



Bilirrubina Directa

AA

Método DPD para a determinação de bilirrubina direta em soro ou plasma

SIGNIFICADO CLÍNICO

A bilirrubina, composto produzido pela degradação da hemoglobina, é captado pelo fígado para sua conjugação e excreção biliar. As alterações hepatocelulares e obstruções biliares podem provocar hiperbilirrubinemias.

A eritroblastose fetal ou anemia hemolítica do recém nascido é uma patologia provocada pela incompatibilidade materno-fetal. Nestas patologias se produz a destruição massiva de glóbulos vermelhos que resulta num considerável aumento da bilirrubina sérica com o conseqüente risco de espalhar-se o pigmento ao sistema nervoso central. Por tal motivo, a determinação da bilirrubina no recém nascido, resulta muito importante.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A bilirrubina direta reage com o sal de diclorofenildiazonio (DPD) produzindo um azo composto cor vermelho em solução ácida.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: frascos contendo sal de diclorofenildiazonio.

B. Reagente B: solução aquosa contendo ácido sulfâmico 90 mmol/l.

C. Reagente C (Reagente para Branco de Amostra): solução aquosa contendo ácido sulfâmico 90 mmol/l.

Concentrações finais

ácido sulfâmico..... 90 mmol/l
cloroeto de sódio 6,6 g/l
diclorofenildiazonio 0,1 mmol/l

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

Calibrador A plus da Wiener lab.

INSTRUÇÕES DE USO

Reagentes B y C: prontos para uso.

Reagente de Trabalho: reconstituir cada frasco de Reagente A com 10 ml de Reagente B. Tampar e agitar até dissolução completa. Homogeneizar e datar.

PRECAUÇÕES

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Os Reagentes B e C são irritantes. H315+H320: Provoca irritação cutânea e ocular. P262: Não pode entrar em contacto com os olhos, a pele ou a roupa. P305 + P351 + P338: SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P302 + P352: SE ENTRAR EM CONTACTO

COMA PELE: lavar com sabonete e água abundantes. P280: Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

INDÍCIOS DE INSTABILIDADE OU DETERIORAMENTO DOS REAGENTES

Leituras do Branco de Reagentes por acima de 0,100 D.O. a 546 nm, indicam deterioramento dos reagentes. Descartá-los.

A turbidez indica deterioramento dos reagentes. Neste caso, descartá-los.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagentes Fornecidos: são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data do vencimento indicada na embalagem.

Reagente de Trabalho: estável 21 dias sob refrigeração (2-10°C).

AMOSTRA

Soro ou plasma

a) Coleta: obter a amostra da maneira habitual. Manter protegido da luz natural ou artificial, cobrindo o tubo com papel escuro.

b) Aditivos: caso de que a amostra seja plasma, deve-se utilizar heparina para sua obtenção.

c) Substâncias interferentes conhecidas: não se observam interferências por hemoglobina até 180 mg/dl, triglicéridos até 550 mg/dl (5,50 g/l), nem heparina até 20 U/ml. Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve ser preferencialmente fresca. Caso de não realizar-se o ensaio na hora, a amostra deve ser conservada até 48 horas sob refrigeração (2-10°C) e o sangue inteira, não mais de 24 horas sob refrigeração (2-10°C) ou 12 horas a temperatura ambiente (menor a 25°C).

A ação da luz pode destruir em uma hora até 50% da bilirrubina presente na amostra. Por tal motivo deve-se proteger da luz.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro
- Micropipetas ou pipetas para medir os volumes indicados

- Tubos ou cubetas espectrofotométricas
- Cronômetro

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

- Comprimento de onda: 546 nm em espectrofotômetro ou 520-550 nm em fotocolorímetro com filtro verde.
- Temperatura de reação: temperatura ambiente (menor a 25°C)

- Tempo de reação: 10 minutos
- Volume de amostra: 40 ul
- Volume final de reação: 0,54 ml

PROCEDIMENTO

Em 4 tubos marcados B_C (Branco de Calibrador), C (Calibrador), B_D (Branco de Desconhecido) e D (Desconhecido), colocar:

	B _C	C	B _D	D
Reagente C	0,5 ml	-	0,5 ml	-
Reagente B	-	0,4 ml	-	0,4 ml
Calibrador	40 ul	40 ul	-	-
Amostra	-	-	40 ul	40 ul
Reagente de Trabalho	-	0,1 ml	-	0,1 ml

Misturar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente (menor a 25°C). Ler em espectrofotômetro a 546 nm ou em fotocolorímetro com filtro verde (520-550 nm) levando o aparelho a zero com o Branco de Reagente (B_R). Podem-se aumentar proporcionalmente os volumes.

Nota: processar um Branco de Reagente (B_R) por cada série de determinações misturando 0,4 ml de Reagente B + 40 ul de água destilada + 0,1 ml de Reagente de Trabalho.

ESTABILIDADE DA MISTURA DE REAÇÃO FINAL

A absorbância deve ser lida aos 10 minutos exatos.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

$$\text{Bilirrubina direta (mg/l)} = (D - B_D) \times f$$

onde:

$$X^* \text{ mg/l}$$

$$f = \frac{C}{C - B_C}$$

* concentração de bilirrubina direta no **Calibrador A plus** da Wiener lab.

Exemplo:

$$B_C = 0,008$$

$$C = 0,135$$

$$B_D = 0,009$$

$$D = 0,029$$

$$X = 23,9 \text{ mg/l}$$

$$f = \frac{23,9 \text{ mg/l}}{0,135 - 0,008} = 188,2 \text{ mg/l}$$

$$\text{Bilirrubina direta (mg/l)} = (0,029 - 0,009) \times 188,2 = 3,8 \text{ mg/l}$$

Também pode-se utilizar o fator colorimétrico (f) calculado, empregando **Bilirrubina Standard** da Wiener lab. na técnica de **Bilirrubina Total AA** da Wiener lab. (método DPD).

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (**Standatrol S-E 2 níveis**) com concentrações conhecidas de bilirrubina direta, com cada determinação.

VALORES DE REFERÊNCIA

Bilirrubina direta em soro ou plasma

Adultos: até 2 mg/l

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de referência.

CONVERSÃO DE UNIDADES

$$\text{Bilirrubina (mg/l)} = \text{Bilirrubina (mg/dl)} \times 10$$

$$\text{Bilirrubina (mg/dl)} \times 17,1 = \text{Bilirrubina (umol/l)}$$

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. A ação da luz sobre as amostras e soluções padrão, pode destruir em 1 hora até o 50% da bilirrubina presente.

DESEMPENHO

Os ensaios foram realizados em analisador automático Express Plus[®]. Se se utiliza o procedimento manual, deve-se validar que seja obtida uma performance semelhante à seguinte:

a) Reprodutibilidade: aplicando o protocolo EP5-A do CLSI (ex NCCLS), obtiveram-se os seguintes dados:

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
1,4 mg/l	± 0,05 mg/l	4,03 %
18,0 mg/l	± 0,24 mg/l	1,33 %

Precisão total

Nível	D.P.	C.V.
1,4 mg/l	± 0,06 mg/l	5,09 %
18,0 mg/l	± 0,36 mg/l	2,00 %

b) Linearidade: aplicando o protocolo EP6-P obteve-se uma linearidade de 140 mg/l. Para valores superiores repetir a determinação com amostra diluída 1:2 ou 1:4 com solução fisiológica e multiplicar o resultado obtido por 2 ou 4 respectivamente.

c) Sensibilidade analítica: 1,1 mg/l.

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

Para a calibração deve-se utilizar **Calibrador A plus** da Wiener lab.

O kit fornece Reagente para Branco de Amostra (Reagente C) que somente é necessário em alguns analisadores au-

tomáticos. No resto dos analisadores este Reagente não é necessário.

Para obter maior informação deve-se consultar o manual de adaptações de Reagentes Wiener lab. do seu analisador.

APRESENTAÇÃO

200 ml (Cód. 1009306): - 4 frascos Reagente A
- 4 x 10 ml Reagente B
- 4 x 40 ml Reagente C

200 ml (Cód. 1120006): - 4 frascos Reagente A
- 4 x 50 ml Reagente B
- 2 x 100 ml Reagente C

REFERÊNCIAS

- Bartels, H. and Boehmer, M. - Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. (1971).
- Colombo, J.; Peheim, E.; Kyburz, S. and Hoffman - Clin. Chim. Acta 51/2:217 (1974).
- Botwell, J. H. - Clin. Chem. 10/3:197 (1964).
- Watson, D. - Clin. Chem. 7/6:603 (1961).
- Ichida, T. and Nobuoka, M. - Clin. Chim. Acta 19/2:249 (1968).
- Rand and Di Pascua - Clin. Chem. 8/6 (1962).
- Zaroda, R. - Am. J. Clin. Path. 45/1:70 (1966).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 3rd ed. (1990).
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3rd ed. (1999).
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NC-CLS). Document "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods", EP6-P (1986).
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS). Document "Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Devices", EP5-A (1999).

SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"

	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Uso médico-diagnóstico "in vitro"
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data de validade
	Limite de temperatura (conservar a)
	Não congelar
	Risco biológico
	Volume após a reconstituição
	Conteúdo
	Número de lote
	Elaborado por:
	Nocivo
	Corrosivo / Caústico
	Irritante
	Consultar as instruções de uso
	Calibrador
	Controle
	Controle Positivo
	Controle Negativo
	Número de catálogo

Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina