

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIBIL – D – BILIRRUBINA DIRETA	Página 1 de 3 POP BIOxxx/xx
--------------------------------------	--	--

USO

Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina direta em amostras de soro. 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 sulfanílico 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 sulfanílico 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 do branco deve ser medida a 660 nm. Temos então a seguinte reação:

Ác. Sulfanílico
diazotizado

Bilirrubina Conjugada -----> Ác. Azobilirrubina

AMOSTRA

- Soro. 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. Para períodos mais longos, recomendamos o congelamento das amostras.
- **Tipos de Amostra:** Soro colhido recentemente e não hemolisado,
- **Armazenamento e estabilidade pré analítico** . 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. Para períodos mais longos, recomendamos o congelamento das amostras.
- **Preparo do paciente:** É recomendado jejum mínimo de 4 horas para adultos; em crianças, colher antes da alimentação. Todavia, poderá ser modificado seguindo orientação médica.

PRODUTO UTILIZADO

Quimibil – Bilirrubina Direta MS: 10159820154

Fabricante: Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.

Rua Julio de Castilhos, 500.

Belenzinho – São Paulo –SP – Brasil - CEP: 03059-001

Para maiores informações sobre sistemas automáticos, entrar em contato com o SAC EBRAM:

Tel. (011) 2291-2811 ou sac@ebram.com

EQUIPAMENTOS

- **Procedimento Manual**
Espectrofotômetro ou fotômetro com cubeta termostaticada 37°C para leituras a 550 nm.
Cubetas ou fluxo contínuo com 1.0 cm de espaço óptico
Banho-Maria 37°C
Pipetas calibradas ou dispensador automático para reagentes e amostras
- **Procedimento Automatizado**
Indicar o nome, modelo e o local onde se encontra o equipamento analisador automatizado, fazendo referência ao manual (ou POP) para utilização do mesmo
- **Procedimento alternativo**
Indicar o equipamento alternativo e os respectivos procedimentos para medição dos ensaios. Enumerar as diferenças esperadas quando procedimentos manuais substituem automatizados.

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. 12024/7024 e 12031/7031.

PROCEDIMENTO

• Procedimento Manual

1. Separar 3 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Calibrador	Amostra
Água destilada	100 µL	-	-
Calibrador	-	100 µL	-
Amostra	-	-	100 µL
Reagente de trabalho	1.0 mL	1.0 mL	1.0mL

2. Homogeneizar imediatamente por inversão, incubar a 37°C, o nível da água do banho deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio. Após 10 minutos ler em espectrofotometria a 550nm, zerando o aparelho com o branco.

3. Ler as absorbâncias a 550 nm. Anotar as leituras.

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 uL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Atenção: Para preparo do reagente de trabalho misturar 12 gotas do nitrito (reagente B) a 10 mL do reagente A. .

• Procedimento Automatizado

Vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente para aplicação no sistema automatizado.

• Precauções e cuidados especiais

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 quando medido a 550 nm, ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

CÁLCULOS

(Abs.=Absorbância)

$$\frac{\text{Abs Amostra} - \text{Abs Branco}}{\text{Abs Calibrador} - \text{Abs Branco}} \times \text{Concentração do Calibrador} = \text{Concentração Bilirrubina Direta (mg/dL)}$$

RESULTADOS

- Unidade de medida: mg/dl
- Unidade de Conversão, umol/L = g/dl x 17,1
- Valores de Referência

Adultos e crianças acima de um mês de idade: 0.0 - 0.4 mg/dL.

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

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

• Linearidade / Sensibilidade

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.

Sensibilidade : 0.137 mg/dl

Inserir o nome do Laboratório	Procedimento Operacional Padrão QUIMIBIL – D – BILIRRUBINA DIRETA	Página 1 de 3 POPPIOxxx/xx
--------------------------------------	--	---------------------------------------

- **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.
-

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. Assim, pois, a bilirrubina encontra-se no soro sob duas formas distintas: a) glicuronídeos de bilirrubina e b) bilirrubina livre, não esterificada. Os glicuronídeos são solúveis em água ao passo que a bilirrubina livre é insolúvel e está fortemente ligada às proteínas plasmáticas, especialmente à albumina.

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: a) na insuficiência de glicuroniltransferase ocorre hiperbilirrubinemia porque a bilirrubina indireta não se transforma em direta; b) nesse tipo de icterícia, bem como na hiperbilirrubinemia causada por hiper-hemólise, não há eliminação urinária de bilirrubinemia (urina clara) porque nesses casos o pigmento retido no sangue é de tipo indireto; c) 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.

REFERÊNCIAS

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. Watchel M et al. Creation and Verification of Reference Intervals, Laboratory Medicine, 1996; 26:593-7.
8. Arquivos da Ebram.

	Nome	Assinatura	Data
Elaborado por			
Aprovado por			
Revisado por			
Desativado por			
Razão			

VER: Abr/14