

QUIMIBIL - T - Bilirrubina Total

Método Diazo



ANVISA: 10159820250

Finalidade

Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina total em amostras de soro ou plasma animal. Uso somente para diagnóstico "in vitro".

Princípio

O método mais comum para a determinação clínica da bilirrubina é a junção do soro com o ácido sulfanílico diazotizado (ácido p-diazobenzenossulfônico) para produzir uma cor. A reação foi inicialmente descrita por Ehrlich em 1884 e foi usada por Van den Bergh e Snaper posteriormente para demonstrar a presença da bilirrubina no soro normal. A forma direta reage com diazo sem a presença de álcool (acelerador). A bilirrubina que foi conjugada com ácido glucorônico pelo fígado é então solúvel em água. A forma não conjugada está firmemente ligada à albumina, este complexo bilirrubina-albumina não é solúvel em água e portanto exige um acelerador, ou um agente solvente, para separar a bilirrubina da albumina e reagir com o ácido sulfanílico diazotizado. O método da bilirrubina total é baseado em uma modificação do método de Pearimem e Lee, no qual o surfactante é usado como um solubilizante. O nitrito de sódio é adicionado ao ácido sulfanílico para formar o ácido sulfanílico diazotizado. A bilirrubina na amostra reage com o ácido sulfanílico diazotizado para produzir a azobilirrubina que é lida a 550 nm. A absorbância medida é diretamente proporcional à concentração da bilirrubina total na amostra.

Bilirrubina Total $\xrightarrow{\text{Ác. Sulfanílico diazotizado}}$ Ác. Azobilirrubina

Metodologia

Diazo

Significado Clínico

A bilirrubina é um pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina, após a destruição (normal ou patológica) das hemácias. Ao passar pelo interior dos hepatócitos, a bilirrubina conjuga-se ao ácido glucorônico, transformando-se em mono e diglucuronídeo de bilirrubina, o que ocorre sob a ação de uma enzima específica, a glicuroniltransferase. Somente a forma conjugada de bilirrubina (fração direta, solúvel em água) é eliminada pelo fígado e rim; a forma indireta não o é nem por um nem por outro. Tal noção esclarece várias ocorrências fisiopatológicas de considerável importância clínica. No recém-nascido é muito comum o aparecimento de uma icterícia considerada como fisiológica, causada principalmente pela imaturidade do sistema enzimático intra-hepático. Tal icterícia, de intensidade muito variável (em geral 5 -10 mg/dL), ocorre por conta unicamente da fração indireta, desaparecendo no final da primeira semana de vida.

Reagentes

Reagente A: Pronto para uso. Conservar entre 2 - 25°C. Contém Ácido sulfanílico 4,9 mmol/L, HCL 104 mmol/L.

Reagente B: Conservar entre 2 - 25°C. Contém nitrito de sódio 145 mmol/L.

Os reagentes não abertos são estáveis até a data de vencimento impressa no rótulo do produto. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminação de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

PREPARO DO REAGENTE PARA ANALISADOR AUTOMÁTICO:

Utilizar o reagente na forma Bireagente, para o Reagente 1 deve-se utilizar o reagente A puro e para Reagente 2 deve-se adicionar 6 gotas do reagente B em 10 mL do reagente A (estável por 10 dias se armazenado de 2 - 8°C.)

NOTA: O reagente normalmente desenvolve uma leve cor amarelo/alaranjada após o preparo.

Padrão (cód 3003): Bilirrubina liofilizada em matriz proteica. O valor de concentração é rastreável ao Material de Referência Padrão 916a. Verifique a concentração no rótulo do frasco. Conservar entre 2 - 8°C até a data de vencimento impressa no rótulo.

MODO DE PREPARO DO PADRÃO

1. Golpear o frasco levemente com os dedos para desprender o material liofilizado.
2. Utilizando uma pipeta volumétrica calibrada, adicionar exatamente 1,0 mL de água destilada no frasco.
3. Recolocar a tampa, misturar cuidadosamente e deixar em repouso de 5 a 10 minutos antes de utilizar.

Após reconstituição, o padrão deve ser armazenado em ambiente escuro e é estável por 8 horas de 16 a 25°C, 2 dias de 2 a 8°C e 28 dias a -20°C.

Precauções e Cuidados Requeridos

Este reagente deve ser usado somente para diagnóstico "in vitro". Não pipetar com a boca. Evitar contato com a pele e roupa. No caso de contato com os olhos, lavar com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. Deve-se monitorar a temperatura do ambiente de trabalho bem como o tempo de reação para obtenção de resultados corretos. Evitar exposição direta ao sol. Não usar o reagente se estiver visualmente turvo, se a absorbância do branco ultrapassar 0,100 (convertido para 1,0 cm de espaço óptico) quando medido a 550 nm, ou se houver dificuldade em conseguir os valores estabelecidos para o soro controle fresco.

Material Necessário não Fornecido

1. Banho-maria ou analisador capaz de manter uma temperatura de 37°C e capaz de medir a absorbância de 550 nm
2. Pipetas para medição de amostras e reagente.
3. Água destilada/deionizada.
4. Consumíveis do analisador quando usado.
5. Soros Controle e Calibradores.
6. Cronômetro.

Amostra

Soro e plasma (colhido com heparina ou EDTA). As amostras devem ser protegidas da luz, pois a bilirrubina é foto sensível e desta maneira podem ser armazenadas por 12 horas entre 2 - 8°C. Para períodos mais longos, recomendamos o congelamento das amostras. A bilirrubina no soro é estável por 3 meses se armazenada congelada (-20°C) e protegida da luz.

Preparo do Paciente

Cães e Gatos

Jejum recomendado é de 8 a 12 horas (bioquímica) e em filhotes de 4 a 6h podendo beber água. Deixar em repouso por 30 minutos.

Bovinos

Jejum geralmente não obrigatório.

Evitar estresse pois pode alterar o lactato.

Equinos

Jejum geralmente não obrigatório.

Evitar estresse pois pode alterar o lactato.

Aves

Jejum recomendado de 2 a 4 horas.

Evitar estresse do animal.

Mamíferos pequenos

Jejum geralmente não recomendado. Evitar estresse do animal.

Interferências

Não devem ser usadas amostras hemolisadas (hemoglobina > 100 mg/dL) ou lipêmicas (triglicérides > 82,5 mg/dL). Se o teste não for feito imediatamente após a coleta, recomendamos envolver o tubo com papel alumínio para que não haja incidência luminosa. A incidência de luz direta na amostra pode causar diminuição de até 50% de bilirrubina dentro de 1 hora. Para interferência de drogas e outras substâncias que podem interferir na dosagem de bilirrubina total, veja Young, DS.

Parâmetros do Sistema

Temperatura	37°C
Comprimento de Onda	550 nm
Tipo de Reação	Ponto final
Direção	Crescente
Relação Amostra/Reativo	1:20
Vol. Amostra	50 µL
Vol. Reagente	1,0 mL
Tempo de Incubação	5 minutos

Calibração

Utilizar Quimicalib Ebram Cód.7023/12023 ou o padrão que acompanha o kit do cód 3003. A concentração de bilirrubina total no Quimicalib é rastreável a um calibrador mestre correlacionável ao método de referência e ao padrão ao Material de Referência Padrão 916a.

Procedimento Automatizado

Aplicação no sistema automatizado: vide manual para utilização do equipamento e instruções de uso do reagente. Aplicação no sistema semi-automático: proceder como demonstrado a seguir no procedimento manual até o item 3 (incubação), em seguida utilizar o equipamento para leitura, seguindo protocolo analítico específico baseado no item Parâmetros do Sistema.

Procedimento Manual

1. Preparar o **Reagente 1:** Utilizar o RA puro. **Reagente 2:** 03 gotas do RB em 10 mL do RA.
2. Separar 4 tubos de ensaio e realizar os procedimentos conforme abaixo:

Tubos	1. Branco	2. Calibrador	3. Branco	4. Amostra/S.C.
Calibrador	50µ	50µL	-	-
Amostra S/C	-	-	50µL	50µL
Reagente 1	1,0mL	-	1,0mL	-
Reagente 2	-	1,0mL	-	1,0mL

3. Homogeneizar os tubos e deixar em Banho-Maria (BM) 37°C por 5 minutos. O nível de água no BM deve ser superior ao nível de reagente nos tubos de ensaio.
4. Zerar o aparelho com o branco do reagente a 550nm e proceder as leituras registrando as absorbâncias dos brancos e do calibrador, amostra/soro controle (S.C.). Obs.: Procedimento sugerido para espectrofotômetros que requerem volume mínimo de 1,0 mL e podem ser ajustados proporcionalmente sem influência no desempenho do teste. Salientamos que volumes de amostra menores do que 10µL aumentam a imprecisão da medição em aplicações manuais.

Cálculos

(Abs. = Absorbância)

(Conc. = Concentração)

$$\text{Bilirrubina Total da Amostra (mg/dL)} = \frac{\Delta \text{ Abs. Amost} - \text{Abs. Branco Amost}}{\Delta \text{ Abs. Calib} - \text{Abs. Branco Calib.}} \times \text{concentração Calib}$$

Exemplo

Abs. do branco da amostra = 0,003
 Abs. amostra = 0,253
 Abs. do branco calibrador = 0,008
 Abs. calibrador = 0,558
 Concentração do calibrador = 2,0 mg/dL
 Bilirrubina Total Amostra =

$$\frac{0,253 - 0,003}{0,558 - 0,008} \times 2,0$$

Bilirrubina Total Amostra =

$$\frac{0,250}{0,550} \times 2,0$$

Bilirrubina Total Amostra (mg/dL) = 0,9 mg/dL

Obs.: mmol/L = mg/dL x 17,10

Linearidade

Quando executado de acordo com o recomendado, o teste é linear até 20 mg/dL. Amostras com valores superiores a 20 mg/dL ou muito ictericas, devem ser diluídas com solução salina a ponto de seus resultados ficarem entre 0-20 mg/dL com posterior multiplicação pelo fator de diluição.

Controle de Qualidade

Cada laboratório deve manter um programa interno de qualidade que defina objetivos, procedimentos, normas, limites de tolerância e ações corretivas. Deve-se manter também um sistema definido para se monitorar a variação analítica do sistema de medição. Aconselhamos o uso dos soros controle Quimicontrol Normal e Quimicontrol Anormal Ebram Cód. 7024/12024 e 7031/12031.

Valores Esperados

Caninos: 0,1 - 0,5 mg/dL
 Felino: 0,15 - 0,5 mg/dL
 Bovinos: 0,01 - 0,5 mg/dL
 Equinos: 1,0 - 2,0 mg/dL

Estes valores são dados unicamente como título orientativo. É recomendado que cada laboratório estabeleça seu próprio intervalo de referência.

Estudos Comparativos

Estudos executados entre este procedimento e uma metodologia similar produziram os seguintes resultados:

Número de amostras	30
Intervalo dos resultados	0,31 - 2,35 (mg/dL)
Coefficiente de correlação	0,990
Inclinação	0,973
Intercepta	0,075 (mg/dL)

Precisão

Estudos de precisão foram executados com dois níveis (normal e patológico) sendo que cada amostra fora processada por 10 vezes e os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	2,09	8,12
D.P. (mg/dL)	0,12	0,21
C.V. (%)	5,7	2,3

Exatidão

As amostras foram processadas em duplicata por 10 dias consecutivos, uma vez por dia e em duplicata. Os seguintes dados estatísticos foram encontrados:

N=10	Nível 1	Nível 2
Média (mg/dL)	2,14	7,26

D.P. (mg/dL)	0,12	0,26
C.V. (%)	5,6	3,6

Sensibilidade Metodológica

0,0 mg/dL

Especificidade

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Observações

- A limpeza e a secagem adequadas do material utilizado são fatores fundamentais para estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
- A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, deve ter resistividade ≥ 1 mega ohm ou condutividade ≤ 1 microsiemens e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L (água purificada). Para o enxágue da vidraria a água pode ser purificada, com resistividade $\geq 0,1$ megaohms ou condutividade ≤ 10 microsiemens. No enxágue final também utilizar água purificada.

Apresentação

Linha Bioquímica Geral: RA:10x10mL + RB:1x5,0mL + P:1x1,0mL

Linha Bulk: 1 x 200mL + 1 x 5mL

Referência Bibliográfica

- Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition. Burlis CS and Ashwood ER (Eds.)WB Saunders Company (1994)
- Herlich, P., Zeltschr, Sur Anat. Chemie 23:276 (1984)
- Van den Bergh, A.A.H. Snapper J. Dtsch Arch Klin Med. 110:540 (1913)
- Malloy, H., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481 (1937)
- Jendrassik, L. Grof, P., Biochem, Zeitschr. 297:81 (1937)
- Arquivos da Ebram.

Revisão: Fevereiro de 2026

Símbolos universais utilizados em embalagens de diagnóstico in vitro

	Consultar instruções de uso		Reagente		Fabricado por
	O conteúdo é suficiente para <n> testes		Data de validade (último dia do mês)		Número do lote
	Limite de temperatura (conservar a)		Produto para diagnóstico in vitro		Número do catálogo
	Uso veterinário				

Ebram Produtos Laboratoriais Ltda.

Rua Julio de Castilhos, 500 - Belenzinho - São Paulo - SP
 Tel.: +55 11 2291 2811 - CEP 03059-001 - Indústria Brasileira
 CNPJ.: 50.657.402/0001-31

Responsável Técnica

Dra. Nadjara Novaes Longen - CRF-SP - 37.451

SAC Ebram

Para mais informações, entrar em contato com o SAC 0800 500 2424 ou ☎ 11 2574 7110
 sac@ebram.com | ebram.com.br

