



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 sulfanilico 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 Snapper 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 sulfanilico diazotizado. O método da bilirrubina total é baseado em uma modificação do método de Pearim e Lee, no qual o surfactante é usado como um solubilizante. O nitrato de sódio é adicionado ao ácido sulfanilico para formar o ácido sulfanilico diazotizado. A bilirrubina na amostra reage com o ácido sulfanilico diazotizado para produzir a azobilirrubina que é lida a 550 nm. A absorvância medida é diretamente proporcional à concentração da bilirrubina total na amostra.

Ác. Sulfanilico diazotizado

Bilirrubina Total -----> 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 glucurônico, transformando-se em mono e diglicuronídeo 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 sulfanilico 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): solução aquosa contendo concentração de bilirrubina total 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.

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 absorvância 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 absorvância de 550 nm
- Pipetas para medição de amostras e reagente.
- Água destilada/deionizada.
- Consumíveis do analisador quando usado.
- Soros Controle e Calibradores.
- 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 (triglicérides > 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 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:

- Preparar o Reagente 1. Utilizar o RA puro. Reagente 2: 03 gotas do RB em 10 mL do RA.
- 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
- 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 reagente nos tubos de ensaio.
- Zerar o aparelho com o branco do reagente a 550nm e proceder as leituras registrando as absorvâncias 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.

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)
Coeficiente 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:

0,260 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:

- A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- 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 Hitachi917 / Advia: 10 x 20mL + 1 x 5mL
Linha Quimiasat 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:

- Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition. Burlis CS and Ashwood ER (Eds), WB Saunders Company (1994)
- Herlich, P., Zeitschr, Sur Anat. Chemie 23:276 (1984)
- Van den Bergh, A.A.H. Snapper J. Dtsch Arch Klin Med. 110:540 (1913)
- Malloy, H., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481 (1937)
- Jendrassik, L. Grof, P., Biochem, Zeitschr., 297:81 (1937)
- Arquivos da Ebram.

