência proposto pelo CLSI.

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: 03 gotas do RB em 10 mL do RA.
2. Separar 4 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Calibrador	Branco	Amostra/S.C.
Calibrador	100 uL	100 uL	-	-
Amostra/S.C.	-	-	100 uL	100 uL
Reagente 1	1.0 mL	-	1.0mL	-
Reagente 2	-	1.0 mL	-	1.0 mL

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 absorbâncias 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 (Abs. Amost - Abs. Branco Amost) Conc. do
Amostra (mg/dL) = ----- x Calibrador
(Abs. Calib. - Abs. Branco 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 0.320 - 0.005
Direta Amostra = ----- x 1,82
0.241 - 0.009

Bilirrubina 0.315
Direta Amostra = ----- x 1,82
0.232
Bilirrubina Direta Amostra = 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.

Quando executado 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	0.02 - 0,8 (mg/dL)
Coefficiente de Correlação:	0.995
Inclinação:	1.1
Intercepta:	0.001 (mg/dL)

Precisão:

Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra foram processada por 10 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	0.18	0.65
D.P. (mg/dL)	0.04	0.05
C.V. (%)	2,2	7,7

Exatidão:

As amostras foram processadas por 10 dias consecutivos, uma vez por dia em duplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	0.14	0.61
D.P. (mg/dL)	0.05	0.05
C.V. (%)	3,6	8,2

Sensibilidade Metodológica:

0.0334 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). Para o enxágüe da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágüe final utilizar água tipo II.

Apresentação:

Linha Bioquímica Geral: RA: 10x10mL + RB: 1x5,0mL + P: 1x1,0mL
Linha Hitachi 917/ADV: 10 x 20mL + 1 x 5mL
Linha Quimimat 450: R1: 3x20mL + R2: 1x20mL + RB: 1x5,0mL
Linha Bulk: 1 x 200mL + 1 x 5mL
Para mais informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM - tel. (011) 2291-2811, sac@ebram.com ou www.ebram.com

Referência Bibliográfica:

1. Zilva JF, Pannal PR "Liver Disease and Gali Stones" in Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment". Lloyd-Luke 1979; Chap XII; 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. Pearman 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. Watchel M et al. Creation and Verification of Reference Intervals, Laboratory Medicine, 1996; 26:593-7.
8. Arquivos da Ebram.



APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

GENERAL	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S-SR1
Calibration Mode:	Calibrator (SPOVE AVG)
Reagent Blank:	Reagent/Dil
Cleaner:	No
Wavelength:	550 nm
Decimal Position:	2
Unit:	mg/dl
ANALYSIS	
Dilution Name:	STD
Factor:	Main STD
Time:	Sample Dil Name: H2O
Post Dil Factor No:	Conc. Factor No
Sample:	Circle: 1
Volume:	Dil: 20ul
Reagent:	Circle: 1
Volume:	150ul
Start Reagent 1:	Circle: 3
Volume:	Dil: 20ul
Start Reagent 2:	Circle:
Volume:	Dil:
CALCULATION	
Sample Limit:	No
Point:	
Reaction Direction:	Increase
Check:	On
Conversion Factor:	1.00000
Offset:	0.00000
Test Range Low:	0
High:	20.0
Norm Range Low:	0.0
High:	0.4
Number of Slats:	1
Calculation Step A:	Endpoint
Readings First:	2
Last:	8
Reaction Limit:	
Point:	
Calib. Interval:	On Request
CALIBRATION	
Reagent Blank:	
Reagent Range:	
Reagent Range Low:	Blank Range Low: -0.0300
High: 0.2000	High: 0.0300
Factor:	
Calibrator Pos:	(*)
STD1:	STD2:
STD3:	STD4:
STD5:	STD6:
STD7:	STD8:
Calc. Model:	
Correction STD:	
Replicate:	
Deviation:	
CONTROL	
CS1 - Pos (*) Assay (** Low (*) High (**)	
CS2 - Pos (*) Assay (** Low (*) High (**)	
CS3 - Pos (*) Assay (** Low (*) High (**)	

(*) Colocar a posição correspondente do Rack CAL/CS

(**) Colocar o valor correspondente do seu controle.

(***)

Reagente A-pronto para uso / Start Reagent = 10 ml RA + 12 gotas RB

APLICAÇÃO PARA EXPRESS 550

Test Name: Direct Bilirubin	Test: D.Bil			
Test Bar Code:				
Test Type: Endpoint	Curve Type: Blanked Linear			
Units: mg/dl	Nº of Decimal Places: 1			
Primary Wavelength: 540	Secondary Wavelength: 600			
Read Time Interval: 20	Sample Blank: Yes			
Factor:				
Calibration Interval: 999				
Normalization Interval: 999				
Nº of Calibrations: 2	Nº of Replicates: 2			
Low Blank A Limit: -0.10	High Blank A Limit: 0.150			
Low A Limit: -0.100	High A Limit: 1.500			
Low Normal: 0.0	High Normal: 0.4			
Linearity Limit: 20	Curve S.D. Limit: 1.0			
Test Name: Direct Bilirubin	Test: D.Bil			
Test Bar Code:				
Sample Volume: 30ul	Sample Diluent:			
Reagent Dilution Ratio: 2	Predilution Ratio: 1			
Reagent Dilution:				
Reagent 1	Reagent Volume	Bar Code	Diluent Volume	Lag Time
Reagent 2	250ul	BD1a		30 sec
Reagent 3	50ul	BD2a		300 sec
Reagent 4				
Controls:				
R1 = Reagente A - pronto para uso				
R2 = Reagente de trabalho (10ml RA + 12 gotas RB)				

Ebram Prods.Laboratoriais Ltda.

Rua Júlio de Castilhos, nº 500 - Belenzinho

São Paulo - SP - Cep: 03059-001

Tel.: (11) 2291-2811

Indústria Brasileira

CNPJ.: 50.657.402/0001-31

www.ebram.com

sac@ebram.com

SAC.: (11) 2291-2811

Resp.Téc.: Nadjara Novaes Longen

CRF-SP - 37.451

Nº do Reg. MS: 10159820154

Edição: Junho/2018

APLICAÇÃO PARA SELECTRA

Name:	Bilirubina Direta
Abbr Name:	BIL-D
Mode:	Endpoint
Wavelength:	548 nm
Units:	mg/dl
Decimals:	2
Low Conc:	0
High Conc:	20
Calibrator Name:	*
Repeat:	2
Number:	1
Concentration:	**
Interval:	*
Cut off:	NO
Prozone Check:	NO
Ref Male Low:	0.0
Ref Male High:	0.4
Ref Female Low:	*
Ref Female High:	*
Ref Pad Low:	*
Ref Pad High:	*
Control 1:	*
Control 2:	*
Control 3:	*
Comstat Factor:	1.000
Comstat Offset:	0.000

DUAL MODE	
Name:	BIL-D
Sample Blank:	Yes
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250ul
Reagent Volume:	285ul
SAMPLE	
Normal Volume:	25 ul
Reagent Volume:	10 ul
R2 Bottle:	5 ml
Normal Volume:	75 ul
Reagent Volume:	80 ul
Predilution:	NO
Slope Blank:	
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Point One Two:	
Incubation Time:	4.5 min
Low Absorbance:	-0.100
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	-0.100
R ABS H Limit:	0.600
Substr Depletion:	
Reagent Blank:	
R ABS Deviation:	YES
Cal Low Limit:	*
Cal High Limit:	*
Factor:	#

MONO MODE	
Name:	BIL - D
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	250 ul
Reagent Volume:	285ul
SAMPLE	
Normal Volume:	25ul
Reagent Volume:	10ul
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Predilution:	NO
Incubation Time:	
Point One Two:	4,5 min (**)
Low Absorbance:	-0.100
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	-0.100
R ABS H Limit:	0.600
Substr Depletion:	
R ABS Deviation:	
Reagent Blank:	YES
Cal Low Limit:	*
Cal High Limit:	*
Factor:	#

(*) Dados colocados pelo usuário.

(**) Colocar o valor correspondente do calibrador.

(***) Para Selectra I o tempo de incubação será de 11.5 min.

(#) Dados calculados pelo analisador.

Test Reagent = Reagente de Trabalho (10ml RA + 12 gotas RB)

Blank Reagent = Reagent A - pronto para uso

APLICAÇÃO PARA BTR 810

Name:	Bilirub Dir
Point Final:	mg/dl
Units:	Macroamílica
Mode Label:	550
Filter:	3
Tempo Estab:	
Tempo de Incubação:	
Tempo de Intervalo:	
Nº de Intervalos:	
Temperatura:	37°C
Volume Amostrado:	400
Time Resposta:	Crescente
Estandart:	**

APLICAÇÃO PARA QUICK LAB

Mode:	Point Final
Label:	Macroamílica
Filter:	550
Temperature:	37°C
Volume Ass:	400
Units:	mg/dl
Linearity:	20
Inclinação:	
Cálculo:	Padrão
Padrão:	**
Factor:	
Delay Initial:	
Quant Intery:	
Tempo Intery:	
Tempo Estab:	4.500

APLICAÇÃO PARA BIO 2000

Mode:	P.F.
WL1:	548
Blank:	Sim
Bk Amoa Pad:	Não / Não
Temp:	37°C
Vol Amostr:	0400
Rei:	003
Pat:	
Padrão:	Sim
Pat1:	Única
Pat2:	**
Unit:	mg/dl
Dec:	1
Int Clin:	
Int Inl:	
AMIN:	
%Lim Lin:	
Dir:	
Lim Lin - Min/Max:	0.000 / 0.020
Abs Real - Min/Max:	0.000 / 1.000
Abs Pad - Min/Max:	0.000 / 1.000
Vol/Vn - Min/Max:	0.0 / 0.4

APLICAÇÃO PARA RA-XT

Name:	BIL-D
Immunoassay:	NO
Chemistry Type:	ENDPOINT
BioType:	
Immuno Chemistry:	
% Sample Volume:	60 (30ul)
Wavelength:	540
Biochemical Chemistry:	
Biochemical Factor:	
K1:	
K2:	
Bio Limit 1:	
Bio Limit 2:	
Detection Limit:	
Delay Time:	5.00
Blank Type:	NO
Incubation:	
% Reagent Volume:	66 (330ul)
2nd Reagent:	Yes
2nd Reagent Volume:	22 (110ul)
A2 Delay:	0.30
Units:	mg/dl
Unit Factor:	1.000
Decimal Point:	2
RBL Low:	0.000
RBL High:	0.200
Range Low:	0.0
Range High:	20.0
Calibration Factor:	(*)
Reagent Rate:	
Standard Value:	(**)
Normal Low:	0.0
Normal High:	0.4
Slope:	1.000
Intercept:	0.0000
C1 10E-6:	
C2 10E-6:	
D1 10E-6:	
Delta R:	
Linear Factor:	
Final Limit:	
Endpoint Limit:	0.1000

(*) Colocar 1 como valor inicial. O valor do CAL FACT é determinado pelo ensaio de calibração.

(**) Colocar o valor correspondente do calibrador.

APLICAÇÃO PARA AIRONE

Measure Unit:	mg/dl	Decimals: 1	Reaction Type:	EndPoint
Volume (ul):	250	Reagent 1: 300	Reagent 2: 100	Units:
Abs Range (m Abs):	Min: -1.00	Max: 2.000	Reagent Blank:	YES
Linearity Limit:	20.00	Differential:	YES	
Continuing:	YES	Filter 1:	548	Filter 2: No
Time (sec):	Mix 1: 2.00	Incubation 1: 10	Lag Phase: 2	
	Mix 2: 2.00	Incubation 2: 360	Measure: 360	
Measurement Type:	Standard	Factor:	0.00	
Normal Range				
	Homens		Mulheres	
Age (yrs)	Min.	Max.	Min.	Max.
Below 10:				
From 10 to 60:	0.00	0.40	0.00	0.40
Over:				

Disponos de programações para outros analisadores, entre em contato com SAC EBRAM.