



## QUIMIBIL - T - Bilirrubina Total

### Método Diazo

REG. MS:10159820250

#### 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

Para mais informações, entrar em contato com o **SAC EBRAM**  
0800 500 2424 ou ☎ 11 2574 7110  
sac@ebtram.com | www.ebtram.com

Revisão: Ago/2022

**FINALIDADE.** Reação colorimétrica para determinação de bilirrubina total em amostras de soro ou plasma humanos. 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- diazobenzenesulfônico) 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 glucurônico 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.



#### 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 glucurônico, transformando-se em mono e diglucuronídeo de bilirrubina, o que ocorre sob a ação de uma enzima específica, a glucuroniltransferase. Somente a forma conjugada de bilirrubina (fração direta, solúvel em água) é eliminada pelo fígado e rim; a forma indireta não 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 à 10 minutos antes de utilizar.

Após reconstituição, o padrão deve ser armazenado em ambiente escuro e é estável por 8 horas de 16 à 25°C, 2 dias de 2 à 8°C e 28 dias à -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.** É recomendado jejum mínimo de 4 horas para adultos; em crianças, colher antes da alimentação. Todavia, poderá ser modificado segundo orientação médica.

#### 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 Quimicalib é rastreável ao método de referência proposto pelo CLSI e no 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)

#### 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.

Adultos e crianças acima de um mês de idade: 0,2 - 1,0 mg/dL

#### RN Prematuros:

Até 24 horas: 1 - 8 mg/dL  
Até 48 horas: 6 - 12 mg/dL  
3 - 5 dias: 10 - 14 mg/dL

#### RN a termo:

Até 24 horas: 2 - 6 mg/dL  
Até 48 horas: 6 - 12 mg/dL  
3 - 5 dias: 4 - 8 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.

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










#### APRESENTAÇÃO.

Linha Bioquímica Geral: RA:10x10mL + RB:1x5,0mL + P:1x1,0mL Linha Quimicat 450: R1: 3x20mL + R2: 2x20mL + RB:1x5,0mL Linha Bulk: 1 x 200mL + 1 x 5mL

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.

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

#### 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 CATALOGO