

BILIRRUBINA

Instruções de Uso

Ref.: 31

ANVISA 10009010022

Finalidade . Sistema para a determinação das bilirrubinas direta e total em amostras de sangue, por reação de ponto final.

Uso profissional.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . A bilirrubina é dosada por diazotização e formação de azobilirrubina vermelha com absorção máxima em 525 nm. A bilirrubina direta (diglicurônide) é dosada em meio aquoso, enquanto a total (direta e indireta) é dosada por ação de potente solubilizador de ação catalisadora.

Características do sistema . O sistema Bilirrubina Labtest é um procedimento simples, rápido e de grande especificidade para a determinação das bilirrubinas direta e total, em apenas 5 minutos. O reagente Acelerador, composto de benzoato e cafeína tamponada, promove rápida solubilização e diazotização da bilirrubina indireta possibilitando obter soluções coradas totalmente livres de turvação. A estabilização do nitrito de sódio constitui fator de segurança na dosagem permitindo o armazenamento de todos os reagentes a temperatura ambiente.

A versatilidade do método permite que sejam dosados valores de até 25 mg/dL sem necessidade de diluição do soro. Essa versatilidade torna possível a determinação da bilirrubina em sangue de recém-nascidos icterícios.

O método proposto utiliza a técnica manual e é facilmente aplicável à maioria dos analisadores semiautomáticos capazes de medir com exatidão uma reação de ponto final entre 500 e 540 nm.

Metodologia . Sims-Horn.

Reagentes

1. R1 - Acelerador - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém cafeína 130 mmol/L; benzoato de sódio 260 mmol/L; acetato de sódio 460 mmol/L e surfactante.

2. R2 - Ácido Sulfanílico - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém ácido sulfanílico 5,75 mmol/L e estabilizador.

3. R3 - Nitrito de Sódio - Armazenar entre 15 - 25 °C.

Contém nitrito de sódio 72,5 mmol/L e estabilizador.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação de reagentes.

O procedimento usado para a calibração e para o teste deve ser idêntico.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos à contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Material necessário e não fornecido

1. Fotômetro capaz de medir, com exatidão, a absorbância entre 500 e 540 nm.
2. Pipetas para medir amostras e reagentes.
3. Cronômetro.
4. Produto Padrão Bilirrubina Labtest (Ref.: 32) - Para a Calibração.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Urar soro ou plasma (Heparina, EDTA). Quando protegido da luz, o analito é estável 4 dias entre 2 - 8 °C e 3 meses a 20 °C negativos

Soros hemolisados podem fornecer valores falsamente diminuídos na determinação da bilirrubina direta.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las devem-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Valores de triglicérides até 170 mg/dL e hemoglobina até 30 mg/dL não produzem interferências significativas.

Valores de triglicérides entre 170 e 3500 mg/dL produzem resultados falsamente diminuídos.

Valores de hemoglobina entre 30 e 180 mg/dL produzem resultados falsamente elevados na determinação da bilirrubina total e falsamente diminuídos na determinação da bilirrubina direta.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: Diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Procedimento

Ver observações 1 e 2.

O procedimento usado para a calibração e teste deve ser idêntico.

Preparo do diazo reagente . Adicionar 0,01 mL de Nitrito de Sódio (nº 3) a 0,3 mL do Ácido Sulfanílico (nº 2). Misturar e usar no dia da preparação.

Tomar 3 tubos de ensaio e proceder como a seguir:

	Branco	Direta	Total
Água destilada ou deionizada	1,0 mL	1,0 mL	----
Acelerador (nº 1)	----	----	1,0 mL
Ácido Sulfanílico (nº 2)	0,1 mL	----	----
Diazo Reagente	----	0,1 mL	0,1 mL
Amostra	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL

Misturar e esperar 5 minutos. Determinar as absorbâncias das bilirrubinas direta e total em 525 nm ou filtro verde (500 a 540), acertando o zero com o branco. A cor é estável por 30 minutos.

Os procedimentos sugeridos para medição são adequados para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução de volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Padrão}} \times 10$$

Exemplo

$$\text{Absorbância do Teste} = 0,163$$

$$\text{Absorbância do Padrão} = 0,337$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = \frac{0,163}{0,337} \times 10 = 4,84$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \frac{\text{Concentração do padrão (mg/dL)}}{\text{Absorbância do padrão (média)}}$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = \text{Absorbância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{10}{0,337} = 29,67$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dL)} = 0,163 \times 29,67 = 4,84$$

A bilirrubina indireta é obtida pela diferença entre as bilirrubinas total e direta.

Linearidade

A medição é linear até 25,0 mg/dL. Quando for obtido um valor igual ou maior que 25,0 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado pelo fator de diluição. Diluir a amostra de tal modo que o valor encontrado se situe entre 1,0 e 10,0 mg/dL.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração. Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e o erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB)^{4,5}.

Sugere-se utilizar as preparações estabilizadas da linha Qualitrol da Labtest para controle interno da qualidade em ensaios de química clínica.

Intervalo de referência . Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, seus próprios intervalos de referência.

Bilirrubina Direta

Idade	mg/dL
Recém-nascido ⁶	até 0,4

Bilirrubina Total

Recém-nascido ⁶	
Idade	mg/dL
1 dia	até 5,1
1 a 2 dias	até 7,2
3 a 5 dias	até 10,3

Crianças, adolescentes e adultos (mg/dL)

Bilirrubina Direta	até 0,4
Bilirrubina Total	1,2

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 17,1 = Unidades SI (µmol/L)

Características do desempenho⁷

Exatidão . Em três amostras com concentrações de bilirrubina iguais a 1,15, 1,30 e 20,4 mg/dL foram adicionadas quantidades diferentes do analito obtendo-se recuperações entre 100 e 108%. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 2,5 mg/dL foi igual a 0,085 mg/dL ou 3,4%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 40 amostras com valores situados entre 0,19 e 21,1 mg/dL. A comparação resultou na equação da regressão: $y = 0,247 + 0,940x$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,995. O erro sistemático total (constante e proporcional) verificado no nível de decisão (2,5 mg/dL) foi igual a 0,097 mg/dL ou 3,9%. Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - imprecisão intraensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,43	0,03	2,05
Amostra 2	20	2,34	0,03	1,16
Amostra 3	20	21,9	0,22	1,01

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,44	0,07	4,97
Amostra 2	20	2,34	0,07	3,04
Amostra 3	20	22,0	0,69	3,15

Sensibilidade metodológica . Uma amostra protéica não contendo bilirrubina foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 0,06 mg/dL para a bilirrubina total e 0,03 mg/dL para a bilirrubina direta, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão.

Utilizando-se a absorbância do padrão como parâmetro, o limite de detecção fotométrica é 0,02 mg/dL para bilirrubina total e direta, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Duas amostras com valores iguais a 18,7 e 19,5 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema nas diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição que variaram de 2 a 8 foram encontradas recuperações entre 100 e 105%.

Significado clínico . As causas mais comuns de aumento da bilirrubina direta são as doenças hepato-celulares e da árvore biliar.

O aumento da bilirrubina indireta indica: I) aumento da produção (hemólise); II) diminuição do transporte (anticorpos e medicamentos); III) defeito da captação (deficiência ou bloqueio das ligandinas) e IV) defeito da conjugação (doença de Gilbert, entre outras).

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências

1. Malloy HT, Evelyn KA. J Biol Chem 1937;119:481.
2. Martineck RG Clin Chim Acta 1966;13:161.
3. Sims FH, Horn C. Am J Clin Path. 1958;29:412.
4. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponível em: <http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170> (acesso em 08/2005).
5. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.
6. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC: Pediatric Reference Ranges, 5a. edição, Washington: AACCPress, 2005: 42-43.
7. Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Bilirrubina	31	R 1 1 x 250 mL
		R 2 1 x 120 mL
		R 3 1 x 5 mL

Para informações sobre outras apresentações comerciais consulte o site www.labtest.com.br ou entre em contato com o SAC.

[Termos e Condições de Garantia]














A **Labtest Diagnóstica** garante o desempenho deste produto dentro das especificações até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Edição: Julho, 1994
 Revisão: -
 Ref.: 211122(02)

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
 Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro . Symbols used with ivd devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use	CONTROL	Controle Control Control		Tóxico Tóxico Poison
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)	REF	Número de catálogo Número de catálogo Catalog Number	CONTROL -	Controle negativo Control negativo Negative control	R	Reagente Reactivo Reagent
CAL	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes	CONTROL +	Controle positivo Control positivo Positive control		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
CAL	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material	IVD	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device	CONTROL	Controle Control Control	LOT	Número do lote Denominación de lote Batch code
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)	LYOPH	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk		Período após abertura Periodo post-abertura Period after-opening
EC REP	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Corrosivo Corrosivo Corrosive	CE	Marca CE Marcado CE CE Mark		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
IN	Instalar até instalar Instalar hasta Install before		Fabricado em Elaborado en Manufactured on		Produto de uso único Producto de un solo uso Single use product		

Ref.: 280322 |