

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

USO

Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina total em amostras de soro ou plasma humanos. 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

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. 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. 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 – T – Bilirrubina Total MS: 10159820250

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 - 25°C. Contem Acido sulfanílico 4.9 mmol/L, HCL 104 mmol/L.

Reagente B: Conservar entre 2 - 25°C. Contem nitrito 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 birreagente, para o Reagente 1 deve-se utilizar o reagente A puro e para Reagente 2 deve-se adicionar 6 gotas do reagente B em 10mL 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.

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

Padrão (Cód 3003): Bilirrubina liofilizada em matriz proteica. O valor de concentração é rastreável ao Material de Referencia Padrão 916a. Verifique a concentração no rotulo do frasco. Conservar entre 2 – 8°C ate a data de vencimento impressa no rotulo.

MODO DE PREPARO DO PADRAO:

1. Golpear o frasco levemente com os dedos para desprender o material liofilizado.
2. Utilizando uma pipeta volumétrica calibrada, adicionar exatamente 1,0mL de agua destilada no frasco.
3. Recolocar a tampa, misturar cuidadosamente e deixar em repouso de 5 a 10 minutos antes de utilizar.

Apos 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 diagnostico "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 agua e procurar auxilio medico. 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 550nm, ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

AMOSTRA

Soro e plasma (colhido com heparina ou EDTA). As amostras devem ser protegidas da luz, pois a bilirrubina e 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 e 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.

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. Agua destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soros Controle e Calibradores.
6. Medidor de tempo.

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 ate 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	50µL	50µL	-	-
Amostra/S.C	-	-	50µL	50µL
Reagente 1	1,0mL	-	1,0mL	-
Reagente 2	-	1,0mL	-	1,0mL

- 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.
- 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 influencia 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)

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

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.

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 > 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.

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

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

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. 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. 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.

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

Rev: Dez/20