

Bilirrubina Total

Finalidade . Sistema bi-reagente para determinação de bilirrubina total, por reação de ponto final, em amostras de soro e plasma.

Uso profissional.

[Somente para uso diagnóstico *in vitro*.]

Princípio . A bilirrubina indireta da amostra é desligada da albumina e solubilizada por ação de um acelerador e as bilirrubinas direta e indireta são medidas por formação de azobilirrubina com dicloroanilina diazotada. A cor formada é proporcional à concentração de bilirrubina total na amostra.

Características do sistema . Bili-T Liquiform é um conjunto de reagentes que permite um procedimento simples e rápido para determinação da bilirrubina total em amostras de soro ou plasma. O Reagente 1 contém um acelerador capaz de desligar a bilirrubina indireta da albumina promovendo sua solubilização em meio aquoso. O Reagente 2 contém dicloroanilina diazotada (DCA), que é um diazo-reagente estável em forma líquida pronta para uso.

Como as metodologias utilizando mono-reagente sofrem interferências da amostra e incrementam a inexatidão dos resultados, a Labtest Diagnóstica desenvolveu uma aplicação bi-reagente com utilização de branco da amostra que aumenta a especificidade metodológica e minimiza a interferência da amostra transferindo excelente exatidão aos resultados.

A especificidade do sistema Bili-T Liquiform garante rastreabilidade a referências internacionais porque o método demonstra excelente correlação e associação com o método de Jendrassik e Gróf, proposto como candidato a referência para dosagem de bilirrubina.^{1,2}

O sistema Labtest permite que sejam dosadas concentrações de bilirrubina total até 30 mg/dL sem a necessidade de diluição da amostra, o que o torna extremamente útil para a determinação de bilirrubina em amostras de sangue de recém-nascidos.

O desenvolvimento do método foi direcionado para automação, tornando-o facilmente aplicável em analisadores automáticos capazes de medir com exatidão uma reação de ponto final em 546 nm. Entretanto, o sistema Bili-T Liquiform pode ser utilizado com sucesso em aplicações manuais utilizando fotômetros ou instrumentos semiautomáticos.

Metodologia . Labtest DCA.

Reagentes

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2-8 °C.

Contém 2-fenoxietanol 0,8 mmol/L e surfactante.

2. [R2] - Reagente 2 - Armazenar entre 2-8 °C.

Contém ácido clorídrico 30 mmol/L e dicloroanilina diazotada 1,0 mmol/L.

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.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes, os quais não devem ser pipetados com a boca. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorbância entre 530 e 550 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.
5. Calibradores da linha Calibra - Labtest.

Amostra

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

As bilirrubinas conjugada (direta) e não conjugada (indireta) são oxidadas por ação da luz branca ou ultravioleta. Portanto, as amostras de sangue devem ser protegidas da exposição direta à luz artificial ou solar logo após a coleta.

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.

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

Concentrações de triglicérides até 1500 mg/dL não produzem interferências significativas. A presença de hemoglobina (hemólise) em qualquer concentração na amostra de indivíduo adulto interfere no resultado do teste. Hemólise discreta (≤ 50 mg/dL) não interfere significativamente em amostras de recém-nascidos.

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.

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

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

Procedimento

Este procedimento não se aplica aos analisadores semiautomáticos que utilizam unicamente cubeta de fluxo. Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semiautomáticos.

Ver Observações 1, 2 e 3.

Tomar 3 cubetas do fotômetro e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Calibrador
Reagente 1	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL
Amostra	----	0,05 mL	----
Calibrador	----	----	0,05 mL
Água deionizada	0,05 mL	----	----

Homogeneizar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar somente as absorbâncias do teste e calibrador em 546 nm (530 a 550 nm), acertando o zero com água deionizada. Obterm-se a absorbância A_1 .

	Branco	Teste	Calibrador
Reagente 2	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL

Homogeneizar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. Determinar as absorbâncias do teste e calibrador em 546 nm (530 a 550 nm), acertando o zero com o branco. Obterm-se a absorbância A_2 . A cor é estável por 30 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 0,8 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 dos 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 . Ver linearidade.

A leitura A_1 do Teste e do Calibrador deve ser corrigida para o volume final da reação obtendo-se $A_{1\text{cor}}$

$$\text{Teste } A_{1\text{cor}} = \text{Teste } A_1 \times 0,81$$

$$\text{Calibrador } A_{1\text{cor}} = \text{Calibrador } A_1 \times 0,81$$

Para obter a absorbância final subtrair o valor $A_{1\text{cor}}$ da absorbância A_2 do Teste e do Calibrador:

$$\text{Absorbância do Teste} = A_2 - A_{1\text{cor}}$$

$$\text{Absorbância do Calibrador} = A_2 - A_{1\text{cor}}$$

$$\text{Bilirrubina total} = \frac{\text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Calibrador}} \times \text{CCal}$$

CCal: concentração do calibrador

Exemplo

Teste:

$$A_1 = 0,054$$

$$A_2 = 0,082$$

$$A_{1\text{cor}} = 0,054 \times 0,81 = 0,044$$

$$\text{Absorbância do Teste: } 0,082 - 0,044 = 0,038$$

Calibrador:

$$\text{CCal: } 3,37 \text{ mg/dL}$$

$$A_1 = 0,072$$

$$A_2 = 0,187$$

$$A_{1\text{cor}} = 0,072 \times 0,81 = 0,058$$

$$\text{Absorbância do Calibrador: } 0,187 - 0,058 = 0,129$$

$$\text{Bilirrubina total (mg/dL)} = \frac{0,038}{0,129} \times 3,37 = 0,99$$

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

$$\text{Fator} = \frac{\text{CCal}}{\text{Absorbância do Calibrador}}$$

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

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{3,37}{0,129} = 26,1$$

$$\text{Bilirrubina total (mg/dL)} = 0,038 \times 26,1 = 0,99$$

Calibração

As concentrações de bilirrubina dos produtos da linha Calibra - Labtest são rastreáveis ao Standard Reference Material (SRM) 916 do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Calibrações manuais

Usar Calibrador Calibra H - Labtest.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água deionizada ou solução de cloreto de sódio 150mmol/L (0,85 %);

Usar calibrador Calibra H - Labtest.

Intervalo de calibrações

Calibração ao mudar de lote ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 30 mg/dL. Para valores maiores que 30 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85 %), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

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).^{6,9} Sugere-se utilizar as preparações estabilizadas dos produtos da linha Qualitrol - 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 seus próprios intervalos de referência na população atendida.

Recém-nascidos¹⁰

Bilirrubina Direta	até 0,4 mg/dL
Bilirrubina Total	1 dia: até 5,1 mg/dL
	1 a 2 dias: até 7,2 mg/dL
	3 a 5 dias: até 10,3 mg/dL

Crianças, Adolescentes e Adultos

Bilirrubina Direta	até 0,4 mg/dL
Bilirrubina Total	até 1,2 mg/dL

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

Características do desempenho¹¹

Exatidão . Em amostras com concentrações conhecidas de bilirrubina total foram adicionadas diferentes quantidades do analito, obtendo-se recuperações entre 98 e 100 % . O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 1,4 mg/dL foi igual a 0,02 mg/dL ou 1,2 %.

Especificidade . O método proposto foi comparado com método de Jendrossik e Gróf, sendo obtidos os seguintes resultados:

	Método Comparativo	Método Labtest
Número de amostras	40	40
Intervalo de concentrações (U/L)	0,16 - 17,04	0,20 - 17,55
Média das estimativas (U/L)	3,15	3,36
Equação da regressão	Método Labtest = 1,033 Método Comparativo + 0,099 mg/dL	
Coefficiente de correlação	0,998	
Erro sistemático médio (mg/dL)	0,21	

Foram estimados erros sistemáticos iguais a 10,0 %, 7,3 % e 3,8 %, nos níveis de decisão de 1,5; 2,5 e 18,0 mg/dL, respectivamente. Confirma-se a hipótese nula de que as diferenças entre o método Bili-T Liquiform e o método comparativo não se desviam em mais que o desvio provocado pelas imprecisões inerentes, caracterizando a identidade ou relação funcional entre os métodos.

Os erros totais (erro aleatório + erro sistemático) estimados nos níveis de decisão 1,5, 2,5 e 18,0 mg/dL são 13,4 %, 11,0 % e 5,2 %. Assim, Bili-T Liquiform é substancialmente equivalente ao método comparativo. O coeficiente de correlação (0,998) confirma a força da relação entre os métodos.

Repetitividade - Imprecisão intraensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,5	0,02	1,04
Amostra 2	20	2,3	0,03	0,68
Amostra 3	20	18,1	0,07	0,51

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	1,5	0,04	2,95
Amostra 2	20	2,3	0,06	2,67
Amostra 3	20	18,1	0,09	0,68

Sensibilidade metodológica . Uma amostra de NaCl 150 mmol/L (0,85 %) foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio, tendo sido encontrado um valor igual a 0,09 mg/dL, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Verificou-se que o limite de detecção fotométrica é de 0,03 mg/dL, correspondendo a uma absorvância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Amostras com valores iguais a 6,1 e 23,4 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema às diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando fatores de diluição correspondentes a 1:2, 1:4 e 1:8 foi encontrada recuperação média de 109%.

Significado clínico . Algumas doenças adquiridas e hereditárias e diversos medicamentos são capazes de afetar uma ou mais etapas envolvidas na produção, captação, armazenamento, metabolismo e excreção da bilirrubina. Dependendo do distúrbio, a bilirrubina não-conjugada (indireta), a conjugada (direta) ou ambas (total), são as principais contribuintes da hiperbilirrubinemia.

A forma mais comum de aumento da bilirrubina indireta é aquela vista em recém-nascidos e referida como icterícia fisiológica. Este aumento é causado por uma produção aumentada de bilirrubina como resultado da hemólise das hemácias e da maturação incompleta dos mecanismos do metabolismo e excreção da bilirrubina. Em 5% dos neonatos, os valores de bilirrubina não-conjugada são maiores que 15 mg/dL e podem desencadear o quadro de encefalopatia bilirrubínica (Kernicterus).

A destruição prematura das hemácias - anemia hemolítica e a eritropoiese ineficaz são importantes causas de hiperbilirrubinemia, com predomínio de bilirrubina não-conjugada, na ausência de qualquer anormalidade hepática.

Dentre as causas hereditárias de hiperbilirrubinemia não-conjugada, destacam-se as síndromes de Crigler-Najjar e de Gilbert que estão associadas à deficiência da enzima uridina difosfato (UDP) glicuroniltransferase. A Síndrome de Gilbert é mais comum e parece haver, também, defeito no transporte da bilirrubina através da membrana do hepatócito.

As causas mais comuns de aumento da bilirrubina direta são as doenças hepatobiliares e obstrução da árvore biliar (colestase). Na realidade, ambas as bilirrubinas estão aumentadas e pode-se observar uma variação ampla das concentrações séricas de cada forma de bilirrubina. Hepatite e cirrose são exemplos de doenças que podem causar colestase intra-hepática.

A colestase pode também ser induzida por medicamentos e hormônios esteróides. A obstrução extra-hepática da árvore biliar devido a carcinoma ou fibrose de cabeça do pâncreas, carcinoma ou constrições do canal biliar comum e coledocolitíase, produzem concentrações séricas aumentadas de bilirrubina direta.

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 enxágüe 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.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar www.fxol.org/.

Referências

- Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW, et al. Clin. Chem. 1985; 31:1779-1789.
- Perry BW, Doumas BT, Bayse DD, et al. Clin. Chem. 1983;29:297-301.
- Perlman FC, Lee RTY. Clin. Chem. 1974, 20:447-453.
- Poon R; Hinberg IH. Clin. Chem. 1985, 31:92-94.
- Tietz. Textbook of Clinical Chemistry, Burtis CA.; Ashwood ER. eds, 2ª edição, Philadelphia: WB. Saunders Co, 1994.
- 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 04/2006).
- Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.
- Rand RN, di Pasqua A. Clin. Chem. 1962; 06:570-8.
- Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.
- Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC: Pediatric Reference Ranges, 5a. edição, Washington: AACCPress, 2005: 42-43.
- Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Bili-T Liquiform	94-1/104	[R 1] 1 X 80 mL
		[R 2] 2 X 12 mL
Bili-T Liquiform Labmax 560/400	94-4/44	[R 1] 4 X 35 mL
		[R 2] 4 X 9 mL

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

Estão disponíveis aplicações **para sistemas automáticos e semiautomáticos**.

O volume de reagente **em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação de cada equipamento**.

Informações ao consumidor

[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.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296/0001-38

Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP: 33240-152

Lagoa Santa, Minas Gerais - Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 3411 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Edição: Outubro, 2004

Revisão: Julho, 2022

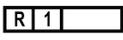
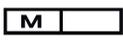
Ref.: 030223(02)

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		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	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)		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Tóxico Tóxico Poison
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Instalar até Instalar hasta Install before		Fabricado em Elaborado en Manufactured on
	Produto de uso único Producto de un solo uso Single use product		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Período após abertura Período post-abertura Period after-opening
	Tóxico para os organismos aquáticos Tóxico para los organismos acuáticos Toxic for aquatic organisms		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Gases/líquidos comburentes Gases/líquidos oxidantes Oxidizing gases/liquids		Reagente Reactivo Reagent
	Atenção Atención Attention		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Material Calibrador/Padrão Material Calibrador/Estándar Calibrator/Standard Material		Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Controle negativo Control negativo Negative control
	Reagente Reactivo Reagent		Controle positivo Control positivo Positive control
	Reagente contendo micropartículas Reactivo con micropartículas Reagent with microparticles		

Ref.: 190523 |