

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

USO

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 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 absorvância 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

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 conjugada 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) glicuronídios de bilirrubina e b) bilirrubina livre, não esterificada. Os glicuronídios 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.

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

REAGENTES

Reagente A: Pronto para uso. Conservar entre 2 -25oC. Contem: HCL 103 mmol/L e Acido Sulfanílico 9,8 mmol/L.

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

Os reagentes não abertos são estáveis ate a data de vencimento impressa no rotulo do produto.

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

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 10mL 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): Bilirrubina liofilizada em matriz proteica. O valor de concentração e 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 1,0mL de água destilada no frasco.
3. Recolocar a tampa, misturar cuidadosamente e deixar em repouso de 5 a 10 minutos antes de utilizar.

Após reconstituição, o padrão deve ser armazenado em ambiente escuro e é estável por 8 horas de 16 a 25°C, 2 dias de 2 a 8°C e 28 dias a -20°.

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

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.

MATERIAL NECESSÁRIO NÃO FORNECIDO

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir absorbância de 550nm.
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.

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 Automatizado

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente. Aplicação no sistema semiautomático: 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 | 100µL | 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 1,0mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste.

Salientamos que volumes de amostras menores do que 10µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS

(Abs.=Absorbância)

(Conc. = Concentração)

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

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.

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: 0,0 mg/dl

- **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

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

e outras substâncias que podem interferir na dosagem de bilirrubina direta, sugerimos consultar Young et al.

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 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II). Para o enxague da vidraria a água pode ser do tipo III, com resistividade $\geq 0,1$ mega ohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxague final utilizar água tipo II.

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: Ago/20