

REF 10212-4 4 x 29 mL / 8 mL

BILIRRUBINA DIRETA (DBIL)

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 DBIL EasyRA é destinado à determinação quantitativa da bilirrubina direta no soro e plasma humanos 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 padrão descrito por Ehrlich¹ envolve a reação da bilirrubina com um diazorreagente (ex: ácido sulfanílico diazotado) para formar o composto colorido azobilirrubina. Essa análise mede a bilirrubina direta (conjugada) com base em sua combinação com um sal de diazônio na presença de ácido sulfâmico para formar azobilirrubina.

PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

Esta reação de endpoint baseia-se no uso do sal 2,4-diclorofenildiazônio como diazo-reagente:

Bilirrubina direta + 2,4-diclorofenildiazônio → Sal de azobilirrubina

A bilirrubina direta (conjugada) liga-se ao diazo-reagente e forma azobilirrubina. O aumento da absorbância medida a 550 nm é proporcional à concentração de bilirrubina direta.

REAGENTES

Reagente para DBIL (R1):

EDTA-Na ₂	0,1 mmol/L
NaCl	154 mmol/L
Ácido sulfâmico	100 mmol/L

Reagente para DBIL (R2):

Sal 2,4-diclorofenildiazônio	5 mmol/L
HCL	0,9 mol/L
EDTA-Na ₂	0,13 mmol/L

Precauções

1. As boas práticas de segurança em laboratórios devem ser seguidas para o manuseio de qualquer reagente (CLSI, GP17-A2).
2. 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 Ficha de Informações sobre Segurança 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.² 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 °C³. 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 DBIL Medica, REF 10212

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 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 (30 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 EasyRA, 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 (30 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 a conclusão da análise, o Analisador EasyRA calcula a concentração de bilirrubina direta a partir da razão entre a absorbância corrigida (subtraindo-se a absorbância do branco de reagente e do branco de amostra) da amostra e a absorbância paralelamente corrigida do calibrador (após a subtração da absorbância do branco de reagente e do branco de amostra), multiplicada pela concentração do calibrador.

$$\text{DBIL (mg/dL)} = \frac{[(A_{U550} - A_{U700}) - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})] - [(A_{U550} - A_{U700})_{SBIK} - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})_{SBIK}] \times dF}{[(A_{C550} - A_{C700}) - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})] - [(A_{C550} - A_{C700})_{SBIK} - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})_{SBIK}] \times dF} \times \text{CalValue}$$

Em que A_U é a absorbância da amostra desconhecida, A_{RBIK} é a absorbância do branco de reagente associada à amostra desconhecida, $SBIK$ é a absorbância do branco de reagente associado à amostra desconhecida. Todas as absorbâncias com “C” subscrito são associadas ao calibrador. A adição com retardo do reagente R2 causa a necessidade de um fator de correção de diluição (dF) a ser incluído no cálculo.

Valores Esperados³

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

Adultos: 0,0-0,20 mg/dL (0,0-3,4 µmol/L)

Estes valores são orientativos. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de valores esperados, 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 10 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 estenderá o intervalo reportável do teste de DBIL até 20 mg/dL.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ⁴**Intervalo reportável**

O intervalo reportável é de 0,06 a 10 mg/dL. O intervalo estendido vai de 0,06 a 20 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 DBIL Medica (y) no Analisador EasyRA utilizando um comprimento de onda primário de 550 nm e um comprimento de onda secundário de 700nm com o desempenho do mesmo reagente para DBIL (x) no Analisador EasyRA utilizando um comprimento de onda primário de 550 nm, apenas. Os dados mostrados abaixo representam determinações avulsas do Analisador EasyRA em comparação com a média entre dois valores replicados obtidos no Analisador EasyRA.

Número de amostras	53	Intervalo de amostras	0,06 a 9,50 mg/dL
Declive	1,0376	Intercepta y	0,0456
Coefficiente de Correlação	0,9986	Equação de regressão	$Y = 1,0376 \cdot X - 0,0456$

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 DBIL 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	52	Intervalo de amostras	0,07 a 9,95 mg/dL
Declive	1,0064	Intercepta y	0,01
Correlação	0,9992	Equação de regressão	$Y = 1,0064 \cdot X - 0,01$

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 %
2,47	0,04	1,59
1,31	0,02	1,83
0,20	0,01	5,49

Imprecisão Total:

Nível de CQ mg/dL	SD de Imprecisão Total mg/dL	CV de Imprecisão Total %
2,47	0,05	2,09
1,31	0,02	1,87
0,20	0,01	6,93

Linearidade (CLSI, EP6-A)

Linear de 0,06 a 10 mg/dL, com base na regressão linear $Y = 0,98 \cdot X + 0,0365$.

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 negativa considerável de hemoglobina. Devem ser usadas **apenas** amostras de soro ou plasma não hemolisados.

Para DBIL de 2,55 mg/dL, nenhuma interferência significativa foi observada em níveis de até 460 mg/dL de triglicérides (utilizando-se Intralipid®). A Medica recomenda que amostras visivelmente turvas não sejam usadas. 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.

*Intralipid é marca registrada de Pharmacia AB, Clayton, NC.

Young fornece uma lista de medicamentos e outras substâncias que podem interferir em testes clínicos químicos.^{5, 6}

REFERÊNCIAS

1. Ehrlich, P., *Sulfadiazobenzol, ein Reagens auf Bilirubin*. Centr. Klin. Med. 4; 721-723 (1883).
2. Gordon, E.R., *The Conjugate of Bilirubin*. *Hepatology* (NY) 2: 19 (1975).
3. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
4. Dados arquivados na Medica.
5. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4th ed. Washington, DC: AACC Press; 1995.
6. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC: AACC Press; 1997.

Parâmetros de Análise do EasyRA (DBIL)

Comprimento de Onda primário (nm)	550
Comprimento de Onda secundário (nm)	700
Tipo de Reação	Endpoint (2)
Direção de Reação	Crescente
Branco de Reagente	Sim (com cada calibração)
Branco de Amostra	Sim
Tempo de Reação	4,5 min
Intervalo de calibração (máximo)	28 dias
Estabilidade a bordo do reagente	30 dias

Soro/plasma

Volume de amostra (µl)	10,0
Volume do diluente 1 (µl)	10
Volume do diluente 2 (µl)	10
Volume do reagente R1 (µl)	160
Volume do reagente R2 (µl)	40
Casas Decimais (padrão)	2
Unidades (valores padrão)	mg/dL
Fator de Diluição	1:1(para extensão do intervalo de medição)
Linearidade	0,06 a 10 mg/dL

