

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

USO

Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina total em amostras de soro. Somente para uso 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 nitrito 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 absorvância medida é diretamente proporcional à concentração da bilirrubina total na amostra.

Ác. Sulfanílico diazotizado

Bilirrubina Total -----> Ác. Azobilirrubina

AMOSTRA

- **Tipos de Amostra:** Soro e plasma (colhido com heparina ou EDTA) 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 – T – Bilirrubina Total MS: 10159820105

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 550nm

Cubetas ou fluxo contínuo com 1.0 cm de passo 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.

PROCEDIMENTO

• Procedimento Manual

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

| | Branco | Calibrador | Amostra/S.C. |
|----------------------|--------|------------|--------------|
| Água destilada | 50 uL | - | - |
| Calibrador | - | 50 uL | - |
| Amostra/S.C. | - | - | 50 uL |
| Reagente de trabalho | 1.0 mL | 1.0 mL | 1.0mL |

2. Homogeneizar imediatamente por inversão e incubar em banho - maria (BM) a 37°C por 10 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagente nos tubos de ensaio.

3. Ler as absorbâncias em espectrofotometria a 550nm, zerando o aparelho com o branco e anotar as leituras.

Atenção: Para preparo do reagente de trabalho misturar 6 gotas do nitrito (reagente B) a 10 mL do reagente A.

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.

• 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.

O reagente de trabalho não se enquadra nos parâmetros de desempenho estipulado.

CÁLCULOS

(Abs.=Absorbância)

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

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: 0,2 - 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.

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 : 0,260 mg/dL.

- **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.
Para interferência de drogas e outras substâncias que podem interferir na dosagem de bilirrubina total, veja Young, DS.

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, 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 o 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. Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition. Burlis CS and Ashwood ER (Eds).WB Saunders Company (1994)
2. Herlich, P., Zeltschr, Sur Anat. Chemie 23:276 (1984)
3. Van den Bergh, A.A.H. Snapper J. Dtsch Arch Klin Med. 110:540 (1913)
4. Van den Bergh, A.A.H Muller, P. Biochem Z 77:90 (1916)
5. Malloy, H., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481 (1937)
6. Jendrassik, L. Grof, P., Biochem, Zeitschr.. 297:81 (1937)
7. Michaelsson, M., Scand. J. Clin. Lab. Invest (Suppl. 49) 13:1 (1951)
8. Nosslin, B., Scand. J. Clin. Lab. Invest (Suppl. 49) 12:1 (1960)
9. Gambino, S.R. Standard Methods of Clinical Chemistry 5:55 (1965)
10. Pearlman FC, ee RT, Clin Chem 1974; 20:447-53
11. Martinek, R.G. Clin. Chim. Acta 13:161 (1966)
12. Young, D.S. et al, Clin. Chem. 21:1D (1975)
13. Arquivos da Ebram.

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

Ver:16/01/2014