

## Utilização prevista

Para a determinação quantitativa da bilirrubina direta no soro utilizando o analisador Yumizen C560. **Rx Only.**

## História dos métodos

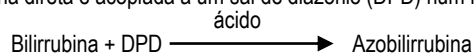
Desde a introdução do método diazo para a determinação da bilirrubina por Ehrlich em 1883,<sup>1</sup> foram propostas várias modificações com o objetivo de melhorar a reação. O método de Malloy e Evelyn<sup>2</sup> utiliza o metanol para catalisar a reação de azo-acoplamento da bilirrubina indireta, assim como para manter a azobilirrubina na solução. Uma desvantagem substancial deste método reside no facto de a proteína poder ser precipitada pela solução de metanol, produzindo resultados erradamente reduzidos.

Em 1938, Jendrassik e Grof<sup>3</sup> apresentaram um ensaio que obteve resultados fiáveis. Porém, o método é complexo e envolve várias fases de pipetagem.

O método aqui apresentado foi desenvolvido por Wahlefeld et al.<sup>4</sup> O reagente diazo é o 2,5-diclorofenildiazólio tetrafluoroborato (DPD), que reage muito rapidamente quando acoplado à bilirrubina em condições ácidas. O procedimento resultante é simples, ainda assim apresenta uma boa correlação quando comparado com o método de Jendrassik e Grof.

## Princípio

A bilirrubina direta é acoplada a um sal de diazónio (DPD) num meio fortemente ácido (pH 1 – 2).



A intensidade da cor da azobilirrubina produzida é proporcional à concentração de bilirrubina direta e pode ser medida fotometricamente.

## Reagentes

Reagente de bilirrubina direta R1: tampão de ácido 50 mmol/L, Reagente de bilirrubina direta R2: tampão de ácido >30 mmol/L, >2,0 mmol/L DPD e estabilizadores

## Precauções e perigos

- Os reagentes são tóxicos e corrosivos. Não utilize a pipeta com a boca. Evite o contacto com a pele e a roupa.
- Este reagente destina-se apenas a diagnóstico *in vitro*.

### Perigos:

**R1 e R2:** Classificações de perigo: Corrosão/irritação cutânea (Categoria 1), Lesão ocular/irritação ocular grave (Categoria 1)

**Advertências de perigo:** H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves, H318: Provoca irritação ocular grave

**Recomendações de prudência:** P260: Não respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. P264: Lavar a pele cuidadosamente após

manuseamento. P280: Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. **Resposta:** P310: Contacte imediatamente um

CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico. P363: O vestuário contaminado deve ser lavado antes da sua reutilização. P301+P330+P331: EM

CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito. P303+P361+P353: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou cabelo): Retirar

imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a PELE com água [ou tomar um duche]. P304+P340: EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa

para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. 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. Continue a enxaguar.

**Armazenamento:** P404: Armazenar em recipiente fechado. **Eliminação:** P501: Eliminar o conteúdo no sistema de esgoto após diluir com água

abundante, se em conformidade com os regulamentos locais. **Consulte a Ficha de Dados de Segurança deste produto (SDS-HB936), disponível através do número de telefone 1-734-487-8300.**



Palavra-sinal: Perigo

## Preparação dos reagentes

Os reagentes são fornecidos prontos a utilizar.

## Armazenamento e estabilidade dos reagentes

- Os reagentes embalados podem ser armazenados a 2-8°C. O reagente mantém-se estável até à data de validade apresentada no rótulo, quando armazenado conforme as instruções.
- Estudos do fabricante demonstraram que o reagente mantém-se estável durante 30 dias uma vez colocado no carrossel de reagentes refrigerados (2-10°C), no entanto, a estabilidade dos reagentes pode variar com base nas condições laboratoriais individuais.
- Não congele os reagentes.
- Evite a exposição à luz solar direta.

## Deterioração dos reagentes

- Não utilize os reagentes se apresentarem sinais de contaminação microbiana (turvação).
- O reagente pode ser utilizado se o R2 desenvolver uma precipitação muito ligeira que se dissolve novamente quando o R2 é suavemente aquecido.
- O reagente R2 que contenha um precipitado que não se dissolve novamente e que resulta na descoloração do produto não deve ser utilizado.
- Não utilize se o reagente não alcançar os valores de ensaio atribuídos dos soros frescos de controlo.

## Colheita e armazenamento de amostras

- Recomenda-se a utilização de soro fresco e não hemolisado.<sup>5</sup>
- As amostras devem ser analisadas dentro de duas horas após a colheita, se mantidas à temperatura ambiente num local escuro, e dentro de doze horas, se mantidas refrigeradas (2-8°C) e protegidas da luz.<sup>6</sup>
- A bilirrubina no soro mantém-se estável durante três meses quando armazenada congelada (-20°C) e protegida da luz.<sup>6</sup>
- A luz solar direta pode causar uma diminuição de até 50% da bilirrubina no prazo de uma hora.<sup>7</sup>
- A colheita de amostras deve ser efetuada de acordo com o NCCLS M29-T2. Nenhum método pode oferecer garantias absolutas de que as amostras de sangue humano não transmitirão infeções. Por conseguinte, todas as amostras de sangue devem ser consideradas potencialmente infecciosas.

## Interferências

- Todos os estudos de interferências foram realizados de acordo com os procedimentos recomendados na diretriz NCCLS N.º EP7-P relativamente aos testes de interferências em química clínica.<sup>8</sup>
- Os níveis de hemoglobina no soro de até 66 mg/dL não interferem nos resultados.
- Os triglicéridos no soro até 500 mg/dL não interferem nos resultados.
- Diversos medicamentos e substâncias afetam os resultados de bilirrubina. Consulte Young, et al.<sup>9</sup>

# Conjunto de Reagentes de Bilirrubina Direta Pointe

## Materiais fornecidos

Reagentes R1 e R2 de bilirrubina direta

## Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Analisador Yumizen C560.
2. Manual de utilização do Yumizen C560.
3. Calibrador de Química, número de catálogo C7506-50
4. Controlo de Química, número de catálogo C7592-100

## Calibração

Utilize o Calibrador de Química Pointe (número de catálogo C7506-50). Siga as instruções de aplicação do instrumento relativamente à calibração. Consulte as instruções manuais do instrumento para obter informações sobre os procedimentos e a frequência de calibração. Recomenda-se que cada laboratório determine a sua própria frequência de calibração. Se os resultados do controlo estiverem fora do intervalo, pode ser necessário calibrar novamente o teste. Em condições de operação típicas, os estudos de estabilidade de calibração do fabricante mostraram que a curva de calibração se mantém estável durante, pelo menos, 14 dias.

## Controlo da qualidade

A validade da reação deve ser monitorizada utilizando os soros de controlo com valores de bilirrubina direta normais e anormais conhecidos. Estes controlos devem ser efetuados, pelo menos, em cada turno de trabalho em que são realizados ensaios de bilirrubina direta. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça a sua própria frequência de determinação de controlo. Os requisitos de controlo de qualidade devem ser executados em conformidade com os requisitos de acreditação e regulamentação local, estatal e/ou federal.

## Valores esperados (Direta)<sup>7,11</sup>

Adultos e crianças (com mais de um mês de idade): 0 – 0,5 mg/dL

Recomenda-se vivamente que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo de valores normais.

## Limitações

1. As amostras com valores superiores a 10 mg/dL devem ser diluídas com solução salina isotónica a 1:1, novamente submetidas a ensaio e a resposta final deve ser multiplicada por dois.
2. Os níveis de hemoglobina no soro de até 66 mg/dL e os triglicéridos até 500 mg/dL não interferem nos resultados.

## Desempenho

1. Intervalo do ensaio: 0,0 - 10,0 mg/dL
2. Comparação: Foi realizado um estudo entre o Yumizen C560 e um analisador semelhante utilizando este método, com os seguintes resultados:

Método	Bilirrubina directa
N	135
Bilirrubina direta média (mg/dL)	1,625
Intervalo (mg/dL)	0,00-9,20
Desvio padrão	2,472
Análise de regressão	$y = 1,097x - 0,065$
Coefficiente de correlação	0,9912

3. Precisão: Foram realizados estudos de precisão utilizando o analisador Yumizen C560 na sequência de uma modificação das diretrizes constantes do documento NCCLS EP5-T2.<sup>10</sup>

Amostra	No mesmo dia			Total		
	LOW	MID	HIGH	LOW	MID	HIGH
N	20	20	20	40	40	40
Média	0,74	5,08	9,80	0,77	5,08	9,79
Desvio padrão	0,05	0,04	0,00	0,04	0,18	0,26
Coefficiente de variação (%)	6,8%	0,8%	0,0%	6,6%	4,8%	2,7%

4. Sensibilidade: Limite de deteção de 2 DP (95% de Conf) = 0,0 mg/dL

## Bibliografia

1. Ehrlich, P., Charite Ann. 8:140(1883).
2. Malloy, H.T., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481 (1937).
3. Jendrassik, L., Grof, P., Biochem. Zeitschr. 297:81 (1938).
4. Wahlefeld AW, et al. Scand J Clin Lab Invest. 29 Supplement 126(1972).
5. Michaelsson, M. Scand. J. Clin. Lab. Invest (Suppl. 49) 13:1 (1961)
6. Martinek, R.G., Clin. Chem. Acta 13:161 (1966).
7. Tietz, N.W. Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, P. 1028 (1976).
8. NCCLS document, "National Evaluation Protocols for Interference Testing", Evaluation Protocol Number 7, Vol. 4, No. 8, (June 1984).
9. Young, D.S., Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests, Washington DC, AACC Press, (1997)
10. NCCLS document, "Evaluations of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2<sup>nd</sup> Ed. (1992)
11. Gambino, S.R., et al, Bilirubin Assay (Revised), Commission on Continuing Education, Am. Soc. of Clin. Path., Chicago, (1968).

**PARÂMETROS DE QUÍMICA**

Quím:	BILD	N.º:	205	Tipo de amostra:	Soro
Química:	Bilirrubina direta			Nome em letra de imprensa:	BILD
Tipo de reação:	Critério de avaliação			Direção de reação:	Positiva
Onda pri:	546			Onda sec:	660
Unidade:	mg/dL			Decimal	0,1
Tempo de branco:	47      49			Tempo de reação:	80      82
	Vol. amostra	Aspirado	Diluyente	Vol. reagente	Diluyente
Padrão:	2,7 uL	--- uL	--- uL	R1:	120 uL    --- uL
Diminuído:	--- uL	--- uL	--- uL	R2:	31 uL     -- uL
Aumentado:	--- uL	--- uL	--- uL	R3:	--- uL    -- uL
	<input type="checkbox"/> Branco da amostra	<input checked="" type="checkbox"/> Repetição automática		R4:	--- uL    --- uL
<b><u>Ajuste de declive/desvio</u></b>					
Declive: 1		Desvio: 0			

Intervalo de linearidade (padrão)	0	10	Limite de linearidade:
Intervalo de linearidade (diminuído)	---	---	Redução de substrato:
Intervalo de linearidade (aumentado)	---	---	Abs de branco misturado:
Abs de branco R1:	---	---	Tempo para destapar
Resposta de branco:	---	---	Limite de alarme do reagente:
Química dupla:			<input type="checkbox"/> Extensão linear da enzima
<input type="checkbox"/> Verificação prozona	<input type="radio"/> Verificação de taxa	<input type="radio"/> Adição de antígeno	
Q1:	Q2:	Q3:	Q4:
PC:	ABS:		

# Conjunto de Reagentes de Bilirrubina Direta Pointe

## PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO

### Definição do calibrador

Calibrador: \* N.º do lote: \*  
Data de validade: \*

### Carrossel Pos

Carrossel de amostras 1 \*  
Carrossel de amostras 2  
Carrossel de amostras 3

### Reagente/Calibração

Calibrador	Pos	N.º do lote	Data de validade	Quím	Conc	Unidade
Água	A	*	*	BILD	0	mg/dL
Calibrador de Química	*	*	*	BILD	*	mg/dL

### Configuração da calibração

Quím: BILD

### Definições da calibração

Modelo matemático: Linear de dois pontos

Fator: Réplicas: 2

### Limites de aceitação

Tempo cal: 336 Hora  
Dif declive: --- DP: ---  
Sensibilidade: --- Repetibilidade: ---  
Deter coef: ---

### Calib. auto.

Frasco trocado  Lote trocado  Tempo cal

Recomenda-se que dois níveis de material de controlo sejam submetidos a ensaio diariamente. \* Indica parâmetros definidos pelo utilizador.

**REF** 14-HB936-200



Fabricado por  
HORIBA Instruments Incorporated-Pointe Brand  
5449 Research Drive Canton, MI 48188



### Certificada para executar reagentes

Os reagentes Pointe são certificados para serem fabricados de acordo com parâmetros especificados. Qualquer produto de reagente Pointe que não cumpra as especificações até à data de validade indicada será regularizado imediatamente sem quaisquer custos.

Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Representante Europeu Autorizado:

Obelis s.a.

Boulevard Général Wahis 53

1030 Brussels, BÉLGICA

Tel.: (32)2.732.59.54 Fax: (32)2.732.60.03 e-mail: mail@obelis.net



### Legenda dos símbolos

Utilizar até (AAAA-MM-DD)	<b>LOT</b> Lote e código	<b>REF</b> Número de catálogo
Fabricante	Limite de temperatura	Consulte as instruções de utilização
<b>IVD</b> Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	<b>Rx Only:</b> Utilização apenas mediante receita médica	