



Bilirubin T

Finalidade

Método DPD para a determinação de bilirrubina total 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, produzindo toxicidade, razão pela qual a determinação de bilirrubina no recém-nascido é muito importante.

Fundamentos do método

A bilirrubina indireta, unida à albumina, é liberada por um tensoativo. A bilirrubina total reage com o sal de diclorofenildiazônio (DPD) produzindo um azocomposto de cor vermelha em solução ácida.

Reagentes fornecidos

A. Reagente A: solução aquosa contendo ácido clorídrico 150 mmol/L e tensoativo.

B. Reagente B: solução aquosa contendo sal de diclorofenildiazônio 1,5 mmol/L em ácido clorídrico 150 mmol/L.

Reagentes não fornecidos

Laborcal da Laborlab.

Instruções de uso

Reagentes Fornecidos: prontos para uso. Antes de utilizar, misturar por inversão. O **Reagente B** pode desenvolver turbidez que não afeta a sua reatividade.

Precauções

Os reagentes são para uso diagnóstico "in vitro".

Os reagentes são corrosivos. R34: provoca queimaduras. S24/25: evitar o contato com os olhos e a pele. S26: caso haja contato com os olhos, lavar imediatamente com água em abundância e procurar um serviço médico. S28: caso haja contato com a pele, lavar imediatamente com água em abundância. S37/39: utilizar luvas adequadas e proteção apropriada para os olhos/face.

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

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

Estabilidade e instruções de armazenamento

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

Amostra

Soro ou plasma

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

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

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra deve ser preferencialmente fresca. Caso não realize o ensaio na hora, a amostra deve ser conservada até 48 horas sob refrigeração (2-10°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.

Interferências

Não são observadas interferências por hemólise até uma concentração de hemoglobina de 500 mg/dL (0,5 g/dL) nem lipemia até uma concentração de 500 mg/dL (5 g/L) de triglicérides. No entanto, amostras hiperlipêmicas ou com hemólise moderada podem conduzir a resultados errados.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

Material necessário (não fornecido)

- Espectrofotômetro
- Micropipetas ou pipetas para medir os volumes indicados
- Cronômetro
- Analisador automático

Condições de reação

- Comprimento de onda: 546 nm (520 - 550 nm)
- Temperatura de reação: 25°C (30°C ou 37°C)
- Tempo de reação: 5 minutos 30 segundos
- Volume de amostra: 80 uL
- Volume final de reação: 1,28 mL

Procedimento

Em 3 tubos marcados BR (Branco de Reagentes), BM (Branco de Amostra/Calibrador/Controle), e M (Amostra/Calibrador/Controle), colocar:

	BR	BM	M
Reagente A	1 mL	1,2 mL	1 mL
Água destilada	80 uL	-	-
Amostra	-	80 uL	80 uL
Misturar e incubar exatamente 30 segundos. Após, acrescentar:			
Reagente B	0,2 mL	-	0,2 mL

Misturar e incubar 5 minutos. Logo após, ler em espectrofotômetro a 546 nm (520 - 550 nm), levando o aparelho a zero com o Branco de Reagente (BR). Leitura 1 (DO₁): BM (Branco de Amostra) ou BC (Branco de Calibrador). Leitura 2 (DO₂): M (Amostra) ou C (Calibrador).

Estabilidade da mistura de reação final

A cor é estável 30 segundos e deve ser lida dentro deste tempo.

Cálculo dos resultados

Bilirrubina Total (mg/dL) = (DO₂ Amostra - DO₁ Amostra) x f

onde:

$$f = \frac{X^* \text{ mg/dL}}{DO_{2 \text{ Calibr.}} - DO_{1 \text{ Calibr.}}}$$

(*): concentração de bilirrubina total no Laborcal da Laborlab.

Exemplo:

(Os dados apresentados a seguir são ilustrativos)

Amostra

DO₁ Branco da amostra: 0,048

DO₂ Amostra: 0,247

Absorbância da amostra: 0,247 - 0,048 = 0,199

Calibrador

DO₁ Branco do Calibrador: 0,075

DO₂ Calibrador: 0,166

Absorbância do Calibrador: 0,166 - 0,075 = 0,091

Se o valor de Bilirrubina total no Laborcal é 0,52 mg/dL

$$\text{Fator} = \frac{0,52 \text{ mg/dL}}{0,091} = 5,71$$

Bilirrubina total (mg/dL) = 0,199 x 5,71 = 1,13 mg/dL

Método de controle de qualidade

Processar 2 níveis de um material de controle de qualidade (Laborcontrol 1 e Laborcontrol 2 da Laborlab) com concentrações conhecidas de bilirrubina total, com cada determinação.

Valores de referência

Bilirrubina total em soro ou plasma:

- Adultos: até 1,0 mg/dL
- Recém nascidos:

	Nascidos a termo	Prematuros
Sangue de cordão	< 2,0 mg/dL	< 2,0 mg/dL
Até as 24 hs	1,4 - 8,7 mg/dL	< 8,0 mg/dL
Até 48 hs	3,4 - 11,5 mg/dL	< 12,0 mg/dL
Do 3º ao 5º dia	1,5 - 12,0 mg/dL	< 16,0 mg/dL

Os valores então começam a diminuir até atingir o nível adulto médio um mês após o nascimento. Em prematuros, os níveis demoram mais para atingir o normal, dependendo do grau de imaturidade hepática.

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

Conversão de unidades ao sistema SI

Bilirrubina (umol/L) = Bilirrubina (mg/dL) x 0,171

Limitações do procedimento

Vide "Interferências".

A ação da luz, tanto nas amostras quanto nas soluções padrão, é capaz de destruir até 50% da bilirrubina presente em uma hora.

Desempenho

a) Reprodutibilidade: aplicando o protocolo EP-15A do CLSI, se analisaram três níveis de concentração, cada um por quadruplicado durante 5 dias. Com os dados obtidos, calcularam-se as precisões intra-ensaio e total.

Precisão intra-ensaio (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
0,85 mg/dL	± 0,028 mg/dL	3,29 %
4,61 mg/dL	± 0,031 mg/dL	0,67 %
16,45 mg/dL	± 0,121 mg/dL	0,74 %

Precisão total (n = 20)

Nível	D.P.	C.V.
0,85 mg/dL	± 0,030 mg/dL	3,53 %
4,61 mg/dL	± 0,077 mg/dL	1,67 %
16,45 mg/dL	± 0,315 mg/dL	1,92 %

b) Linearidade: a reação é linear até 25 mg/dL de bilirrubina. 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) Limite de detecção: depende do fotômetro empregado e do comprimento de onda. Em espectrofotômetros com cubetas de faces paralelas de 1 cm de espessura, para um ΔA de 0,001 a mudança mínima de concentração detectável será de 0,031 mg/dL.

Parâmetros para analisadores automáticos

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

Para a calibração deve-se utilizar o **Laborcal** da Laborlab.

Apresentação

1 x 80 mL **Reagente A**

1 x 16 mL **Reagente B**

(Cód. 1770040)

Referências

- Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. - Tietz Fundamentals of Clin. Chem. 5th Ed.: 966, 2001.
- Weigl, E.; Bach, H.; Krieg, D. - Med. Klin. 70/15:664 (1975).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, 2004.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3rd ed. (2001).

Termo de garantia

Este Kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.

SÍMBOLOS



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 da 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



Bilirubin T

Fin y uso

Método DPD para la determinación de bilirrubina total en suero o plasma

Significación clínica

La bilirrubina, compuesto de degradación de la hemoglobina, es captada por el hígado para su conjugación y excreción en la bilis. Las alteraciones hepatocelulares u obstrucciones biliares pueden provocar hiperbilirrubinemias.

La eritroblastosis fetal o anemia hemolítica del recién nacido es una patología provocada por incompatibilidad materno-fetal en la que se produce una destrucción excesiva de glóbulos rojos. Esto resulta en un severo aumento de la bilirrubina sérica con el consecuente riesgo de difusión del pigmento al sistema nervioso central produciendo toxicidad, por lo que la determinación de la bilirrubina en estos niños recién nacidos resulta sumamente importante.

Fundamentos del método

La bilirrubina indirecta, unida a la albúmina, es liberada por un tensioactivo. La bilirrubina total reacciona con la sal de diclorofenildiazonio (DPD) formando un azocompuesto de color rojo en solución ácida.

Reactivos provistos

A. Reactivo A: solución acuosa conteniendo ácido clorhídrico 150 mmol/l y tensioactivo.

B. Reactivo B: solución acuosa conteniendo sal de diclorofenildiazonio 1,5 mmol/l en ácido clorhídrico 150 mmol/l.

Reactivos no provistos

Laborcal de Laborlab.

Instrucciones para su uso

Reactivos Provistos: listos para usar. Antes de utilizar, mezclar por inversión. El **Reactivo B** puede presentar una ligera turbidez que no afecta su reactividad.

Precauciones

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Los reactivos son corrosivos. R34: provoca quemaduras. S24/25: evitar el contacto con los ojos y la piel. S26: en caso de contacto con los ojos, lávese inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S28: en caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

Estabilidad e instrucciones de almacenamiento

Reactivos Provistos: estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Muestra

Suero o plasma

a) Recolección: obtener de la manera habitual. Proteger de la luz natural o artificial envolviendo el tubo con papel negro.

b) Aditivos: en caso de que la muestra sea plasma, debe usarse heparina o EDTA para su obtención.

c) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra debe ser preferentemente fresca. En caso de no efectuarse el ensayo en el momento, la muestra puede conservarse hasta 48 horas en refrigerador (2-10°C).

La acción de la luz es capaz de destruir hasta un 50% de la bilirrubina presente en la muestra, por lo que debe protegerse cuidadosamente.

Interferencias

No se observan interferencias por hemólisis hasta una concentración de hemoglobina de 500 mg/dl (0,5 g/dl) ni lipemia hasta una concentración de 500 mg/dl (5 g/l) de triglicéridos. No obstante, muestras hiperlipémicas o con hemólisis moderada pueden conducir a resultados erróneos.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

Material requerido (no provisto)

- Espectrofotómetro
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados
- Cronómetro
- Analizador automático

Condiciones de reaccion

- Longitud de onda: 546 nm (520 - 550 nm)
- Temperatura de reacción: 25°C (30°C o 37°C)
- Tiempo de reacción: 5 minutos 30 segundos
- Volumen de muestra: 80 ul
- Volumen final de reacción: 1,28 ml

Procedimiento

En 3 tubos marcados BR (Blanco de Reactivos), BM (Blanco de Muestra/Calibrador/Control) y M (Muestra/Calibrador/Control), colocar:

	BR	BM	M
Reactivo A	1 ml	1,2 ml	1 ml
Agua destilada	80 ul	-	-
Muestra	-	80 ul	80 ul

Mezclar e incubar exactamente 30 segundos. Luego agregar:

Reactivo B	0,2 ml	-	0,2 ml
-------------------	--------	---	--------

Mezclar e incubar 5 minutos. Inmediatamente después, leer en espectrofotómetro a 546 nm (520 - 550 nm), llevando a cero el aparato con el Blanco de Reactivo (BR). Lectura 1 (DO₁): BM (Blanco de Muestra o BC (Blanco de Calibrador). Lectura 2 (DO₂): M (Muestra) o C (Calibrador).

Estabilidad de la mezcla de reaccion final

El color de la reacción es estable durante 30 segundos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese tiempo.

Cálculo de los resultados

Bilirrubina Total (mg/dL) = (DO_{2M} - DO_{1BM}) x f

donde:

$$f = \frac{X^* \text{ mg/dL}}{\text{DO}_{2C} - \text{DO}_{1BC}}$$

(*) concentración de bilirrubina total en **Laborcal**.

Ejemplo:

(Los datos presentados a continuación son ilustrativos)

Muestra

DO₁ Blanco de muestra: 0,048

DO₂ Muestra: 0,247

Absorbancia de la muestra: 0,247 - 0,048 = 0,199

Calibrador

DO₁ Blanco del Calibrador: 0,075

DO₂ Calibrador: 0,166

Absorbancia del Calibrador: 0,166 - 0,075 = 0,091

Si el valor de Bilirrubina total en **Laborcal** es 0,52 mg/dL

$$\text{Factor} = \frac{0,52 \text{ mg/dL}}{0,091} = 5,71$$

Bilirrubina total (mg/dL) = 0,199 x 5,71 = 1,13 mg/dL

Método de control de calidad

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Laborcontrol 1** y **Laborcontrol 2** de Laborlab) con concentraciones conocidas de bilirrubina total, con cada determinación.

Valores de referencia

Bilirrubina total en suero o plasma:

- Adultos: hasta 1,0 mg/dL
- Recién nacidos:

	Nacidos a término	Prematuros
Sangre de cordón	< 2,0 mg/dL	< 2,0 mg/dL
hasta las 24 hs	1,4 - 8,7 mg/dL	< 8,0 mg/dL
hasta las 48 hs	3,4 - 11,5 mg/dL	< 12,0 mg/dL
del 3º al 5º día	1,5 - 12,0 mg/dL	< 16,0 mg/dL

Los valores comienzan luego a disminuir para alcanzar el nivel promedio del adulto al mes del nacimiento.

En los prematuros, los niveles tardan más en alcanzar la normalidad, dependiendo del grado de inmadurez hepática.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Conversión de unidades al sistema SI

Bilirrubina (umol/l) = Bilirrubina (mg/dL) x 0,171

Limitaciones del procedimiento

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

La acción de la luz, tanto sobre las muestras como sobre las soluciones standard, es capaz de destruir en una hora hasta el 50% de la bilirrubina presente.

Performance

a) Reproducibilidad: se aplicó el protocolo EP15-A del CLSI. Se analizaron tres niveles de concentración, cada uno por cuadruplicado durante 5 días. Con los datos obtenidos, se calcularon la precisión intraensayo y total.

Precisión intraensayo (n = 20)

Nivel	D.S.	C.V.
0,85 mg/dL	± 0,028 mg/dL	3,29 %
4,61 mg/dL	± 0,031 mg/dL	0,67 %
16,45 mg/dL	± 0,121 mg/dL	0,74 %

Precisión total (n = 20)

Nivel	D.S.	C.V.
0,85 mg/dL	± 0,030 mg/dL	3,53 %
4,61 mg/dL	± 0,077 mg/dL	1,67 %
16,45 mg/dL	± 0,315 mg/dL	1,92 %

b) Linealidad: la reacción es lineal hasta 25 mg/dL de bilirrubina. Para valores superiores, repetir la determinación empleando muestra diluida 1:2 ó 1:4 con solución fisiológica, multiplicando el resultado obtenido por 2 ó 4 según el caso.

c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. En espectrofotómetros con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor, para un ΔA de 0,001 el mínimo cambio de concentración detectable será de 0,031 mg/dL.

Parámetros para analizadores automáticos

Para las instrucciones de programación consulte el manual del usuario del analizador en uso. Para la calibración, debe usarse **Laborcal** de Laborlab.

Presentación

1 x 80 mL **Reactivo A**

1 x 16 mL **Reactivo B**

(Cód. 1770040)

Bibliografía

- Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. - Tietz Fundamentals of Clin. Chem. 5th Ed.: 966, 2001.
- Weigl, E.; Bach, H.; Krieg, D. - Med. Klin. 70/15:664 (1975).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCPress, 5th ed., 2000.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) - Protocols EP 15A, 2001 / EP 17A, 2004.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Saunders Co., 3rd ed. (2001).

SIMBOLOS



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución



Contenido



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Cáustico



Irritante



Consultar instrucciones de uso



Calibrador



Control



Control Positivo



Control Negativo



Número de catálogo



Produtos para Laboratórios Ltda.
Estrada do Capão Bonito, 489
Guarulhos - SP - Brasil - CEP: 07263-010
CNPJ: 72.807.043/0001-94
Atendimento ao cliente:
+55 (11) 2480 0529/+55 (11) 2499 1277
sac@laborlab.com.br
www.laborlab.com.br