



QUIMIBIL - D - Bilirrubina Direta

Método Diazo

REG. MS: 10159820249

RESPONSÁVEL TÉCNICA

Dra. Nadjara Novaes Longen | CRF-SP - 37.451

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**

0800 500 2424 ou 11 2574 7110

sac@ebram.com | www.ebram.com

Revisão: Agosto/2022

FINALIDADE. 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 utilizados atualmente 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 utilizada o método de ácido diazo, onde a bilirrubina conjugada reage com o ácido sulfanílico diazotizado para produzir um ácido azobilirrubina cuja absorbância é proporcional à concentração da bilirrubina direta na amostra e pode ser medido a 550 nm. Para analisadores bicromáticos a leitura secundária deve ser medida a 660 nm. Temos então a seguinte reação:



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 glicurônico, transformando-se em mono e diglicuronídio 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, como na insuficiência de glicuroniltransferase ocorre hiperbilirrubinemia porque a bilirrubina indireta não se transforma em direta e 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.

REAGENTES. Reagente A: Pronto para uso. Conservar entre 2 -25°C. Contém: Ácido clorídrico 103 mM e ácido sulfanílico 9,8 mM.

Reagente B: Conservar entre 2- 25°C. Contém: 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

12 gotas do reagente B em 10 mL 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): Material liofilizado contendo concentração padrão de bilirrubina direta 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 à 10 minutos antes de utilizar.

Após reconstituição, o padrão deve ser armazenado em ambiente escuro e é estável por 8 horas de 15 à 25°C, 2 dias de 2 à 8°C e 28 dias à -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. Não usar o reagente se estiver visualmente turvo, se a absorbância do branco ultrapassar 0,10 (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 absorbância de 550 nm
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soros Controle e Calibradores.
6. Cronômetro.

AMOSTRA. Soro ou plasma (colhido com heparina e EDTA): as amostras devem ser protegidas da luz, pois a bilirrubina é fotossensível e, desta maneira, podem ser armazenadas por 3 dias entre 2 - 8°C.

Todas as amostras e controles são considerados potencialmente infectantes, portanto sugerimos manuseá-las seguindo as normas estabelecidas de Biossegurança.

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

PARÂMETROS DO SISTEMA:

Temperatura	37°C
Comprimento de Onda	550 nm
Tipo de Reação	Ponto final
Direção	Crescente
Relação Amostra/Reativo	1:10
Vol. Amostra	100 µL
Vol. Reagente	1,0 mL
Tempo de Incubação	10 minutos

CALIBRAÇÃO. Utilizar Quimicalib Ebram Cód.7023/12023 ou o padrão que acompanha o kit, para kits com padrão. A concentração de bilirrubina direta no 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.

- Preparar o **Reagente 1**: Utilizar o RA puro. **Reagente 2**: 3 gotas do RB em 10 mL do RA.
- Separar 4 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

Tubos	1. Branco	2. Calibrador	3. Branco	4. Amostra/S.C.
Calibrador	100 μ L	100 μ L	-	-
Amostra S/C	-	-	100 μ L	100 μ L
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 absorbâncias do calibrador, amostra e 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 10 μ L aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

CÁLCULOS.

(Abs. = Absorbância)

(Conc. = Concentração)

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) =

$$\frac{\Delta \text{Abs. Amost} - \text{Abs. Branco Amost}}{\Delta \text{Abs. Calib} - \text{Abs. Branco Calib}} \times \text{concentração Calib}$$

EXEMPLO:

Abs. do branco da amostra = 0.005

Abs. amostra = 0.320

Abs. do branco calibrador = 0.009

Abs. calibrador = 0.241

Concentração do calibrador = 1,82 mg/dL

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) =

$$\frac{0.320 - 0.005}{0.241 - 0.009} \times 1,82$$

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) =

$$\frac{0.315}{0.232} \times 1,82$$

Bilirrubina Direta da Amostra (mg/dL) = 2,47 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: 0.0-0.2 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	50
Intervalo dos resultados	0,119,0 (mg/dL)
Coeficiente de correlação	0,9994
Inclinação	1,026
Intercepta	0,01 (mg/dL)

PRECISÃO. Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 40 vezes

N=40	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	0,20	2,98
D.P. (mg/dL)	0,00	0,00
C.V. (%)	0,00	0,00

EXATIDÃO. As amostras foram processadas em duplicata por 10 dias consecutivos, duas vezes por dia. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=40	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	0,20	2,98
D.P. (mg/dL)	0,00	0,15
C.V. (%)	0,00	5,2

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.

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

APRESENTAÇÃO.

Linha Bioquímica Geral: RA:10x10mL + RB:1x5,0mL + P:1x1,0mL

Linha Quimisat 450: R1: 3x20mL + R2: 1x20mL + RB:1x5,0mL

Linha Bulk: 1 x 200mL + 1 x 5mL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

- Zilva JF, Pannall PR "Liver Disease and Gall Stones" in Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment". Lloyd-Luke 1979; Chap XIII; 286-8.
- Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition. Burtis CS and Ashwood ER (Eds).WB Saunders Company (1994)
- Malloy, H., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481-90 (1937)
- Jendrassik, L. Grof, P., Biochem, Zeit schr. 297:81-9 (1938)
- Pearlman FC, Lee RT, Clin Chem 1974; 20:447-53
- Young, D.S. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Testes, Third Edition, AACC Press 1990.
- Arquivos da Ebram.

SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		REAGENTE		FABRICADO POR
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <> TESTES		DATA DE VALIDADE (ÚLTIMO DIA DO MÊS)		NÚMERO DO LOTE
	LIMITE DE TEMPERATURA (CONSERVAR A)		PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		NÚMERO DO CATÁLOGO