

Utilização prevista

Para a determinação quantitativa de bilirrubina direta no soro utilizando os analisadores Yumizen C230 e Yumizen C240. Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*. **Rx Only**.

História dos métodos

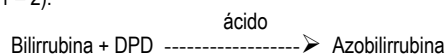
Desde a introdução do método diazo para a determinação da bilirrubina por Ehrlich em 1883,¹ foram propostas várias modificações com o objetivo de melhorar a reação. O método de Malloy e Evelyn² utiliza o metanol para catalisar a reação de azo-acoplamento da bilirrubina indireta, assim como para manter 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 Grof³ 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.⁴ O reagente diazo é o 2,5-diclorofenil diazónio 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

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

Precauções

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

Preparação dos reagentes

Os reagentes são fornecidos prontos a utilizar.

Armazenamento dos reagentes

1. 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.
2. Não congele os reagentes.
3. Evite a exposição à luz solar direta.

Deterioração dos reagentes

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

Colheita e armazenamento de amostras

1. Recomenda-se a utilização de soro fresco e não hemolisado.⁵
2. 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.⁶
3. A bilirrubina no soro mantém-se estável durante três meses quando armazenada congelada (-20°C) e protegida da luz.⁶
4. A luz solar direta pode causar uma diminuição de até 50% da bilirrubina no prazo de uma hora.⁷

5. 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

1. 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.⁸
2. Os níveis de hemoglobina no soro de até 100 mg/dL não interferem nos resultados.
3. Os triglicéridos no soro até 500 mg/dL não interferem nos resultados.
4. Diversos medicamentos e substâncias afetam os resultados de bilirrubina. Consulte Young, et al.⁹

Materiais fornecidos

Reagentes R1 e R2 de bilirrubina direta

Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Analisador Yumizen C230/Yumizen C240.
2. Manual de utilização do Yumizen C230/Yumizen C240.
3. Calibrador de Química Pointe, número de catálogo C7506-50
4. Controlo de Química Pointe, número de catálogo C7592-100

Parâmetros de teste

Teste:	DBIL	Química: Bilirrubina directa
N.º de química:	205	Nome em letra de imprensa: Bilirrubina directa
Tipo de reação:	Endpoint	Direção de reação: Positiva
Onda pri.:	546 nm	Onda Onda 670 nm
Decimal:	0,1	Tipo de amostra: Soro
Tempo de branco:	-2 -1	Tempo de reação: 3 4
Unidade:	mg/dL	Tempo de incubação: 3

	Vol. de amostra	Aspirado	Diluído	Vol. de reagente	Diluído
Padrão;	4	uL	uL	180	uL uL
Diminuído;		uL	uL	47	
Aumentado;		uL	uL	uL	

Intervalo de linearidade (padrão): 0.1-10	Limite de linearidade:
Intervalo de linearidade (diminuído):	Redução de substrato:
Intervalo de linearidade (aumentado):	Abs. de branco misturado: - 40000 40000
Abs. de branco R1: - 40000 40000	Estabilidade no equipamento: 30 Dia(s)
Resposta de branco - 40000 40000	Limite de alarme do reagente: 5
Química dupla:	

Verificação prozona:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Utilizar resultado qualitativo:	
Intervalo:	Referência:

Desvio de declive:			
Declive	Desvio	Unidade	
1	0	mg/dL	

Conjunto de Reagentes de Bilirrubina Direta Pointe

Pré-tratamento:

Vol. de amostra pré-tratada: uL Vol. de reagente pré-tratado: uL

Intervalo de ref.:

Tipo de amostra: Sexo: Intervalo de idades: Intervalo de ref.: Intervalo crítico: Unidade:

Parâmetros de configuração da calibração

Quím: Bili D.

Definição da calibração

Modelo matemático: Linear de dois pontos

Fator: Réplicas: 2

Limites de aceitação

Tempo cal: 336 h

Dif declive: DP:

Sensibilidade: Repetibilidade: * Definida pelo utilizador

Deter coef:

Calib. auto.

Tempo cal

Calibrador	Conc.	Pos	N.º do lote
Água	0,0	W	
Cal Quím	*	*	

Calibração

Utilize um calibrador de soro rastreável ao NIST. 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.

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.

Cálculos (exemplo)

Abs. = Absorvância

Des. = Desconhecido

Cal. = Calibrador

$Abs. Des. - Abs. Des. Branco \times Conc. of Cal. (mg/dL) = Bilirrubina\ direta (mg/dL)$

$Abs. Cal. - Abs. Branco Cal.$

Amostra: Se Abs. de Desconhecido = 0,35, Abs. de Branco Desconhecido = 0,01, Abs. de Calibrador 0,25, Abs. de Branco Calibrador = 0,01, Concentração de Calibrador = 4,0 mg/dL

Então: $\frac{0,35 - 0,01}{0,25 - 0,01} \times 4 = \frac{0,34}{0,24} \times 4 = 5,7 \text{ mg/dL}$

Valores esperados (Direta)^{7,11}

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

- 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.
- Os níveis de hemoglobina no soro de até 100 mg/dL e os triglicéridos até 500 mg/dL não interferem nos resultados.

Desempenho

- Linearidade: 10,0 mg/dL
- Limite de deteção (sensibilidade): 0,1 mg/dL
- Comparação: Foi realizado um estudo entre os analisadores da série Yumizen 200 e um analisador semelhante utilizando este método, tendo resultado num coeficiente de correlação de 0,999 com uma equação de regressão de $y=0,985x - 0,12$.

- Precisão: Foram realizados estudos de precisão utilizando analisadores da série Yumizen 200 na sequência de uma modificação das diretrizes constantes do documento NCCLS EP5-T2.¹⁰

No mesmo dia			Entre dias		
Média	D.P.	% C.V.	Média	D.P.	% C.V.
0,48	0,05	10,1	0,39	0,05	12,8
1,92	0,09	4,5	1,91	0,11	5,8

Bibliografia

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

Legenda dos símbolos

Utilizar até (AAAA-MM-DD)	Lote e código
Número de catálogo	Fabricante
Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>	Limite de temperatura
Consulte as instruções de utilização	Rx Only: Utilização apenas mediante receita médica
Marcação CE	Representante autorizado na Comunidade Europeia

12-HB936-156 Fabricado por HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188

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



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.