

Bilirrubina • Sims Horn – Direta/Total

Kit para determinação da bilirrubina total e direta em amostra de soro ou plasma.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

Significado Clínico

A Bilirrubina é um produto da degradação do grupo heme, onde aproximadamente 70% do qual é derivado de células vermelhas envelhecidas. A bilirrubina circulante é extraída pelo fígado, onde é conjugado por esterificação.

O método de determinação da bilirrubina mais amplamente usado é a reação diazo, que distingue duas frações, indireta e direta. A designação de bilirrubina direta e indireta é derivada de observações realizadas por van den Bergh e Snapper em 1913, onde se observou que alguma bilirrubina reagia imediatamente com o reagente diazo de Ehrlich (reação direta), enquanto que a outra forma de bilirrubina reagia somente após adicionar-se álcool ao meio da reação (reação indireta). As doenças hepatocelulares e a obstrução das vias biliares são as causas mais frequentes das alterações séricas da bilirrubina.

Princípio do teste

A bilirrubina é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525 nm. A bilirrubina direta (ligada ao ácido glicurônico) é dosada em meio aquoso e a bilirrubina total (direta e indireta) é dosada por ação de solubilizador de ação catalizadora. A bilirrubina indireta pode ser determinada pela diferença entre as bilirrubinas total e direta. O padrão utilizado segue as especificações do "Joint Bilirubin Committee"

Composição dos reagentes

R1 **Acelerador:** Solução de Cafeína 130 mmol/L, Benzoato de sódio 260 mmol/L e Acetato de sódio 460 mmol/L. **R2** **Ácido sulfanílico:** Solução de Ácido sulfanílico 5,75 mmol/L em ácido clorídrico 180 mmol/L. **R3** **Nitrito de sódio:** Solução de nitrito de sódio 72,4 mmol/L. **R4** **Padrão:** Bilirrubina dessecada. **R5** **Solvente:** Dimetilsulfóxido.

Apresentações

Código	R1	R2	R3	R4	R5
0026	1x250 mL	1x 125 mL	1x 5 mL	1x 0,3 mL	1x 4 mL

Conjunto para realização de 110 testes na técnica macro e 276 na técnica micro.

Materiais necessários não fornecidos

- Água destilada ou deionizada;
- Cronômetro;
- Espectrofotômetro;
- Pipetas manuais ou automáticas;
- Ponteiras descartáveis;
- Vidraria.

Armazenamento, transporte e validade

Armazenar os reagentes entre 15-30°C em sua embalagem original. Os produtos poderão ser transportados, por até 48 horas, entre 2-30°C. A data de validade se encontra no rótulo do produto.

Precauções e cuidados especiais

- Não misturar ou trocar lotes de reagentes diferentes;
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação;
- Caso haja contato com quaisquer reagentes, lavar a área afetada com água em profusão. Em caso de ingestão de reagentes, procurar auxílio médico imediato munidos desta instrução de uso;
- Utilizar equipamentos de proteção individual segundo normas de biossegurança;
- A água (destilada ou deionizada) utilizada na limpeza do material ou nos procedimentos deve ser recente e isenta de agentes contaminantes;
- Certificar-se das condições adequadas de funcionamento dos equipamentos de análise;
- O descarte do material utilizado deve ser feito segundo os critérios de biossegurança;
- Lavar as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.

Amostra biológica**Soro/plasma**

O analíto é estável por 3 dias entre 2 a 8 °C e ao abrigo da luz.

Nota

Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante. Usar luvas descartáveis durante a manipulação do material biológico. As amostras devem ser descartadas, após o uso, em recipientes específicos para este fim. Não dispensar em coletores de lixo comuns ou nas redes de esgoto.

Interferentes pré-analíticos

Ácido ascórbico acima de 7 mg/dL interfere levando a resultados falsamente diminuídos. Hemoglobina de 150 mg/dL até cerca de 800 mg/dL, (hemólise significativa) interfere positivamente, aumentando os valores em até 20%. Hemoglobina acima de 800 mg/dL (hemólise acentuada) interfere negativamente. Hemólise discreta não interfere.

Preparo dos reagentes**R4** **Preparo do Padrão**

Devido à alta fotossensibilidade da bilirrubina, manter o padrão ao abrigo da luz durante seu preparo e armazenagem.

Transferir 3,0 mL do **R5** para o frasco **R4** e homogeneizar. Deixar em repouso durante 5 minutos, agitando ocasionalmente.

O padrão assim preparado, protegido da luz, é estável durante 30 dias à -20°C. Congelar e descongelar apenas uma vez. Se conservado em temperatura ambiente, e ao abrigo da luz, o padrão é estável somente por 12 horas. A concentração do padrão, após preparo, é equivalente a **10 mg/dL**.

Diazo Reagente: R3+R2

Preparo do Diazo Reagente: Adicionar 50 µL do **R3** a 1,5 mL do **R2**. Homogeneizar e usar no dia da preparação.

Calibração

Dosar o padrão em triplicata.

Passo 1 Pipetar, em diferentes tubos de ensaio, como a seguir:

	Macro		Micro	
	Branco	Padrão	Branco	Padrão
Acelerador	4,5 mL	4,5 mL	1,8 mL	1,8 mL
Ac. Sulfanílico	0,5 mL	-	150 µL	-
Diazo	-	0,5 mL	-	150 µL
Padrão	300 µL	300 µL	50 µL	50 µL

Passo 2 Homogeneizar bem e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente;

Passo 3 Determinar as absorbâncias dos padrões em 525 nm, acertando o zero com o branco. A cor formada é estável por 30 minutos.

Determinar um fator para o método Macro e outro para o Micro.

Procedimento

Passo 1 Pipetar, em diferentes tubos de ensaio, como a seguir:

	Macro			Micro		
	Branco	BD	BT	Branco	BD	BT
Ac. Sulfanílico	0,5 mL	-	-	150 µL	-	-
Diazo	-	0,5 mL	0,5 mL	-	150 µL	150 µL
Água Destilada	4,5 mL	4,5 mL	-	1,8 mL	1,8 mL	-
Acelerador	-	-	4,5 mL	-	-	1,8 mL
Amostra	300 µL	300 µL	300 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Passo 2 Homogeneizar bem e incubar por 5 minutos a temperatura ambiente;

Passo 3 Determinar as absorbâncias em 525 nm, acertando o zero com o branco. A cor formada é estável por 30 minutos.

Cálculos

O fator encontrado (macro ou micro) deve ser utilizado para o cálculo da bilirrubina total e direta.

$$\text{Fator de Calibração (FC)} = \frac{10}{\text{Absorbância do Padrão}}$$

$$\text{Bilirrubina - Direta/Total (mg/dL)} = \text{Abs. da amostra} \times \text{FC}$$

Exemplo:

Concentração do padrão: 10 mg/dL

Absorbância do padrão: 0,350 D.O

Absorbância da amostra: 0,10 D.O

$$\text{Fator de Calibração (FC)} = \frac{10}{0,350}$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = 0,10 \times 28,5 = 2,85 \text{ mg/dL}$$

Nota

Para converter os valores de mg/dL para µmol/L, multiplicar os resultados por 17,1.

Valores de referência³

Soro/Plasma (mg/dL)

Bilirrubina Total	Recém Nascido	< 10,3
	Adultos	< 1,2
Bilirrubina Direta	Recém Nascido	< 0,4
	Adultos	< 0,4

Nota

Estes valores são apenas a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência.

Controle de qualidade

O laboratório deve ter como prática de rotina o uso de soros controle comerciais. Preferencialmente deve participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC.

Características de desempenho do produto⁴

Sensibilidade analítica: A sensibilidade do método é de 0,2 mg/dL.

Limite de Linearidade: Os resultados são lineares até 15 mg/dL para o método macro e 45 mg/dL para método micro. Para valores maiores que estes, diluir a amostra 1:5 com NaCl 0,85% (150 mmol/L) e repetir o ensaio. Multiplicar o resultado encontrado pelo fator de diluição cinco (5).

Estudos comparativos: Este produto não apresentou variação sistêmica significativa quando comparado com produtos de mesma metodologia.

Repetitividade e Reprodutibilidade:

Repetitividade	Concentração média	n	CV%
	0,8 mg/dL	20	7,5
Reprodutibilidade	Concentração média	n	CV%
	8 mg/dL	20	2,1

	0,8 mg/dL	20	2,9
	8 mg/dL	20	3,1

Termo de garantia

A MBIolog Diagnósticos Ltda garante o desempenho deste produto até a data de expiração indicada no rótulo, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções de uso forem seguidas corretamente.

Meio ambiente

As caixas e bulas podem ser encaminhados para coleta seletiva e recicladas, desde que não contenha contaminações químicas e/ou biológicas. Preserve o meio ambiente.

Referências

1. Barham D, Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose byoxidase system. Analyst 1972; 27:142-145.
2. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 2nd ed. Saunders Co, 1991.
3. Lima A et al., 1992. Métodos de Laboratório aplicado a clínica. 7° Ed. Editora Guanabara.
4. Miller, O e Gonçalves, R., 1995. Laboratório para o Clínico. 8° Ed. Editora ATHENEU

SAC – SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE

(31) 3507 0707

sac@mbiolog.com.br

REV.: 05 – 28/04/2011

Fabricado por: MBIolog Diagnósticos Ltda

Rua Gama, 337 – Vila Paris – Contagem – MG
 CEP: 32.372-120 - CNPJ: 03.590.360/0001 – 89
 Resp. Técnico: Fabrício G de Brito CRF-MG 9587
 Empresa Certificada: BPF - ISO 9001
 RMS: 80047580131