



QUIMIBIL - T - Bilirrubina Total Método Diazo

Finalidade:

Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina total em amostras de soro ou plasma humanos. Uso somente para diagnóstico "in vitro".

Princípio:

O método mais comum para a determinação clínica da bilirrubina é a junção do soro com o ácido sulfanílico diazotizado (ácido p-diazobenzenesulfônico) para produzir uma cor. A reação foi inicialmente descrita por Ehrlich em 1884 e foi usada por Van den Bergh e Snaper posteriormente para demonstrar a presença da bilirrubina no soro normal. A forma direta reage com diazo sem a presença de álcool (acelerador). A bilirrubina que foi conjugada com ácido glucorônico pelo fígado é então solúvel em água. A forma não conjugada está firmemente ligada à albumina, este complexo bilirrubina-albumina não é solúvel em água e portanto exige um acelerador, ou um agente solvente, para separar a bilirrubina da albumina e reagir com o ácido sulfanílico diazotizado. O método da bilirrubina total é baseado em uma modificação do método de Pearimem e Lee, no qual o surfactante é usado como um solubilizante. O nitrato de sódio é adicionado ao ácido sulfanílico para formar o ácido sulfanílico diazotizado. A bilirrubina na amostra reage com o ácido sulfanílico diazotizado para produzir a azobilirrubina que é lida a 550 nm. A absorbância medida é diretamente proporcional à concentração da bilirrubina total na amostra.

Ác. Sulfanílico diazotizado

Bilirrubina Total ----- x 2,0
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 glucorônico, transformando-se em mono e diglucuronídeo de bilirrubina, o que ocorre sob a ação de uma enzima específica, a glucuroniltransferase. Somente a forma conjugada de bilirrubina (fração direta, solúvel em água) é eliminada pelo fígado e rim; a forma indireta não o é nem por um nem por outro. Tal noção esclarece várias ocorrências fisiopatológicas de considerável importância clínica. 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 sulfanílico 4.9 mmol/L, HCL 104 mmol/L.
Reagente B: Conservar entre 2 - 25°C. Contém nitrato 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 Bireagente, para o Reagente 1 deve-se utilizar o reagente A puro e para Reagente 2 deve-se adicionar 6 gotas do reagente B em 10 mL do reagente A (estável por 10 dias se armazenado de 2 - 8°C.)

NOTA: O reagente normalmente desenvolve uma leve cor amarelo/alaranjada após o preparo.

Padrão (cód 3003): Bilirrubina liofilizada em matriz proteica. O valor de concentração é 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 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°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. Evitar exposição direta ao sol. Não usar o reagente se estiver visualmente turvo, se a absorbância do branco ultrapassar 0.100 (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 a absorbância de 550 nm
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Seros Controle e Calibradores.
6. Medidor de tempo.

Amostra:

Soro e plasma (colhido com heparina ou EDTA). As amostras devem ser protegidas da luz, pois a bilirrubina é foto sensível e desta maneira podem ser armazenadas por 12 horas entre 2 - 8°C. Para períodos mais longos, recomendamos o congelamento das amostras. A bilirrubina no soro é estável por 3 meses se armazenada congelada (-20°C) e protegida da luz.

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 > 100 mg/dL) ou lipêmicas (triglicerídeos > 82,5 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. A incidência de luz direta na amostra pode causar diminuição de até 50% de bilirrubina dentro de 1 hora. Para interferência de drogas e outras substâncias que podem interferir na dosagem de bilirrubina total, veja Young, DS.

Parâmetros do Sistema:

Temperatura: 37°C
Comprimento de Onda: 550 nm
Tipo de Reação: Ponto final
Direção: Crescente
Relação Amostra/reativo: 1:20
Vol. Amostra: 50 uL
Volume Reagente: 1.0 mL
Tempo de Incubação: 5 minutos

Calibração:

Utilizar Quimicalib Ebram Cód.7023/12023 ou o padrão que acompanha o kit do cód 3003. A concentração de bilirrubina total 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.
2. Separar 4 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

	Branco	Calibrador	Branco	Amostra/S.C.
Calibrador	50 ul	50 ul	-	-
Amostra/S.C.	-	-	50 ul	50 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 5 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.
4. Zerar o aparelho com o branco do reagente a 550nm e proceder as leituras registrando as absorbâncias dos brancos e do calibrador, amostra/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 10µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

3. Homogeneizar os tubos e deixar em Banho-Maria (BM) 37°C por 5 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagentes nos tubos de ensaio.

Cálculos:

(Abs.=Absorbância) (Conc. = Concentração)
Bilirrubina Total (Abs. Amost - Abs. Branco Amost) Conc.do Amostra (mg/dL) = ----- x Calibrador
(Abs. Calib. - Abs. Branco Calib.)

Exemplo:

Abs. do branco da amostra = 0.003
Abs. amostra = 0.253
Abs. do branco calibrador = 0.008
Abs. calibrador = 0.558
Concentração do calibrador = 2.0 mg/dL
Bilirrubina 0.253 - 0.003
Total Amostra = ----- x 2,0
0.558 - 0.008

Bilirrubina 0.250

Total Amostra = ----- x 2,0
0.550

Bilirrubina Total Amostra = 0,9 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: 0,2 - 1,0 mg/dL
RN Prematuros: Até 24 horas: 1 - 8 mg/dL
Até 48 horas: 6 - 12 mg/dL
3 - 5 dias: 10 - 14 mg/dL
RN a termo: Até 24 horas: 2 - 6 mg/dL
Até 48 horas: 6 - 12 mg/dL
3 - 5 dias: 4 - 8 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:	30
Intervalo dos resultados	0,31 - 2,35 (mg/dL)
Coefficiente de Correlação:	0,990
Inclinação:	0,973
Intercepta:	0,075 (mg/dL)

Precisão:

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

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	2,09	8,12
D.P. (mg/dL)	0,12	0,21
C.V. (%)	5,7	2,3

Exatidão:

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

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	2,14	7,26
D.P. (mg/dL)	0,12	0,26
C.V. (%)	5,6	3,6

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 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos < 0,1 mg/L (água tipo II). 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 Quimistat 450: R1: 3x20mL + R2: 2x20mL + 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. Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition. Burlis CS and Ashwood ER (Eds). WB Saunders Company (1994)
2. Herlich, P., Zeitschr. Sur Anat. Chemie 23:276 (1984)
3. Van den Bergh, A.A.H. Snapper J. Dtsch Arch Klin Med. 110:540 (1913)
4. Malloy, H., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481 (1937)
5. Jendrassik, L. Grof, P., Biochem. Zeitschr., 297:81 (1937)
6. Arquivos da Ebram.



APLICAÇÃO PARA COBAS MIRA

GENERAL	
Measurement Mode:	ABSORB
Reaction Mode:	R-S-SR1
Calibration Mode:	SLOPE AVG
Reagent Blank:	Reagent/Dil
Cleaner:	BEFORE
Wavelength:	550 nm
Decimal Position:	2
Unit:	mg/dl
ANALYSIS	
Dilution Name:	STD
Factor:	Main STD
Time:	Sample Dil Name: H2O
Post Dil Factor: 2.00	Conc. Factor: NO
Sample:	Cycle: 1
Volume:	Dil: 20ul
Reagent:	Cycle: 1
Volume:	150ul
Start Reagent 1:	Cycle: 3
Volume:	Dil:
Start Reagent 2:	Cycle:
Volume:	Dil:
CALCULATION	
Sample Limit:	No
Point:	
Reaction Direction:	Increase
Check:	On
Conversion Factor:	1.00000
Offset:	0.00000
Test Range Low:	0.0
High:	20.0
Norm Range Low:	NO
High:	NO
Number of Slats:	1
Calculation Stop At:	Endpoint
Readings First:	2
Last:	12
Reaction Limit:	NO
Point:	
Calib. Interval:	On Request
CALIBRATION	
Reagent Blank:	
Reagent Range:	
Reagent Range Low: -0.1000	Blank Range Low: -0.1000
High: 0.2000	High: 0.1000
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 soro controle.
 (***) Colocar a concentração do calibrador

R1= RA puro e R2= 10mL do RA + 06 gotas RB
APLICAÇÃO PARA EXPRESS 550

Test Name: Total Bilirubina	Test: T.Bili		
Test Bar Code:			
Test Type: Endpoint	Curve Type: Blank/Linear		
Units: mg/dl	Nº of Decimal Places: 2		
Primary Wavelength: 540	Secondary Wavelength: NONE		
Read Time Interval: 20	Sample Blank: Yes		
Factor:			
Calibration Interval: 999			
Normalization Interval:			
Nº of Calibrators: 2	Nº of Replicates: 2		
Low Blank A Limit: -0.100	High Blank A Limit: 0.300		
Low A Limit: -0.100	High A Limit: 1.500		
Low Normal: 0.2	High Normal: 1.0		
Linearity Limit: 20	Curve S.D. Limit: 1.000		
Test Name: Total Bilirubina	Test: T.Bili		
Test Bar Code:			
Sample Volume: 20ul	Sample Diluent:		
Reagent Dilution Ratio: 5	Predilution Ratio: 1		
Reagent Dilution:			
Reagent Volume	Bar Code	Diluent Volume	Lag Time
Reagent 1	250	YB1A	30 sec
Reagent 2	150	YB2A	290 sec
Reagent 3			
Reagent 4			
Control:			

R1= RA puro e R2= 10mL do RA + 06 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: 10159820105
 Edição: Março/2019

APLICAÇÃO PARA SELECTRA

Name:	Bilirubina total
Abbr. Name:	BIL - T
Mode:	Two-point
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:	0.2
Ref Male High:	1.0
Ref Female Low:	0.2
Ref Female High:	1.0
Ref Pad Low:	*
Ref Pad High:	*
Control 1:	*
Control 2:	*
Control 3:	*
Comstat Factor:	1.000
Comstat Offset:	0.000
DUAL MODE	
Name:	BIL - T
Sample Blank:	NO
R1 Bottle:	25 ml
Normal Volume:	220ul
Re-run Volume:	228ul
SAMPLE	
Normal Volume:	12ul
Re-run Volume:	7ul
R2 Bottle:	5ml
Normal Volume:	130 ul
Re-run Volume:	130 ul
Predilution:	NO
Slope Blank:	
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Point One, Two:	-3.238 sec
Incubation Time:	
Low Absorbance:	-0.100
High Absorbance:	3.000
R ABS L Limit:	-0.100
R ABS H Limit:	0.500
Substr. Depletion:	2.000
Reagent Blank:	YES (***)
R ABS Deviation:	
Cal Low Limit:	*
Cal High Limit:	*
Factor:	(***)
MONO MODE	
Name:	
Sample Blank:	
R1 Bottle:	
Normal Volume:	
Re-run Volume:	
SAMPLE	
Normal Volume:	
Re-run Volume:	
Delay Min Time:	
Linearity Limit:	
Predilution:	
Incubation Time:	
Point One, Two:	
Low Absorbance:	
High Absorbance:	
R ABS L Limit:	
R ABS H Limit:	
Substr. Depletion:	
Reagent Blank:	
R ABS Deviation:	
Cal Low Limit:	
Cal High Limit:	
Factor:	

(*) Dados colocados pelo usuário.
 (**) Colocar o valor correspondente do calibrador
 (***) Dados calculados pelo analisador.
 (#) R1= RA puro e R2= 10mL do RA + 06 gotas RB

APLICAÇÃO PARA BTR 810

Name:	Bilirub Total
Point Final:	mg/dl
Units:	Macroscópica
Mode:	550
Filter:	3
Tempo Estab:	
Factor:	
Tempo de Incubação:	
Tempo de Interação:	
Nº de Interações:	
Temperatura:	37°C
Volume Amostra:	400
Time Resposta:	ensucante
Estandart:	**

APLICAÇÃO PARA QUICK LAB

Mode:	Point Final
Leitura:	Macroscópica
Filtro:	550
Temperatura:	37°C
Volume Amoc:	400
Unidade:	mg/dl
Linea Lin:	20
Inclinación:	
Cálculo:	Padrão
Padrão:	**
Factor:	
Delay Inicial:	
Quant Intery:	
Tempo Intery:	
Tempo Estab:	4 sec

APLICAÇÃO PARA BIO 2000

Mode:	P.F.
WL1:	548
Blank:	Não
Bik Amoa Pad:	Sim / Sim
Tempo:	37°C
Vol Amoc:	0400
Rei:	003
Pad:	
Padrão:	Sim
Pad:	ÚNICA
Unit:	**
Unit:	mg/dl
Dec:	2
Int Clin:	
uº Int:	
dAMIN:	
%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:	0.2 / 1.000

APLICAÇÃO PARA RA-XT

Name:	BIL - T
Immunosay:	NO
Chemistry Type:	ENDPOINT
Bio Type:	
Immuno Chemistry:	NO
% Sample Volume:	40 (20ul)
Wavelength:	548 (s)
Biochemical Chemistry:	NO
Biochemical Factor:	
K1:	
K2:	
Bio Limit 1:	
Bio Limit 2:	
Deviation Limit:	
Delay Time:	5 - 60
Blank Type:	NO BLANK
Incubation:	
% Reagent Volume:	50 (25ul)
2nd Reagent:	YES
2nd Reagent Volume:	30 (15ul)
A2 Delay:	4:00
Unit:	mg/dl
Unit Factor:	1.0000
Decimal Point:	2
RBL Low:	0.000
RBL High:	1.000
Range Low:	0.0
Range High:	20.0
Calibration Factor:	1
Reagent Rate:	0.0
Standard Value:	(*)
Normal Low:	0.20
Normal High:	1.00
Slope:	1.000
Intercept:	0.000
C1*10E-6:	
C2*10E-6:	
D1*10E-6:	
Delta R:	
Linear Factor:	
Final Limit:	
Endpoint Limit:	1.000

(*) Colocar o valor correspondente do calibrador
 (*) R1= RA puro e R2= 10mL do RA + 06 gotas RB

APLICAÇÃO PARA AIRONE

Measure Unit:	mg/dl	Decimals: 2	Reaction Type:	Endpoint
Volume (µl):	Serum: 12	Plasma: 12	Urine:	
	Reagent 1: 160	Reagent 2: 160		
Abs Range (m Abs):	Min: -1.000	Max: 1.500		
Linearity Limit:	20.00	Reagent Blanking:	NO	
Contaminating:	NO	Differential:	YES	
Filter 1:	548	Filter 2:	None	
Time (sec):	Mix 1: 2.00	Incubation 1: 60	Lag Phase: 2	
	Mix 2: 0.00	Incubation 2: 300	Measure: 1	
Measurement Type:	Standard	Factor:	0.00	
Normal Range				
	Homens		Mulheres	
Age (yrs)	Min.	Max.	Min.	Max.
Below 10:	0.00		0.00	
From 10 to 60:	0.20	1.00	0.20	1.00
Over:	0.00		0.00	