



QUIMIBIL - D - Bilirrubina Direta

Método Diazo

REG. MS: 10159820249

EBRAM PRODUTOS LABORATORIAIS LTDA.

Rua Julio de Castilhos, 500 - Belenzinho
São Paulo - SP - Tel.: +55 11 2291 2811
CEP 03059-001 | Indústria Brasileira
CNPJ.: 50.657.402/0001-31

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/2023

FINALIDADE. Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina direta em amostras de soro ou plasma. 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 absorvância 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 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, 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 absorvância 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 absorvância 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.

INTERFERÊNCIAS.

Não devem ser usadas amostras hemolisadas (hemoglobina > 300 mg/dL) ou lipêmicas (triglicérides > 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 à um calibrador mestre correlacionável à um método de referência 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. **Reagente 2**: 3 gotas do RB em 10 mL do RA.
2. 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 | 100 μ L | - | - |
| Amostra S/C | - | - | 100 μ L | 100 μ L |
| Reagente 1 | 1,0mL | - | 1,0mL | - |
| Reagente 2 | - | 1,0mL | - | 1,0mL |

3. 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.
4. 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 1,0 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. = Absorvância)
(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.

Caninos: 0,06 - 0,12 mg/dL
Bovinos: 0,04 - 0,44 mg/dL
Equinos: 0 - 0,4 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) |
| Coefficiente 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.

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 megaohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água tipo II).
3. 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 Bulk: 1 x 200mL + 1 x 5mL

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

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

SÍMBOLOS UNIVERSAIS UTILIZADOS EM EMBALAGENS DE DIAGNÓSTICO IN VITRO

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