

REF 10207-4 4 x 29 mL / 8 mL

BILIRRUBINA TOTAL (TBIL)

Os frascos em forma de cunha contêm volumes úteis de 29 mL do reagente R1 e 8 mL do reagente R2.

INDICAÇÃO DE USO

O reagente para TBIL EasyRA é destinado à medição quantitativa da bilirrubina total no soro ou plasma humano de adultos, usando o Analisador Químico Clínico EasyRA® MEDICA. As medições de bilirrubina são utilizadas para diagnóstico e tratamento de distúrbios hepáticos, hemolíticos, hematológicos e metabólicos, incluindo hepatite e obstruções da vesícula biliar.

Para uso somente em diagnósticos *in vitro*. Somente para uso profissional.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

A bilirrubina é um pigmento formado a partir da hemoglobina e está presente no soro como resultado da destruição de células vermelhas. Níveis elevados de bilirrubina podem resultar de processos hemolíticos, doenças do fígado ou distúrbios do trato biliar. A bilirrubina existe em duas formas: não conjugada (indireta) e conjugada (direta). A bilirrubina não conjugada é transportada para o fígado, onde é ligada pela albumina e se torna conjugada (direta) ao ácido glucurônico, que é eventualmente excretado. A bilirrubina não conjugada não é solúvel em solução aquosa e sua solubilização requer alcoóis e outros solventes. As análises envolvendo esses tipos de solventes informam a quantidade total de bilirrubina. Conjugados de bilirrubina mono ou diglucuronídeos são solúveis em água, e análises desses tipos medem a bilirrubina direta. O método tradicional envolve a reação da bilirrubina com um diazorreagente (por exemplo, sal de 2,4-diclorofenildiazônio) para formar o composto colorido azobilirrubina. Vários aditivos como etanol,¹ cafeína² e DMSO³ foram adicionados para acelerar a reação e a formação do composto azobilirrubina. Também foram adicionados tensoativos como agentes solubilizantes.⁴

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

Este método de reação de endpoint mede a bilirrubina total (conjugada e não conjugada) que se liga ao sal de 2,4-diclorofenildiazônio na presença do tensoativo para formar azobilirrubina.



O aumento na absorbância a 550 nm é diretamente proporcional à concentração de Bilirrubina Total na amostra.

REAGENTES

Reagente para TBIL (R1):

NaCl	154 mmol/L
HCL	190 mmol/L
Tensoativos e conservantes	

Reagente para TBIL (R2):

HCL	417 mmol/L
Sal 2,4-diclorofenildiazônio	5 mmol/L

Tensoativo

Precauções

1. As boas práticas de segurança em laboratórios devem ser seguidas para o manuseio de qualquer reagente (CLSI, GP17-A2).
2. Os reagentes (R1 e R2) são soluções ácidas. NÃO inalar ou ingerir e evitar contato com a pele e com os olhos. Em caso de contato com os olhos, lave imediatamente com bastante água e procure ajuda médica. Em caso de contato com a pele, lave imediatamente com água por 10 minutos. Em caso de ingestão, procure ajuda médica imediatamente. Consulte a Folha de Informações sobre Segurança de para informações sobre riscos e medidas de segurança.
3. Como para qualquer procedimento de teste de diagnóstico, os resultados devem ser interpretados considerando-se os resultados de outros testes e o estado clínico do paciente.
4. Não utilize cubetas lavadas.

INSTRUÇÕES DE MANUSEIO, ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DO REAGENTE

O reagente é fornecido pronto para o uso. O reagente permanecerá estável em frasco fechado até a data de validade informada no rótulo desde que armazenado a 2 – 8 °C. O reagente permanece estável a bordo na área refrigerada de reagentes do Analisador EasyRA pelo número de dias programado no chip RFID encontrado no frasco. Não utilize o reagente se estiver turvo ou opaco ou se os valores conhecidos para controle de soro não forem obtidos.

COLETA E ARMAZENAGEM/ESTABILIDADE DA AMOSTRA

Soro ou plasma não hemolisados e límpidos devem ser utilizados. Proteja as amostras da luz solar ou artificial, pois a bilirrubina direta (não conjugada) é instável.⁵ Essa análise deve ser realizada até 2 horas após a coleta, pois a bilirrubina é instável na amostra. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro do tempo determinado, armazene-as por até 3 dias a 2 – 8 °C.⁶ As amostras também podem ser armazenadas por 3 meses a -70 °C. Tubos revestidos com heparina de lítio podem ser usados para coleta de plasma.

PROCEDIMENTO

Materiais Fornecidos

Frasco de Reagente para TBIL Medica, REF 10207

Materiais adicionais necessários

Calibrador EasyCal Medica para Química, REF 10651

Controle de Qualidade EasyCQ® Medica – Nível A – Química/Eletrólitos, REF 10793

Controle de Qualidade EasyCQ Medica – Nível B – Química/Eletrólitos, REF 10794

Frasco de Corante Medica para Teste de Precisão, REF 10764

Frasco de Solução de Limpeza Medica – Química e ISE, REF 10660 ou

Frasco de Solução de Limpeza Medica – Química, REF 10661

Instruções de Uso

O reagente é fornecido pronto para o uso. Remova a tampa e coloque o reagente na bandeja do Analisador EasyRA, localizada na área refrigerada reservada para reagentes. O reagente aberto permanece estável na área para reagentes refrigerada do Analisador EasyRA pelo número de dias programado no chip RFID do frasco do reagente (28 dias no máximo) ou quando removido e armazenado refrigerado a 2 – 8 °C (tampado) depois de aberto.

Observação: Após remover a tampa e colocar o frasco no analisador, verifique se há espuma no interior dos gargalos do frasco. Se houver espuma, remova com um swab ou com uma pipeta descartável antes de executar o teste. Utilize swabs ou pipetas descartáveis separadas para R1 e R2.

Calibração

O produto EasyCal Medica para Química (REF 10651) é recomendado para calibração deste tipo de análise. O intervalo de calibração (7 dias no máximo) encontra-se programado no chip RFID do frasco do reagente. A recalibração é necessária quando houver mudança do número de lote de reagente ou alteração dos valores de controle de qualidade.

Controle de Qualidade

Recomenda-se a execução de dois níveis (normal e anormal) de controle baseado em soro humano (junto com a análise, sempre que forem executados testes com pacientes) e a cada troca de lote de reagente. A não obtenção de valores dentro do intervalo adequado a partir da análise do material de controle pode indicar deterioração do reagente, mau funcionamento do instrumento ou erros de procedimento. O laboratório deve seguir as diretrizes municipais, estaduais e federais de controle de qualidade ao usar materiais de controle de qualidade.

Resultados

Após concluir a análise, o Analisador Químico EasyRA Medica calcula a concentração de Bilirrubina Total a partir da razão entre a absorbância corrigida da amostra desconhecida e a absorbância corrigida do calibrador, multiplicada pelo valor do calibrador.

$$TBIL \text{ (mg/dL)} = \frac{[(A_{U_{550}} - A_{U_{600}}) - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}})] - [(A_{U_{550}} - A_{U_{600}})_{S_{BIK}} - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}})_{S_{BIK}}] \times dF}{[(A_{C_{550}} - A_{C_{600}}) - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}})] - [(A_{C_{550}} - A_{C_{600}})_{S_{BIK}} - (A_{R_{BIK_{550}}} - A_{R_{BIK_{600}}})_{S_{BIK}}] \times dF} \times \text{Valor Cal}$$

Em que A_U e A_C são os valores de absorbância da amostra desconhecida e do calibrador, respectivamente; $A_{R_{BIK}}$ é a absorbância do branco de reagente; S_{BIK} é o branco de amostra; e “Valor Cal” é a concentração de Bilirrubina Total no calibrador (mg/dL). Quando o volume da reação for alterado pela adição retardada do reagente R2, um fator de correção de diluição (dF) deverá ser incluído no cálculo.

O branco de amostra será corrigido para a diferença de fator de diluição introduzida pelo uso de R1 em relação a (R1 e R2) utilizando-se:

$$df = \frac{\text{Vol Reag}_1 + \text{Vol. Dil.} + \text{Vol. Amostra}}{\text{Volume Total}}$$

Valores Esperados¹⁰

O intervalo de referência para TBIL em soro é o seguinte:

Adultos: 0,2 – 1,0 mg/dL

Esses valores são orientativos. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de valores normais, considerando-se as diferenças entre os instrumentos, as instalações laboratoriais e as populações locais.

Limitações do Procedimento (por exemplo, amostra ultrapassa o intervalo do exame)

Devem ser usadas apenas amostras de soro ou plasma não hemolisados. Este teste não foi avaliado em recém-nascidos.

O Analisador EasyRA sinaliza qualquer resultado acima de 20 mg/dL como Linearidade Alta "LH". Se o ícone de novo teste for selecionado pelo operador, a amostra poderá ser testada novamente usando metade (1/2) do volume da amostra. Os resultados do novo teste são calculados para refletir o uso de um volume menor da amostra. Isso deve estender o intervalo reportável do teste de TBIL até 40 mg/dL.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO⁹

Intervalo reportável

O intervalo reportável é de 0,08 a 20 mg/dL. O intervalo estendido vai de 0,08 a 40 mg/dL quando metade da amostra é usada (diluição 1:1).

Inexatidão/Correlação (CLSI, EP9-A2)

A tabela a seguir lista os dados obtidos em uma comparação do desempenho do Reagente para TBIL Medica (y) no Analisador EasyRA com o desempenho de um reagente para TBIL similar (x) no Analisador COBAS MIRA* da Roche. Os dados mostrados abaixo representam determinações avulsas do Analisador EasyRA em comparação com a média entre dois valores replicados obtidos no Analisador COBAS MIRA da Roche.

Número de Amostras	65	Intervalo de amostras	0,05 a 19,8 mg/dL
Declive	1,0043	Intercepta y	-0,1966
Coefficiente de Correlação	0,9957	Equação de regressão:	$Y = 1,0043 \cdot X - 0,1966$

*Cobas Mira é marca comercial registrada da Roche Diagnostics Operations, Inc, Indianapolis, IN

A tabela a seguir lista os dados obtidos em uma comparação de amostras de soro (x) e plasma (y) correspondentes usando o Reagente Medica para TBIL no Analisador EasyRA. Os dados abaixo representam uma única determinação de plasma em comparação com a média de dois valores de soro replicados.

Número de amostras	62	Intervalo de amostras	0,17 a 16,78 mg/dL
Declive	0,9952	Intercepta y	-0,0079
Correlação	0,9998	Equação de regressão	$Y = 0,9952 \cdot X - 0,0079$

Imprecisão (CLSI, EP5-A2)

Medições duplicadas de cada um dos três níveis do material de CQ foram testadas duas vezes ao dia, por 20 dias. Tanto a precisão durante a rodada quanto a precisão total foram determinadas a partir desses dados.

Imprecisão em uma mesma rodada:

Nível de CQ mg/dL	SD na Rodada mg/dL	CV na Rodada %
3,36	0,02	0,67
1,66	0,02	1,13
0,44	0,01	2,64

Imprecisão Total:

Nível de CQ mg/dL	SD de Imprecisão Total mg/dL	CV de Imprecisão Total %
3,36	0,05	1,35
1,66	0,03	2,09
0,44	0,02	3,81

Linearidade (CLSI, EP6-A)⁹

Linear de 0,048 a 20 mg/dL, com base na regressão linear $Y = 0,98 \cdot X + 0,0921$.

Limite de branco (LOB):	0,04 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Limite de detecção (LOD):	0,06 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Limite de quantificação (LoQ):	0,05 mg/dL	(CLSI, EP17-A)

Substâncias Interferentes (CLSI, EP7-A)

Interferência de até 10% foi classificada como “nenhuma interferência significativa”.

Há interferência significativa em níveis de hemoglobina acima de 125 mg/dL.

Pode haver interferência considerável de triglicérides. Não utilize amostras lipêmicas.

O corante indocianina verde interfere de forma significativamente positiva nos resultados.

Amostras contendo níveis elevados de imunoglobulina M (IgM) ou amostras de pacientes com macroglobulinemia de Waldenstrom podem gerar resultados não confiáveis.

Young fornece uma lista de medicamentos e outras substâncias que podem interferir em testes clínicos químicos.⁷

Referências

1. Malloy H.T. and Evelyn, K.A., *The Determination of Bilirubin with the Photoelectro Colorimeter.*, J.Biol. Chem 119:481-490 (1973).
2. Jendrassik, L and Grof, P. *Vereinfachte, Photometrische Methoden zur Bestimmung des Bilirubins*, Biochem. Z. 297: 81-89 (1938).
3. Walters, M. and Gerarde, H. *An Ultramicro method for the Determination of Conjugated and Total Bilirubin in Serum or Plasma*. Microchem. J. 15:231-243 (1970).
4. Winsten, J. and Cehelyk, B., *A Rapid Micro Diazo Technique for Measuring Total Bilirubin.*, Clin. Chem. Acta 25: 441-446 (1969).
5. Henry, R.J. *Clinical Chemistry, Principles and Techniques*, Hagerstown, MD: Harper and Row, Publishers 1974:1058.
6. Tietz NW. *Textbook of Clinical Chemistry*, WB Saunders and Co., Philadelphia, PA, 1986: p1388.
7. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4th ed. Washington, DC: AACC Press; 1995.
8. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC. AACC Press; 1997.
9. Dados arquivados na Medica.
10. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
11. NCCLS EP9-P
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, *User Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices* (NCCLS) Document EP5-T2 (ISBN 1-56238-145-8), 1992.

Parâmetros de Análise do EasyRA (TBIL)

Comprimento de Onda Primário (nm)	550
Comprimento de Onda Secundário (nm)	600
Tipo de Reação	Endpoint (2)
Direção de Reação	Crescente
Branco de Reagente	Sim (com cada calibração)
Branco de Amostra	Sim
Tempo de Reação	5,6 min
Intervalo de calibração (máximo)	7 dias
Estabilidade a bordo do reagente	28 dias

Soro/plasma

Volume de amostra (µl)	8,0
Volume de diluente 1(µl)	15
Volume de diluente 2(µl)	15
Volume do reagente R1 (µl)	150
Volume do reagente R2 (µl)	38
Casas Decimais (valores padrão)	2
Unidades (valores padrão)	mg/dL
Fator de Diluição	1:1 (para extensão do intervalo de medição)
Linearidade	0,08 a 20 mg/dL