

BILI-D Liquiform

Instruções de Uso

Ref.: **93**

ANVISA 1009010087

Bilirrubina Direta

Finalidade . Sistema bi-reagente para determinação de bilirrubina direta por reação de ponto final, em amostras de soro e plasma.

Uso profissional.

[Somente para uso diagnóstico *in vitro*.]

Princípio . A amostra é solubilizada em meio ácido e a bilirrubina direta medida por formação de azobilirrubina com dicloroanilina diazotada. A cor formada é proporcional à concentração de bilirrubina direta na amostra.

Características do sistema . Bili-D Liquiform é um conjunto de reagentes que permite um procedimento simples e rápido para determinação da bilirrubina direta em amostras de soro ou plasma. O Reagente 1 contém ácido sulfâmico em concentração otimizada que mantém o pH em valores adequados para minimizar a interferência da bilirrubina indireta, garantindo a especificidade da medição. O Reagente 2 contém dicloroanilina diazotada (DCA), que é um diazo-reagente estável em forma líquida pronta para uso.

Como as metodologias utilizando mono-reagente sofrem interferências da amostra e incrementam a inexatidão dos resultados, a Labtest Diagnóstica desenvolveu uma aplicação bi-reagente com utilização de branco da amostra que aumenta a especificidade metodológica e minimiza a interferência amostral, transferindo excelente exatidão aos resultados.

O sistema Labtest permite que sejam ensaiadas amostras com concentrações de bilirrubina direta até 12 mg/dL minimizando a necessidade de diluição de amostras com concentração elevada.

O desenvolvimento do método foi direcionado para automação, tornando-o facilmente aplicável em analisadores automáticos capazes de medir com exatidão uma reação de ponto final em 546 nm. Entretanto, o sistema Bili-D Liquiform pode ser utilizado com sucesso em aplicações manuais utilizando fotômetros ou instrumentos semiautomáticos.

Metodologia . Labtest DCA

Reagentes

1. **R1** - Reagente 1 - Armazenar entre 2-8 °C.

Contém ácido sulfâmico ≥ 92 mmol/L e estabilizadores.

2. **R2** - Reagente 2 - Armazenar entre 2-8 °C.

Contém ácido clorídrico 680 mmol/L; dicloroanilina diazotada ≤ 995 μ mol/L.

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Os reagentes após abertos (em uso) são estáveis por até 60 dias entre 2 - 8 °C. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes, os quais não devem ser pipetados com a boca. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão a absorvância entre 530 e 550 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.
5. Calibradores da linha Calibra - Labtest.

Amostra

As bilirrubinas conjugada (direta) e não conjugada (indireta) são oxidadas por ação da luz branca ou ultravioleta. Portanto, as amostras de sangue devem ser protegidas da exposição direta à luz artificial ou solar logo após a coleta.

Usar soro ou plasma (Heparina, EDTA). Quando a amostra é protegida da luz, o analito é estável 7 dias entre 4-8 °C e 6 meses a 20 °C negativos. Congelar apenas uma vez.

Amostras hemolisadas fornecem valores falsamente diminuídos na determinação da bilirrubina direta.

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitam infecções, todas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las, devem-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

Concentrações de triglicérides até 1000 mg/dL não produzem interferências significativas.

A presença de hemoglobina (amostra hemolisada), em qualquer concentração, interfere no resultado do teste.

Procedimento

Este procedimento não se aplica aos analisadores semiautomáticos que utilizam unicamente cubeta de fluxo. Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semiautomáticos.

Ver observações 1, 2 e 3.

Tomar 3 cubetas do fotômetro e proceder como a seguir:

	Branco	Teste	Calibrador
Reagente 1	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Amostra	----	0,1 mL	----
Calibrador	----	----	0,1 mL
Água deionizada	0,1 mL	----	----

Homogeneizar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. O nível da água no banho deve ser superior ao nível dos reagentes nos tubos de ensaio. Determinar somente as absorvâncias do teste e calibrador em 546 nm (530 a 550 nm), acertando o zero com água deionizada. Obtém-se a absorvância A_1 .

	Branco	Teste	Calibrador
Reagente 2	0,25 mL	0,25 mL	0,25 mL

Homogeneizar e incubar em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. Determinar as absorvâncias do teste e calibrador em 546 nm (530 a 550 nm), acertando o zero com o branco. Obtém-se a absorvância A_2 . A cor é estável por 30 minutos.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,1 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagentes podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica. Volumes da amostra menores que 0,01 mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos . Ver linearidade.

A leitura A_1 do Teste e do Calibrador deve ser corrigida para o volume final da reação obtendo-se A_{1cor}

$$\text{Teste } A_{1cor} = \text{Teste } A_1 \times 0,81$$

$$\text{Calibrador } A_{1cor} = \text{Calibrador } A_1 \times 0,81$$

Para obter a absorvância final subtrair o valor A_{1cor} da absorvância A_2 do Teste e do Calibrador:

$$\begin{aligned} \text{Absorvância do Teste} &= A_2 - A_{1cor} \\ \text{Absorvância do Calibrador} &= A_2 - A_{1cor} \end{aligned}$$

$$\text{Bilirrubina direta} = \frac{\text{Absorvância do Teste}}{\text{Absorvância do Calibrador}} \times \text{CCal mg/dL}$$

CCal: concentração do calibrador

Exemplo

Teste

$$\begin{aligned} A_1 &= 0,064 & A_{1cor} &= 0,064 \times 0,81 = 0,052 \\ A_2 &= 0,094 \end{aligned}$$

$$\text{Absorvância do Teste: } 0,094 - 0,052 = 0,042$$

Calibrador

$$\begin{aligned} \text{CCal: } 1,93 \text{ mg/dL} \\ A_1 &= 0,105 & A_{1cor} &= 0,105 \times 0,81 = 0,085 \\ A_2 &= 0,170 \end{aligned}$$

$$\text{Absorvância do Calibrador: } 0,170 - 0,085 = 0,085$$

$$\text{Bilirrubina direta} = \frac{0,042}{0,085} \times 1,93 \text{ mg/dL} = 0,95 \text{ mg/dL}$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{FATOR} = \frac{\text{CCal mg/dL}}{\text{Absorvância do Calibrador}}$$

$$\text{Bilirrubina direta (mg/dL)} = \text{Absorvância do Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

$$\text{Fator} = \frac{1,93 \text{ mg/dL}}{0,085} = 22,7 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Bilirrubina direta} = 0,042 \times 22,7 \text{ mg/dL} = 0,95 \text{ mg/dL}$$

Calibração . Usar calibrador Calibra H - Labtest.

Calibrações manuais

Obter o fator de calibração ao usar novo lote de reagentes ou quando o controle interno da qualidade indicar.

Sistemas automáticos

Branco de reagentes: água deionizada ou solução de cloreto de sódio 150mmol/L (0,85 %);

Usar calibrador Calibra H - Labtest.

Intervalo de calibrações

Calibração de 2 pontos ao mudar de lote;

Calibração de 2 pontos quando o controle interno da qualidade indicar.

Linearidade

O resultado da medição é linear até 12 mg/dL. Para valores maiores que 12 mg/dL, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85 %), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição. Sugerimos a verificação da linearidade metodológica e fotométrica no mínimo semestralmente utilizando amostras com valores até 12 mg/dL.

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão e desvios da calibração. Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e o erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB).^{5,7}

Sugere-se utilizar as preparações estabilizadas dos produtos da linha Qualitrol - Labtest, para controle interno da qualidade em ensaios de química clínica.

Intervalo de referência . Os intervalos devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência na população atendida.

Recém-nascidos⁸

Bilirrubina Direta	até 0,4 mg/dL
Bilirrubina Total	1 dia: até 5,1 mg/dL
	1 a 2 dias: até 7,2 mg/dL
	3 a 5 dias: até 10,3 mg/dL

Crianças, Adolescentes e Adultos

Bilirrubina Direta	até 0,4 mg/dL
Bilirrubina Total	até 1,2 mg/dL

Conversão: Unidades Convencionais (mg/dL) x 17,1 = Unidades SI (µmol/L)

Características do desempenho⁹

Exatidão . Em amostras com concentrações conhecidas de bilirrubina direta foram adicionadas diferentes quantidades do analito, obtendo-se recuperações entre 99 e 102 %. O erro sistemático proporcional médio obtido em um valor de 1,4 mg/dL foi igual a 0,01 mg/dL ou 0,7 %.

Estudos de comparação de métodos . O método proposto foi comparado com método utilizando tecnologia similar, sendo obtidos os seguintes resultados:

Dados	Método Comparativo	Método Labtest
Número de amostras	20	
Intervalo de atividade (U/L)	0,11 - 10,21	0,12 - 10,30
Média das estimativas (U/L)	3,43	3,45
Equação da regressão	Método Labtest (U/L) = 1,0057 x Método Comparativo - 0,0006	
Coefficiente de correlação	0,999	

Foram estimados erros sistemáticos iguais a 4,7 % e 5,5 % nos níveis de decisão de 1,4 mg/dL e 9,0 mg/dL, respectivamente. Confirma-se a hipótese nula de que as diferenças entre o método Bili-D Liquiform e o método comparativo não se desviam em mais que o desvio provocado pelas imprecisões inerentes, caracterizando a identidade ou relação funcional entre os métodos.

Os erros totais (erro aleatório + erro sistemático) estimados nos níveis de decisão 1,4 e 9,0 mg/dL são 6,4 % e 7,2 %. Assim, Bili-D Liquiform é substancialmente equivalente ao método comparativo. O coeficiente de correlação (0,999) confirma a força da relação entre os métodos.

Repetitividade - Imprecisão intraensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	0,58	0,010	1,43
Amostra 2	20	2,67	0,010	0,42

Reprodutibilidade - Imprecisão total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	0,58	0,010	2,15
Amostra 2	20	2,67	0,024	0,91

Sensibilidade metodológica . O limite de detecção fotométrica é de 0,02 mg/dL, correspondendo a uma absorbância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Amostras com valores iguais a 5,8 e 9,6 mg/dL foram utilizadas para avaliar a resposta do sistema às diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85 %). Usando fatores de diluição correspondentes a 1:2 e 1:4 foi encontrada recuperação média de 105 %.

Significado clínico . Algumas doenças adquiridas e hereditárias e diversos medicamentos são capazes de afetar uma ou mais etapas envolvidas na produção, captação, armazenamento, metabolismo e excreção da bilirrubina. Dependendo do distúrbio, a bilirrubina não-conjugada (indireta), a conjugada (direta) ou ambas (total), são as principais contribuintes da hiperbilirrubinemia.

As causas mais comuns de aumento da bilirrubina direta são as doenças hepatobiliares e obstrução da árvore biliar (colestase). Na realidade, ambas as bilirrubinas estão aumentadas e pode-se observar uma variação ampla das concentrações séricas de cada forma de bilirrubina. Hepatite e cirrose são exemplos de doenças que podem causar colestase intra-hepática. A colestase pode também ser induzida por medicamentos e hormônios esteróides. A obstrução extra-hepática da árvore biliar devido a carcinoma ou fibrose de cabeça do pâncreas, carcinoma ou constrictões do canal biliar comum e coledocolitíase, produzem concentrações séricas aumentadas de bilirrubina direta.

Observações

1. A limpeza e secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

2. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L. Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre produção de água alcalina com liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências

1. Rand RN, di Pasqua A. Clin. Chem. 1962; 06:570-8.
2. Perlman FC, Lee RTY. Clin. Chem. 1974, 20:447-453.
3. Poon R; Hinberg IH. Clin. Chem. 1985, 31:92-94.
4. Tietz. Textbook of Clinical Chemistry, Burtis CA.; Ashwood ER. eds, 2ª edição, Philadelphia: WB. Saunders Co, 1994.
5. Desirable Biological Variation Database Specification. Disponível em: < <https://www.westgard.com/optimal-biodatabase1.htm> > (acesso em 02/2023).
6. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.
7. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica. 2005.
8. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC: Pediatric Reference Ranges, 5a. edição, Washington: AACC Press, 2005: 42-43.
9. Guder WG, Zawta B et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001 ; p. 18-9.

10. Labtest: Dados de Arquivo.

11. ISO 23640 - In vitro diagnostic medical devices - Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents.
12. NBR ISO 14971:2020 - Dispositivos médicos - Aplicação de gerenciamento de risco a dispositivos médicos
13. ISO 15223 - 1: 2015 - Símbolos a serem utilizados em rótulos, rotulagem e informações a serem fornecidas de produtos para saúde - Parte 1: Requisitos gerais.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo	
Bili-D Liquiform	93-1/104	R 1	1 X 80 mL
		R 2	2 X 12 mL
Bili-D Liquiform Labmax 560/400	93-4/44	R 1	4 X 35 mL
		R 2	4 X 9 mL

Para informações sobre outras apresentações comerciais, consulte o site www.labtest.com.br ou entre em contato com o SAC.

O número de testes para sistemas automáticos depende dos parâmetros programados.

Consulte disponibilidade de aplicações com o SAC.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296/0001-38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP: 33240-152
Lagoa Santa, Minas Gerais - Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 3411 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

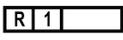
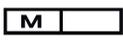
Edição: Outubro, 2004
Revisão: Setembro, 2022
Ref.: 270723(03)

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with IVD devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Tóxico Tóxico Poison
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Instalar até Instalar hasta Install before		Fabricado em Elaborado en Manufactured on
	Produto de uso único Producto de un solo uso Single use product		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Período após abertura Período post-abertura Period after-opening
	Tóxico para os organismos aquáticos Tóxico para los organismos acuáticos Toxic for aquatic organisms		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Gases/líquidos comburentes Gases/líquidos oxidantes Oxidizing gases/liquids		Reagente Reactivo Reagent
	Atenção Atención Attention		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Material Calibrador/Padrão Material Calibrador/Estándar Calibrator/Standard Material		Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Controle negativo Control negativo Negative control
	Reagente Reactivo Reagent		Controle positivo Control positivo Positive control
	Reagente contendo micropartículas Reactivo con micropartículas Reagent with microparticles		

Ref.: 190523 |