

BILIRRUBINA (TOTAL E DIRECTA)		BILIRRUBINA (TOTAL)		BILIRRUBINA (DIRECTA)	
COD 11515 2x50+2x50 mL	COD 11555 500 + 500 mL	COD 11510 4 x 50 mL	COD 11544 2 x 500 mL	COD 11511 4 x 50 mL	COD 11545 2 x 500 mL
CONSERVAR A 15-30°C					
Reagentes para medir a concentração de bilirrubina Só para uso <i>in vitro</i> nos laboratórios clínicos					

## BILIRUBIN (TOTAL AND DIRECT) BILIRUBIN (TOTAL) BILIRUBIN (DIRECT)



## BILIRRUBINA SULFÂNICO DIAZOTADO

### FUNDAMENTO DO MÉTODO

A bilirrubina directa presente na amostra reage com ácido sulfanílico diazotado, originando um complexo colorido que se pode determinar espectrofotométricamente. A cetrimida solubiliza a bilirrubina indirecta permitindo a sua reacção juntamente a fracção directa<sup>1,2</sup>. Os termos "directa" e "total" referem-se às características da reacção na presença ou ausência de solubilizantes (aceleradores). A bilirrubina "directa" e "indirecta" equivalem de forma aproximada às fracções conjugadas e não conjugadas.

### CONTEÚDO

	Reagente AT	Reagente AD	Reagente BT	Reagente BD
COD 11515	2 x 40 mL	2 x 40 mL	2 x 10 mL	2 x 10 mL
COD 11555	400 mL	400 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
COD 11510	4 x 40 mL	—	4 x 10 mL	—
COD 11544	2 x 400 mL	—	2 x 100 mL	—
COD 11511	—	4 x 40 mL	—	4 x 10 mL
COD 11545	—	2 x 400 mL	—	2 x 100 mL

### COMPOSIÇÃO

#### BILIRRUBINA (TOTAL)

AT. Reagente. Ácido sulfanílico 29 mmol/L, ácido clorídrico 0,2 mol/L, cetrimida 50 mmol/L.

BT. Reagente. Nitrito de sódio 11,6 mmol/L.

#### BILIRRUBINA (DIRECTA)

AD. Reagente. Ácido sulfanílico 35 mmol/L, ácido clorídrico 0,24 mol/L.

BD. Reagente. Nitrito de sódio 3,5 mmol/L.

### CONSERVAÇÃO

Conservar a 15-30°C.

Os Reagentes são estáveis até à data de caducidade indicada na etiqueta, desde que se conservem bem fechados e se evite a contaminação durante o seu uso.

Indicações de deterioração:

- Reagentes: Presença de partículas, turvação, absorvância do branco superior a 0,05 a 540 nm (cuvete de 1 cm).

### REAGENTES AUXILIARES

S. Padrão de Bilirrubina (cod 11513). Reconstituir com 5,0 mL de água destilada (Nota 1). A concentração vem indicada na etiqueta do frasco. O valor de concentração é traçado ao Material de Referência Certificado 916a (National Institute of Standards and Technology, USA). Proteger o Padrão reconstituído da luz. Estável 4 horas a 15-30°C ou durante 2 meses a -18°C congelado em alíquotas.

### PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Reagente de Trabalho: Deitar o conteúdo de um frasco de Reagente BT num frasco de Reagente AT para determinar a bilirrubina total, ou o conteúdo de um frasco de reagente BD num frasco de Reagente AD para determinar a bilirrubina directa (Nota 2). Agitar suavemente. Se se desejar preparar outros volumes, misturar na proporção: 1 mL de Reagente BT + 4 mL de Reagente AT ou 1 mL de Reagente BD + 4 mL de Reagente AD. Estável durante 20 dias a 2-8°C.

### EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Analisador, espectrofotómetro ou fotómetro com cuvette termostatizada a 37°C para leituras a 540 ± 20 nm.
- Cuvetes de 1,0 cm de passo de luz (caso se utilize o factor nos cálculos).

### AMOSTRAS

Soro recolhido mediante procedimentos standard.

A bilirrubina no soro é estável 2 dias a 2-8°C protegido da luz.

### PROCEDIMENTO PARA BILIRRUBINA TOTAL

- Pipetar em tubos de ensaio: (Notas 1, 3)

	Branco Reagente	Branco Amostra	Amostra	Padrão
Água destilada	100 µL	—	—	—
Amostra	—	100 µL	100 µL	—
Padrão (S)	—	—	—	100 µL
Reagente (AT)	—	1,0 mL	—	—
Reagente de Trabalho	1,0 mL	—	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bem e deixar durante 2 minutos à temperatura ambiente.
- Ler a absorvância (A) dos Brancos da Amostra contra a água destilada a 540 nm.
- Ler a absorvância (A) das Amostras e do Padrão contra o Branco do Reagente a 540 nm.

### PROCEDIMENTO PARA BILIRRUBINA DIRECTA

- Pipetar em tubos de ensaio: (Notas 1, 3)

	Branco Reagente	Branco Amostra	Amostra
Água destilada	100 µL	—	—
Amostra	—	100 µL	100 µL
Reagente (AD)	—	1,0 mL	—
Reagente de Trabalho	1,0 mL	—	1,0 mL

- Agitar bem e deixar reagir durante exactamente 5 minutos a 37°C.
- Ler a absorvância (A) dos Brancos da Amostra contra a água destilada a 540 nm.
- Ler a absorvância (A) das Amostras contra o Branco do Reagente a 540 nm.

### CÁLCULOS

A concentração de bilirrubina na amostra calcula-se a partir da seguinte fórmula geral:

$$\frac{A_{\text{Amostra}} - A_{\text{Branco Amostra}}}{A_{\text{Padrão}}} \times C_{\text{Padrão}} = C_{\text{Amostra}}$$

Nos cálculos da bilirrubina directa, deve-se utilizar o valor da absorvância obtido para o padrão no procedimento de bilirrubina total (Nota 4).

Concentração massa (mg/dL) x 17,1 = concentração substância (µmol/L)

### VALORES DE REFERÊNCIA

Adultos<sup>3</sup>:

Total:	Até 1,0 mg/dL = 17 µmol/L
Directa:	Até 0,2 mg/dL = 3,4 µmol/L

Recém nascidos<sup>3</sup> (bilirrubina total):

Idade	Prematuros	Não prematuros
Até 24 h	1,0-8,0 mg/dL = 17-137 µmol/L	2,0-6,0 mg/dL = 34-103 µmol/L
Até 48 h	6,0-12,0 mg/dL = 103-205 µmol/L	6,0-10 mg/dL = 103-171 µmol/L
3-5 dias	10-14 mg/dL = 171-239 µmol/L	4,0-8,0 mg/dL = 68-137 µmol/L

Estes valores dão-se unicamente a título orientativo; é recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios intervalos de referência.

### CONTROLE DE QUALIDADE

Recomenda-se o uso dos Soros Controle de Bioquímica níveis I (Cod. 18005, 18009 e 18042) e II (Cod. 18007, 18010 e 18043) para verificar a funcionalidade do procedimento de medida.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio programa de Controle de Qualidade interno, assim como procedimentos de correcção como em casos em que os controles não cumpram com as tolerâncias aceitáveis.

### CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Limite de detecção (bilirrubina total): 0,03 mg/dL = 0,51 µmol/L
- Limite de detecção (bilirrubina directa): 0,02 mg/dL = 0,34 µmol/L
- Limite de linearidade: 15 mg/dL = 257 µmol/L. Quando se obtêm valores superiores, diluir a amostra 1/3 com água destilada e repetir a medição.
- Repetibilidade (intraensaio):

Bilirrubina total	CV	n	Bilirrubina directa	CV	n
0,59 mg/dL = 10,1 µmol/L	3,0 %	20	0,77 mg/dL = 13,2 µmol/L	1,2 %	20
6,74 mg/dL = 115,2 µmol/L	1,0 %	20	1,36 mg/dL = 23,2 µmol/L	0,5 %	20

- Reprodutibilidade (interensaio):

Bilirrubina total	CV	n	Bilirrubina directa	CV	n
0,59 mg/dL = 10,1 µmol/L	3,6 %	25	0,77 mg/dL = 13,2 µmol/L	2,3 %	25
6,74 mg/dL = 115,2 µmol/L	3,3 %	25	1,36 mg/dL = 23,2 µmol/L	0,9 %	25

- Sensibilidade (bilirrubina total): 88 mA·dL/mg = 5,15 mA·L/µmol
- Sensibilidade (bilirrubina directa): 100 mA·dL/mg = 5,85 mA·L/µmol
- Veracidade: Os resultados obtidos com estes reagentes não mostram diferenças sistemáticas significativas quando comparados com reagentes de referência (Nota 4). Os detalhes do estudo comparativo estão abaixo disponíveis.
- Interferências: A hemólise não interfere (hemoglobina 10 g/L). A lipemia (triglicéridos > 15 g/L) interfere. Outros medicamentos e substâncias podem interferir<sup>4</sup>.

Estes dados foram obtidos utilizando um analisador. Os resultados podem variar ao mudar de equipamento ou ao realizar-se o procedimento manualmente.

### CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

A bilirrubina é um produto de resíduo derivado do grupo hemo da hemoglobina dos eritrócitos danificados ou senescentes, que são destruídos nas células reticuloendoteliais. Uma vez produzida, a bilirrubina é transportada ao fígado em associação com a albumina. A bilirrubina no hepatócito conjuga-se com o ácido glucurónico e é excretada na biliar. Existem uma série de doenças herdadas ou adquiridas que afectam a produção, captação, metabolismo e excreção da bilirrubina, resultando numa hiperbilirrubinemia<sup>3,5</sup>.

Observa-se hiperbilirrubinemia não conjugada em recém nascidos (icterícia fisiológica), num aumento da destruição de eritrócitos (anemia hemolítica, hematoma extenso), na eritropoiesis deficiente assim como em algumas doenças genéticas pouco frequentes (síndrome de Gilbert, síndrome de Crigler-Najjar).

A hiperbilirrubinemia conjugada associa-se a uma diminuição na excreção de bilis devida a doenças hepáticas (hepatite ou cirrose) ou a uma colostase intra ou extrahepática.

A icterícia é uma manifestação clínica da hiperbilirrubinemia, que consiste numa deposição dos pigmentos biliares na pele, originando coloração amarelada na pele e mucosas.

O diagnóstico clínico não se deve realizar tendo em conta o resultado de um único teste mas deve integrar-se nos dados clínicos e de laboratório.

### NOTAS

- Para a determinação de bilirrubina em recém nascidos, reconstituir o Padrão com 1,0 mL de água destilada. A concentração neste caso será a indicada na etiqueta multiplicada por 5. Reduzir o volume de amostra (água, padrão, soro) a 50 µL e utilizar o Padrão concentrado. Duplica-se assim a linearidade do método (até 30 mg/dL = 514 µmol/L).
- É conveniente lavar o frasco de Reactivo B com uma pequena quantidade da mistura preparada, com a finalidade de arrastar os resíduos que ficam nas paredes do frasco.
- Estes reagentes podem utilizar-se na maioria dos analisadores automáticos. Solicite informação ao seu distribuidor.
- A calibração com o padrão aquoso fornecido pode causar declives, especialmente em alguns analisadores. Nestes casos, recomenda-se a calibração usando um padrão de base sérica (Calibrador Bioquímica, cod. 18011 e 18044).

### BIBLIOGRAFIA

- Pearlman FC and Lee RTY. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents. Clin Chem 1974; 20: 447-453.
- Zoppi F, Peracino A, Fenili D, Marcovina S and Ramella C. Metodo per la determinazione della bilirrubina totale e coniugata. Uso di un tensioattivo cationico come agente solubilizzante. Giorn It Chim Cl 1976; 1:343-359.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.