

Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Residência Integrada Multiprofissional e em Área Profissional da Saúde  
Farmácia Análises Clínicas

**Comparação entre métodos confirmatórios para bilirrubina urinária**

Roberta Barbizan Mascarello

Porto Alegre  
2023

Roberta Barbizan Mascarello

**Comparação entre métodos confirmatórios para bilirrubina urinária**

Trabalho de conclusão de Residência apresentado ao  
Programa de Residência em Área Profissional da  
Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre como  
requisito parcial para a obtenção do título  
de especialista em Análises Clínicas.

Orientador(a): MSc Fernanda Hermes Hickmann

Porto Alegre  
2023

### CIP - Catalogação na Publicação

Mascarello, Roberta Barbizan  
Comparação entre métodos confirmatórios para  
bilirrubina urinária / Roberta Barbizan Mascarello. --  
2023.  
43 f.  
Orientadora: Fernanda Hermes Hickmann.

Trabalho de conclusão de curso (Especialização) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Hospital de  
Clínicas de Porto Alegre, Programa de Residência em  
Área Profissional de Saúde, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. bilirrubinúria. 2. bilirrubina direta. 3. tiras  
reagentes. 4. exame qualitativo de urina. I. Hickmann,  
Fernanda Hermes, orient. II. Título.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	5
2.	REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1.	Metabolismo da bilirrubina e hiperbilirrubinemia	7
2.1.1	Hiperbilirrubinemia não conjugada	8
2.1.2.	Hiperbilirrubinemia conjugada	9
2.2.	Determinação da bilirrubina	10
2.3.	Exame Qualitativo de Urina (EQU)	11
3.	HIPÓTESE	13
4.	OBJETIVOS	13
4.1.	Objetivo geral	13
4.2.	Objetivos específicos	13
5.	ASPECTOS ÉTICOS	14
6.	RESULTADOS	15
6.1	Artigo	15
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
	ANEXOS	36

## RESUMO

A presença de bilirrubina direta (BD) na urina pode indicar alterações de funções hepáticas e do trato biliar. No Exame Qualitativo de Urina (EQU) é possível determinar a presença de BD na urina, através da utilização de tiras reagentes. Porém, esse método apresenta diversos interferentes que favorecem a frequência de resultados falsos positivos. O objetivo do estudo foi validar um método confirmatório para bilirrubina urinária, realizando a comparação de três métodos: teste de Fouchet, o teste do lugol e a dosagem da BD urinária por ensaio colorimétrico. Foram incluídos 60 pacientes que apresentaram resultado positivo para bilirrubina no EQU e que tinham dosagem de bilirrubina total (BT) sérica. O método considerado referência foi o Fouchet. A concordância entre os métodos foi avaliada pelo teste *Kappa*. O Fouchet foi reagente para 18,3% das amostras, o teste do lugol para 10% e a dosagem de BD por ensaio colorimétrico foi positiva para 26,7%. Os três métodos apresentaram uma forte concordância, porém a dosagem colorimétrica de BD foi onde obtivemos o maior valor de *Kappa* = 0,76. O ponto de corte de maior acurácia para um resultado positivo na dosagem de BD urinária foi de 1,2 mg/dL (AUC = 0,985 95% CI: 0,961 - 1,000;  $p < 0,001$ ), apresentando sensibilidade de 90,9% e especificidade de 93,9%. Em relação à cor da urina, 100% das amostras amarelas e 95% das âmbares foram falsos positivos. Neste estudo, encontramos uma alta proporção de resultados falsos positivos para bilirrubina urinária, o que demonstra a necessidade de um método confirmatório. A dosagem da BD na urina pode ser um método de escolha naquelas amostras com cor diferente de amarela e que não tenham dosagem sérica de bilirrubina total.

**Palavras-chave:** bilirrubinúria; bilirrubina direta; tiras reagentes; exame qualitativo de urina.

## **ABSTRACT**

The presence of direct bilirubin (DB) in the urine may indicate changes in liver and biliary tract functions. In the urinalysis test (UT) it is possible to determine the presence of DB in the urine, through the use of reagent strips. However, this method has several interferences that foment the frequency of false positive results. The aim of the study was to validate a confirmatory method for urinary bilirubin, comparing three methods: Fouchet's test, Lugol's test and measure of urinary DB by colorimetric assay. Sixty patients who had a positive result for bilirubin in the UT and who had total serum bilirubin (TSB) measurement were included. The method considered as reference was Fouchet. Agreement between methods was assessed using the Kappa test. The Fouchet was reactive for 18.3% of the samples, the Lugol test for 10% and the DB dosage by colorimetric assay was positive for 26.7%. The three methods developed a strong level of agreement, but the colorimetric dosage of DB was where we obtained the highest Kappa value = 0.76. The most accurate cutoff point for a positive result in DB measurement was 1.2 mg/dL (AUC = 0.985 95% CI: 0.961 - 1.000;  $p < 0.001$ ), with a sensitivity of 90.9% and specificity of 93.9%. Regarding urine color, 100% of yellow and 95% of amber samples were false positives. In this study, we found a high proportion of false positive results for urine bilirubin, which demonstrates the importance of a confirmatory method. The measurement of DB in the urine can be a method of choice in those specimens with a color other than yellow and that do not have total serum bilirubin dosage.

**Key-words:** bilirubinuria; direct bilirubin; reagent strips; urinalysis test.

## 1. INTRODUÇÃO

A bilirrubina é um produto obtido a partir da degradação da hemoglobina e em alguns processos patológicos pode ser excretada na urina, sendo útil como um marcador para doenças hepáticas e biliares (1). A decomposição do grupo heme presente na hemoglobina dos eritrócitos dá origem à biliverdina, que posteriormente será convertida em bilirrubina indireta. A bilirrubina indireta é altamente lipossolúvel, e no plasma está ligada reversivelmente à albumina. Quando chega ao fígado, a bilirrubina não conjugada dissocia-se da albumina e é conjugada com o ácido glicurônico, resultando na bilirrubina direta. Esta por sua vez, é solúvel e pode ser excretada pelas vias biliares ou pelos rins, sendo a única forma encontrada na urina (1,2).

Em condições normais, a determinação de bilirrubina na urina é negativa, portanto, sua presença é exclusivamente patológica (3). Sua detecção indica a presença de doenças hepáticas ou da bile, sugerindo a necessidade de investigação (4,5). O rastreamento de bilirrubina urinária pode ser utilizado com o objetivo de realizar uma triagem da função hepática e do trato biliar, a fim de detectar precocemente uma condição patológica. A partir de um resultado positivo para bilirrubina urinária, pode ser solicitado um painel de funções hepáticas, como aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transferase (GGT) e bilirrubina total (BT), apresentando uma boa relação custo-benefício (6).

A determinação de bilirrubina urinária é realizada através do teste da tira reagente no Exame Qualitativo de Urina (EQU).

O EQU é um exame laboratorial de rotina, muito solicitado devido à sua vasta capacidade de fornecer informações importantes sobre o trato urinário, auxiliando no diagnóstico de doenças renais e em alguns casos de doenças sistêmicas e metabólicas como diabetes mellitus, acidose metabólica e doenças hepáticas. Além disso é um exame rápido, seguro, de fácil coleta da amostra, minimizando o desconforto ao paciente (4).

Dessa maneira, o EQU pode ser considerado um exame de triagem de ampla utilização, tanto em nível emergencial quanto ambulatorial, auxiliando no diagnóstico, acompanhamento e monitoramento clínico e terapêutico (5).

Como já mencionado, a detecção de bilirrubinúria é feita apenas em uma etapa do EQU, na análise química realizada pela tira reagente. Em casos positivos, é apresentada uma reação de cor avermelhada. Dessa maneira, resultados falsos negativos podem ocorrer, devido a presença de ácido ascórbico e a exposição prolongada à luz (5), e falsos positivos são muito

comuns, devido a interferentes fisiológicos ou patológicos, como a coloração da amostra, a presença do metabólito indoxilsulfato proveniente da dieta, e a presença de medicamentos como rifampicina, clorpromazina, fenazopiridina e etodolaco (5,7,8).

Sendo assim, é necessário diferenciar os resultados positivos para bilirrubina na tira reagente dos resultados falsos positivos, de modo a comparar com um método de referência, no intuito de definir um método rápido, fácil e eficiente para confirmar os resultados positivos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Metabolismo da bilirrubina e hiperbilirrubinemia

Aproximadamente 85% da bilirrubina formada no organismo é proveniente da decomposição dos eritrócitos senescentes, onde a hemoglobina dos eritrócitos é quebrada em globina e heme (9,10). Posteriormente, o grupo heme é degradado por um processo enzimático de várias etapas, liberando três componentes: ferro, monóxido de carbono e biliverdina. Esta, é reduzida em bilirrubina indireta altamente lipossolúvel, que no plasma está fortemente ligada às proteínas transportadoras, principalmente à albumina. Esse processo facilita o transporte para o fígado (1).

Nos hepatócitos, a bilirrubina indireta ou não conjugada, é dissociada da albumina, liga-se à glutatona-S-transferase e é transportada ao retículo endoplasmático liso, para posterior conjugação com o ácido glicurônico. A enzima uridina difosfato-glucuronil transferase (UGT1A1) adiciona dois glicuronídeos à bilirrubina não conjugada em reações subsequentes, dando origem à bilirrubina direta ou conjugada (10). A conjugação evita a reabsorção intestinal e, por ser solúvel, a bilirrubina direta pode ser excretada na urina ou pelas vias biliares, chegando ao intestino (1,2). No intestino, a bilirrubina direta ou conjugada, é metabolizada em mesobilirrubina, estercobilinogênio e urobilinogênio, pela ação de enzimas intestinais e bacterianas. Boa parte do urobilinogênio é excretado nas fezes. Uma pequena porção pode sofrer reabsorção pela circulação entero-hepática e ser reexcretado pelo fígado, mas também chegar aos rins e ser excretado na urina (1,4,10).

Os níveis séricos de bilirrubina total são, em média, inferiores a 1,0mg/dL. Níveis acima de 3,0 mg/dL são definidos como hiperbilirrubinemia e podem causar a icterícia, que se caracteriza pela coloração amarelada dos tecidos, incluindo a pele, mucosas e tecidos profundos (10–12).

Os altos níveis de bilirrubina indireta em recém-nascidos é muito comum, pois no útero, o feto necessita de alta concentração de hemoglobina fetal para a oxigenação através da placenta. Ao nascer, a necessidade de hemoglobina fetal diminui, levando a um aumento da degradação dos eritrócitos e do metabolismo da hemoglobina fetal, gerando acúmulo de bilirrubina não conjugada. Esse pico de concentração de bilirrubina pode levar à icterícia neonatal nos primeiros três a quatro dias de vida, onde depois volta aos níveis normais. É considerado um fenômeno fisiológico transitório (13).

A hiperbilirrubinemia pode ser classificada em duas principais categorias: hiperbilirrubinemia não conjugada e hiperbilirrubinemia conjugada.

A hiperbilirrubinemia não conjugada é ocasionada por desordens hemolíticas, absorção hepática prejudicada e distúrbios de conjugação da bilirrubina, como ocorre na síndrome de Gilbert e na síndrome de Crigler-Najjar. Já na conjugada, as principais causas são danos hepatocelulares, como hepatites virais ou alcoólica e distúrbios colestáticos como obstruções biliares (11,12).

Dessa maneira, nesses processos patológicos como doenças hepáticas, biliares ou hemolíticas, os níveis de excreção de bilirrubina e urobilinogênio podem ser afetados, resultando em alterações no exame de urina.

Quando há obstrução dos ductos biliares ou quando a função hepática está comprometida, a bilirrubina direta é liberada para a corrente sanguínea. Por ser solúvel no plasma, ela é filtrada pelos glomérulos renais, dessa maneira, quanto mais aumenta sua concentração no sangue, mais aumenta sua excreção renal (4,8). Isso confere uma cor escura à urina, característica dos pigmentos biliares (12). Nos distúrbios hemolíticos ocorre o aumento de produção de bilirrubina indireta. Nesses casos, aumenta a reabsorção de urobilinogênio e conseqüentemente a excreção renal. A bilirrubina não aparece na urina, pois a fração aumentada é a indireta que é altamente insolúvel, logo, não é filtrada (2).

Sendo assim, a urinálise pode ajudar a determinar se a hiperbilirrubinemia é de origem conjugada ou não, visto que a bilirrubina não conjugada não é detectável na urina (12).

### **2.1.1. Hiperbilirrubinemia não conjugada**

O aumento dos níveis séricos de bilirrubina não conjugada é proveniente de alguns fatores. Entre eles podemos citar a superprodução de bilirrubina, captação hepática de bilirrubina prejudicada e a conjugação de bilirrubina prejudicada. A superprodução de bilirrubina é resultado da quebra excessiva do grupo heme da hemoglobina. Isso ocorre em desordens hemolíticas como hemólise extravascular ou intravascular, algumas anemias como anemias megaloblásticas e sideroblásticas, anemia por deficiência de ferro grave, porfiria eritropoiética (14,15). Ainda, em situações de estresse a hemólise pode aumentar em até 10 vezes, aumentando, portanto, a produção de bilirrubina não conjugada; sendo assim, a capacidade de conjugação hepática pode ser excedida, levando ao acúmulo de bilirrubina não conjugada, principalmente em pacientes com doença hepática (15).

A redução da captação hepática de bilirrubina se caracteriza pela entrega prejudicada de bilirrubina ao fígado e também por distúrbios de internalização da bilirrubina pelo hepatócito. Pacientes com insuficiência cardíaca congestiva ou *shunts* portossistêmicos

podem ter o fluxo sanguíneo hepático diminuído, resultando em uma deficiência da chegada de bilirrubina aos hepatócitos, levando à hiperbilirrubinemia predominantemente não conjugada. Pacientes com cirrose podem ter uma redução ainda maior na captação de bilirrubina pois o contato direto do plasma com os hepatócitos é prejudicado devido a perda de fenestras das células endoteliais sinusoidais (15).

Outra causa de hiperbilirrubinemia não conjugada é a deficiência na conjugação da bilirrubina, resultante da atividade diminuída ou ausente da UDP-glucuronosiltransferase, e é encontrada tanto em condições adquiridas como em doenças hereditárias como a síndrome de Gilbert e a síndrome de Crigler-Najjar. A síndrome de Gilbert é considerada benigna e ocorre devido a um defeito no promotor do gene que codifica a enzima UGT1A1, que é responsável pela conjugação da bilirrubina ao ácido glicurônico (16). Os pacientes geralmente são assintomáticos e podem ocorrer episódios de icterícia, que é desencadeada por diversos fatores, como desidratação, jejum, doenças intercorrentes e menstruação (17).

Já a síndrome de Crigler-Najjar é classificada em tipo I e tipo II, e é causada pela deficiência ou ausência da enzima UGT1A1. Porém, é uma doença autossômica recessiva rara, caracterizada por hiperbilirrubinemia não conjugada grave que pode levar ao desenvolvimento de disfunção neurológica induzida pela bilirrubina (*BIND*) (18).

### **2.1.2. Hiperbilirrubinemia conjugada**

A hiperbilirrubinemia conjugada é ocasionada por diversos fatores adquiridos e pode ser classificada de acordo com sua origem fisiopatológica e histopatológica: obstrução biliar (colestase extra-hepática), colestase intra-hepática e lesão hepatocelular.

Quando há obstrução do fluxo biliar, a bilirrubina conjugada é retida nos hepatócitos, onde pode ocorrer a reversão da glicuronidação. Assim, a bilirrubina não conjugada formada pode se difundir ou ser transportada de volta ao plasma. Nesta patologia, a bilirrubina direta e indireta podem estar aumentadas no soro (15).

Por outro lado, várias desordens intra-hepáticas podem levar ao acúmulo de bilirrubina conjugada. Nessa condição, os ductos biliares estão desobstruídos. Dentre elas podemos citar as hepatites virais, hepatite alcoólica, colangite biliar primária, algumas drogas e toxinas, neoplasias, pacientes pós transplante (15). Ainda, a excreção da bilirrubina conjugada é dificultada em doenças hereditárias como a síndrome de Dubin-Johnson e a síndrome de Rotor, entre outras.

Dubin e Johnson, e Sprinz e Nelson, relataram em 1954, casos de pacientes com hiperbilirrubinemia crônica que não estava associada à hemólise, descrevendo, então, a

síndrome de Dubin-Johnson (19,20). Esta, se caracteriza por um defeito de excreção biliar de ânions orgânicos, levando ao acúmulo de bilirrubina no plasma. Nesses casos a bilirrubinúria é comum (21). Já síndrome de Rotor é um distúrbio de armazenamento hepático, aonde a recaptação da bilirrubina conjugada é prejudicada, de forma que é secretada no sangue pelos hepatócitos, resultando em hiperbilirrubinemia (18).

## **2.2. Determinação da bilirrubina**

Em 1916, Van den Bergh e Mueller, relataram que o soro possuía duas formas diferentes de bilirrubina. Constataram, portanto, que a bilirrubina conjugada reage rapidamente com o ácido sulfanílico diazotizado, dando uma reação “direta”. A bilirrubina não conjugada necessita da adição de um acelerador, como metanol ou cafeína, dando uma reação “indireta” (22).

Isso ocorre porque a bilirrubina não conjugada, ou bilirrubina livre, possui uma ligação interna de hidrogênio que envolve todos os grupos polares, e confere à molécula uma estrutura de “telha”, sendo altamente insolúvel em pH fisiológico. Dessa forma, a bilirrubina não conjugada reage lentamente com o reagente diazo, necessitando da adição de aceleradores da reação. Já a bilirrubina conjugada, não possui ligações de hidrogênio e reage rapidamente mesmo na ausência de aceleradores, sendo chamada de “reação direta de Van den Bergh” (23).

Nessa reação, ocorre a quebra do grupo tetrapirrol da bilirrubina, em dois azodipirróis, para acoplar com o reagente diazo e formar azopigmentos dipirrólicos, que são facilmente medidos por espectrofotometria (1,23).

Várias modificações da reação de Van den Bergh vêm sendo utilizadas nos laboratórios clínicos para a determinação da bilirrubina e suas frações, tanto no soro, quanto na urina (24).

Atualmente, a determinação de bilirrubina urinária é realizada pelo método de diazotação, utilizando o emprego de tiras reagentes. Porém, antes da utilização das tiras reagentes, diferentes técnicas manuais surgiram e foram utilizadas para a determinação da bilirrubina conjugada na urina.

Uma dessas técnicas é o “teste de Harrison”. Esse método utiliza o reativo de Fouchet, que é composto por cloreto férrico 10% e ácido tricloroacético. Primeiramente adiciona-se na urina, cloreto de bário 10% que é capaz de precipitar a bilirrubina presente na amostra. Essa mistura é filtrada em papel filtro. Em seguida adiciona-se 2 gotas do reativo de Fouchet, que provoca a oxidação da bilirrubina em biliverdina, resultando em um produto de cor verde

cuja intensidade da coloração é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina na amostra (25,26). É um teste bastante sensível pois consegue fornecer resultados positivos a partir de 0,10 mg/dL (27). O resultado do teste é reportado como presença ou ausência de bilirrubina na amostra.

Outro método que pode ser utilizado, é o teste do lugol. Esse método consiste em adicionar um volume conhecido de urina em um tubo de ensaio. Em seguida, deve-se recobrir a urina com uma solução de álcool etílico 95% contendo iodo a 0,7%. O aparecimento de um anel esverdeado na interface entre os dois líquidos indica a presença de bilirrubina. O teste é sensível a partir de 0,3mg/dL - 1,0mg/dL e o resultado é reportado como presença ou ausência de bilirrubina na amostra (27).

Porém, por serem técnicas manuais são pouco utilizadas atualmente, de forma que o método empregado para determinação no soro e urina, é a diazotação (25).

### **2.3. Exame Qualitativo de Urina (EQU)**

O EQU é composto por três etapas: a análise física, onde observa-se o aspecto, a cor e densidade da urina; a análise química realizada pelo uso de tiras reagentes, que inclui a determinação do pH, e a dosagem semiquantitativa de proteínas, hemoglobina, glicose, bilirrubina, urobilinogênio, corpos cetônicos, nitrito e esterase leucocitária; e a sedimentoscopia, através da microscopia de campo claro, contraste de fase e luz polarizada, onde é feita a análise de elementos figurados como células epiteliais, hemácias, leucócitos, cristais, cilindros, lipídeos e microrganismos (4).

O emprego de técnicas automatizadas no EQU vêm sendo cada vez mais frequente nos laboratórios clínicos de grande porte, utilizando metodologias como a citometria de fluxo ou análise de imagens para a sedimentoscopia, como também a utilização de leitores automatizados para a análise físico-química. Dessa maneira, é possível reduzir prováveis erros analíticos e melhorar a qualidade de análise desse exame (28).

Ainda assim, a presença de resultados falsos positivos na tira reagente é comum.

O teste da tira reagente consiste em almofadas fixas a uma tira plástica, impregnadas com substâncias químicas específicas para cada analito. Dessa forma, quando a tira entra em contato com a urina, desenvolve-se uma reação de cor (25).

Na determinação de bilirrubina, ocorre o acoplamento em meio ácido com o reagente sal de diazônio, apresentando uma coloração característica. Os produtos comercializados podem diferir quanto ao sal de diazônio utilizado para o desenvolvimento da cor, podendo ser

2,6-diclorodiazônio tetrafluorborato ou 2,4-dicloroanilina diazônio, de forma que o emprego e interpretação dos resultados são fornecidos por cada fabricante (25).

O desenvolvimento de cor para mensurar a presença, ou não, de bilirrubina na urina, pode favorecer o aparecimento de resultados falsos positivos. Interferentes como a intensa coloração da amostra e a presença de medicamentos são causas frequentes de resultados falsos positivos. Esses resultados já foram detectados em pacientes recebendo grandes doses de clorpromazina, e também foi relatado que os metabólitos da fenazopiridina podem desenvolver cor avermelhada em pH ácido (25). Também foi reportado que os metabólitos do antiinflamatório não esteroideal etodolaco, podem reagir com o sal de diazônio empregado no método diazo, que é o comercializado atualmente (7).

### **3. HIPÓTESE**

Questão de pesquisa: entre os métodos existentes para confirmação de bilirrubina urinária, qual deles é mais rápido e eficiente para diferenciar os verdadeiros positivos dos falsos positivos?

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo geral**

Validar um método confirmatório para bilirrubina urinária.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Verificar qual a incidência de resultados falsos positivos para bilirrubina urinária através do Exame Qualitativo de Urina (EQU).
- Comparação de métodos confirmatórios para bilirrubina urinária.
- Definir um método rápido e eficiente para comprovar a bilirrubina positiva na tira reagente.

## **5. ASPECTOS ÉTICOS**

Este é um projeto de número CAAE 57750022.5.0000.5327 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Anexo 1).

Este estudo segue as normas internas para utilização de material biológico descartado em projetos de pesquisa realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O presente projeto apresenta riscos mínimos, visto que foram utilizadas apenas amostras biológicas, sem a participação direta dos pacientes. Todos os pesquisadores assinaram a declaração de conhecimento e cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados para pesquisas avaliadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Anexo 2), e nenhum colaborador desta pesquisa teve contato com os pacientes selecionados da rotina do laboratório de Bioquímica Clínica.

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Tendo em vista nossos objetivos iniciais, consideramos que fomos capazes de determinar e relatar os achados referentes à utilização da tira reagente e dos métodos confirmatórios propostos.

Concluimos que a determinação de bilirrubina urinária pela tira reagente precisa de um método confirmatório, e dentre eles, destacamos a dosagem de BD pelo ensaio colorimétrico, que mostrou uma melhor concordância com o método que foi considerado referência, o teste de Fouchet. Também ressaltamos que nestes métodos, não houve interferências como a cor da amostra ou a presença de urobilinogênio, o que minimiza a presença de resultados falsos positivos.

Dessa forma, se torna possível auxiliar o corpo clínico com mais confiança, no diagnóstico e também no acompanhamento dos pacientes com desordens hepáticas.

Para fins de validação da dosagem de BD por método colorimétrico, recomendamos a realização de um estudo com um número amostral maior, para definir o ponto de corte ideal e alcançar uma melhor correlação entre o número de cruces e a quantidade real de bilirrubina direta na urina.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fevery J. Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int.* 10 de abril de 2008;28(5):592–605.
2. Schmid R. Direct-Reacting Bilirubin, Bilirubin Glucuronide, in Serum, Bile, and Urine. *Science.* 13 de julho de 1956;124(3211):76–7.
3. Vasconcellos, L. Metabolismo das bilirrubinas e diagnóstico diferencial das icterícias. *ControlLab*; 2007.
4. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Realização de exames de rotina. 1ª edição. 2017. 17–61 p.
5. de Andrade O, da Cruz N, Ihara F. O exame de urina I e a importância de sua interpretação. *Sociedade de Pediatria de São Paulo*; 2020.
6. Kupka T, Binder LS, Smith DA, Nelson BK, Wainscott MP, Glass BA. Accuracy of urine urobilinogen and bilirubin assays in predicting liver function test abnormalities. *Ann Emerg Med.* novembro de 1987;16(11):1231–5.
7. Sho Y, Ishiodori T, Oketani M, Kubozono O, Nakamura A, Takeuchi A, et al. Effects of urinary metabolites of etodolac on diagnostic tests of bilirubin in urine. *Arzneimittelforschung.* julho de 1999;49(7):572–6.
8. Foley KF, Wasserman J. Are unexpected positive dipstick urine bilirubin results clinically significant? A retrospective review. *Lab Med.* 2014;45(1):59–61.
9. Gartner LM, Arias IM. Formation, Transport, Metabolism and Excretion of Bilirubin. *N Engl J Med.* 12 de junho de 1969;280(24):1339–45.
10. Sullivan JI, Rockey DC. Diagnosis and evaluation of hyperbilirubinemia. *Curr Opin Gastroenterol.* maio de 2017;33(3):164–70.
11. Fargo MV, Grogan SP, Saguil A. Evaluation of Jaundice in Adults. *Am Fam Physician.* 1º de fevereiro de 2017;95(3):164–8.
12. Khan RS, Houlihan DD, Newsome PN. Investigation of jaundice. *Medicine (Baltimore).* novembro de 2019;47(11):713–7.
13. Thomas M, Hardikar W, Greaves RF, Tingay DG, Loh TP, Ignjatovic V, et al. Mechanism of bilirubin elimination in urine: insights and prospects for neonatal jaundice. *Clin Chem Lab Med CCLM.* 26 de maio de 2021;59(6):1025–33.
14. Robinson S, Vanier T, Desforges JF, Schmid R. Jaundice in thalassemia minor: a consequence of “ineffective erythropoiesis”. *N Engl J Med.* 1962;267:523.
15. Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Classification and causes of jaundice or

- asymptomatic hyperbilirubinemia. Waltham, Mass: UpToDate. 2022;
16. Roy-Chowdhury J, Roy-Chowdhury N, Wang X. Gilbert syndrome and unconjugated hyperbilirubinemia due to bilirubin overproduction. Waltham, Mass: UpToDate. 2022;
  17. Fretzayas A, Moustaki M, Liapi O, Karpathios T. Gilbert syndrome. *Eur J Pediatr.* janeiro de 2012;171(1):11–5.
  18. Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D. Inherited Disorders of Bilirubin Transport and Conjugation: New Insights Into Molecular Mechanisms and Consequences. *Gastroenterology.* junho de 2014;146(7):1625–38.
  19. DUBIN I, JOHNSON F. Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases. *Medicine (Baltimore).* 1954;155–96.
  20. Sprinz H, Nelson R. Persistent non-hemolytic hyperbilirubinemia associated with lipochrome-like pigment in liver cells: report of four cases. *Ann Intern Med.* 1954;952–62.
  21. Roy-Chowdhury J, Roy-Chowdhury N. Inherited disorders associated with conjugated hyperbilirubinemia. Waltham, Mass: UpToDate. 2022;
  22. Van den Bergh AA, Mueller P. Ueber eine direkte und eine indirekte Diazoreaktion auf Bilirubin. *Biochemische Zeitschrift.* 1916;(77):90–103.
  23. Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Bilirubin metabolism. Waltham, Mass: UpToDate. 2022;
  24. Chowdhury J, Chowdhury N. Conjugation and Excretion of Bilirubin. *Semin Liver Dis.* fevereiro de 1983;3(01):11–23.
  25. Motta VT. *Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações.* Volume 16. Rim e Função Renal:247–70.
  26. Godfried EG. Clinical tests for bilirubin in urine. *Biochem J.* 1934;2056–60.
  27. A. Mundt L, Shanahan K. *Exame de urina e de fluidos corporais de Graff.* 2ª edição. Artmed; 2012. 354 p.
  28. Oyaert M, Delanghe J. Progress in Automated Urinalysis. *Ann Lab Med.* janeiro de 2019;39(1):15–22.

## **ANEXOS**

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Padronização de um método confirmatório para bilirrubina urinária e avaliação do impacto de falsos positivos

**Pesquisador:** FERNANDA HERMES HICKMANN

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 57750022.5.0000.5327

**Instituição Proponente:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**Patrocinador Principal:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.420.564

**Apresentação do Projeto:**

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo das Informações Básicas da Pesquisa PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1911846.pdf, de 11/05/2022.

A bilirrubina é um produto obtido a partir da degradação da hemoglobina e em alguns processos patológicos pode ser excretada na urina, sendo útil como um marcador para detecção de doenças hepáticas ou da bile, sugerindo a necessidade de investigação. O rastreamento de bilirrubina urinária pode ser utilizado com o objetivo de realizar uma triagem da função hepática e do trato biliar, a fim de detectar precocemente uma condição patológica. A partir de um resultado positivo para bilirrubina urinária, pode ser solicitado um painel de funções hepáticas. A determinação de bilirrubina urinária é realizada através do teste da tira reagente no Exame Qualitativo de Urina (EQU), que caso seja positivo apresenta uma reação de cor avermelhada. Dessa maneira, resultados falsos negativos podem ocorrer, devido a presença de ácido ascórbico e a exposição prolongada à luz, e falsos positivos são muito comuns, devido a interferentes fisiológicos ou patológicos, como a coloração da amostra, a presença do metabólito indoxilsulfato proveniente da dieta, e a presença de medicamentos como rifampicina,

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4

**Bairro:** Rio Branco

**CEP:** 90.440-000

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-6246

**Fax:** (51)3359-6246

**E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.420.564

clorpromazina, fenazopiridina e etodolaco. Sendo assim, é necessário diferenciar os resultados positivos para bilirrubina na tira reagente dos resultados falso-positivos, de modo a comparar com um método de referência, no intuito de definir um método rápido, fácil e com bom custo benefício para confirmar os resultados positivos. E

ainda, avaliar qual foi o impacto clínico dos resultados falsos positivos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Validar um método confirmatório para bilirrubina urinária e avaliar o impacto dos resultados falsos positivos na conduta clínica.

Objetivo Secundário:

Verificar qual a incidência de resultados falsos positivos para bilirrubina urinária através do Exame Qualitativo de Urina (EQU).

Analisar qual o impacto dos resultados positivos na conduta clínica.

Comparação de métodos confirmatórios para bilirrubina urinária.

Definir um método rápido, eficiente e com bom custo benefício para comprovar a bilirrubina positiva na tira reagente.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Este estudo seguirá as normas internas para utilização de material biológico descartado em projetos de pesquisa realizados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Este projeto apresenta riscos mínimos, visto que utilizará apenas amostras biológicas, sem a participação direta dos pacientes. Todos os pesquisadores assinaram a declaração de conhecimento e cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados para pesquisas avaliadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e nenhum colaborador desta pesquisa terá contato com os pacientes selecionados da rotina do laboratório de Bioquímica Clínica.

Benefícios:

Garantir um resultado fidedigno ao quadro clínico do paciente, auxiliando em questões

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4

**Bairro:** Rio Branco

**CEP:** 90.440-000

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-6246

**Fax:** (51)3359-6246

**E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.420.564

diagnósticas e tratamentos.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Coleta dos dados

Serão utilizadas amostras de conveniência de pacientes da rotina da Unidade de Bioquímica Clínica, que apresentarem solicitação para dosagem de EQU. As amostras serão selecionadas somente após processamento e finalização do exame, ao ser encaminhada para futuro descarte. Os pacientes que atenderem aos critérios de inclusão, terão seus resultados acessados e armazenados em banco de dados, e as amostras de urina serão submetidas a posterior confirmação por três diferentes métodos.

A confirmação envolve a realização da técnica do teste de Fouchet, o teste do lugol e a dosagem da bilirrubina urinária por ensaio colorimétrico no equipamento Alinity C-series, oriundo da Unidade de Bioquímica Clínica.

O teste de Fouchet será realizado da seguinte maneira: primeiramente, deve-se preparar o reativo de Fouchet, que é composto por cloreto férrico 10% e ácido tricloroacético; em seguida, adiciona-se em um tubo de ensaio a urina e cloreto de bário 10% em partes iguais, essa mistura é então filtrada em papel filtro. O cloreto de bário é capaz de precipitar a bilirrubina presente na amostra. Sobre o precipitado é adicionado 2 gotas do reativo de Fouchet, que irá oxidar a bilirrubina produzindo a cor verde (14).

Para a prática do teste do lugol, adiciona-se 2 mL de urina em tubo de ensaio e 2 mL da solução de lugol, introduzindo a pipeta até o fundo no tubo, escoando lentamente e sem agitação. O aparecimento de um anel verde indica a presença de bilirrubina (15).

Os reagentes utilizados nos testes de Fouchet e do lugol serão conservados em frascos âmbar, em temperatura ambiente e têm sua validade indeterminada.

Para obtenção do valor de bilirrubina sérica, será realizada uma pesquisa no sistema interno do laboratório para verificar se o paciente possui solicitação para este exame. Caso exista este dado, o mesmo será transcrito para o estudo. Para os pacientes que não tenham a solicitação, a amostra de soro será dosada.

Serão obtidos do prontuário dos pacientes informações referentes ao sexo, idade e a existência de doenças hepatobiliares.

Após a realização dos testes descritos acima, será feita uma análise, pelo prontuário, da conduta clínica tomada após o resultado positivo de bilirrubinúria, com a finalidade de avaliar o

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4

**Bairro:** Rio Branco

**CEP:** 90.440-000

**UF:** RS

**Município:** PORTO ALEGRE

**Telefone:** (51)3359-6246

**Fax:** (51)3359-6246

**E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.420.564

impacto dos possíveis resultados falsos positivos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Solicita dispensa de TCLE.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

As pendências emitidas para o projeto no parecer N.º foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 11/05/2022. Não apresenta novas pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS N.º 466/2012 e na Norma Operacional CNS/Conep N.º 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

- O projeto está aprovado para inclusão ou revisão de registros de 60 participantes neste centro.
- Deverão ser apresentados relatórios semestrais e um relatório final.
- Os projetos executados no HCPA somente poderão ser iniciados quando seu status no sistema AGHUse Pesquisa for alterado para "Aprovado", configurando a aprovação final da Diretoria de Pesquisa.
- Textos e anúncios para divulgação do estudo e recrutamento de participantes deverão ser submetidos para apreciação do CEP, por meio de Notificação, previamente ao seu uso. A redação deverá atender às recomendações institucionais, que podem ser consultadas na Página da Pesquisa do HCPA.
- Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular N.º 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE  
PORTO ALEGRE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
RIO GRANDE DO SUL - HCPA  
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.420.564

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1911846.pdf	11/05/2022 10:50:01		Aceito
Outros	PendenciasCEP.docx	11/05/2022 10:49:36	FERNANDA HERMES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_TCR.pdf	08/04/2022 17:06:48	FERNANDA HERMES HICKMANN	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_20220127_Fernanda.pdf	31/03/2022 12:02:34	FERNANDA HERMES	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 20 de Maio de 2022

---

**Assinado por:  
Têmis Maria Félix  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4  
**Bairro:** Rio Branco **CEP:** 90.440-000  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3359-6246 **Fax:** (51)3359-6246 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

Anexo 2

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HCPA

DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO E CUMPRIMENTO DA LEI GERAL DE  
PROTEÇÃO DE DADOS PARA PESQUISAS AVALIADAS PELO CEP HCPA

**Título do projeto:** Padronização de um método confirmatório para bilirrubina urinária e avaliação do impacto de falsos positivos

Os pesquisadores declaram conhecer e cumprir os requisitos da Lei Geral de Proteção de Dados (Lei Nº 13.709, de 14 de agosto de 2018) quanto ao tratamento de dados pessoais e dados pessoais sensíveis que serão utilizados para a execução do presente projeto de pesquisa.

Declaram estar cientes que o acesso e o tratamento dos dados deverão ocorrer de acordo com o descrito na versão do projeto aprovada pelo CEP HCPA.

Nome	Assinatura
Roberta Barbizan Mascarello	<u>Roberta B. Mascarello</u>
Fernanda Hermes Hickmann	<u>Fernanda H. Hickmann</u>
Priscila Aparecida Correa Freitas	<u>Priscila Correa Freitas</u>
Josiane Bordignon	<u>Josiane Bordignon</u>
Mariana Manganelli Remus	<u>Mariana M. Remus</u>
Janaina Aparecida Risczik Arruda Correa	<u>Janaine Arruda Correa</u>
Aline Aparecida Zonin dos Passos	<u>Aline Zonin</u>

Data: 07/10/2021