

REF 10207-4 4 x 29 ml / 8 ml

BILIRUBINA TOTALE (TBIL)

Flaconi ciascuno contenente 29 ml di reagente R1 e 8 ml di reagente R2.

USO PREVISTO

Il reagente EasyRA TIBL è indicato per la misurazione quantitativa della bilirubina totale (TBIL) nel siero o plasma umani di adulti, utilizzando l'analizzatore chimico clinico MEDICA EasyRA®. Le misurazioni della bilirubina trovano applicazione nella diagnosi e nella cura di patologie epatiche, emolitiche, ematologiche e metaboliche, tra cui le epatite e blocchi della cistifellea.

Solo per uso diagnostico *in vitro*. Solo per uso professionale

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

La bilirubina è un pigmento formato da emoglobina e presente nel siero come conseguenza della distruzione dei globuli rossi. Un accresciuto livello di bilirubina può essere il risultato di processi emolitici, patologie epatiche o disturbi dell'apparato biliare. La bilirubina si presenta in due forme: non coniugata (indiretta) e coniugata (diretta). La bilirubina non coniugata viene trasportata al fegato, dove si lega all'albumina e diventa coniugata (diretta) con l'acido glucuronico, il quale viene infine espulso. La bilirubina non coniugata non è solubile in soluzione acquosa e per essere solubilizzata sono necessari alcoli e altri solventi. Le analisi che prevedono questi tipi di solventi forniscono la quantità di bilirubina totale. I coniugati della bilirubina mono e diglucuronide sono idrosolubili e le analisi di questo tipo misurano al bilirubina diretta. Il metodo tradizionale implica la reazione della bilirubina con un reagente diazo (ad es. il sale 2,4-diclorofenildiazonio) per formare il composto colorato azo-bilirubina. Per accelerare la reazione e la formazione del composto azo-bilirubina sono stati aggiunti diversi additivi quali etanolo,¹ caffeina² e DMSO.³ È stata anche prevista l'aggiunta di tensioattivi come agenti solubilizzanti.⁴

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Questo metodo di reazione a punto finale misura la bilirubina totale (coniugata e non coniugata) legandosi, in presenza di tensioattivo, al sale 2,4-diclorofenildiazonio per formare azo-bilirubina.



L'aumento dell'assorbanza a 550 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di bilirubina totale del campione.

REAGENTI

Reagente per bilirubina totale (R1):

NaCl	154 mmol/l
HCL	190 mmol/l
Tensioattivi e conservanti	

Reagente per bilirubina totale (R2):

HCL	417 mmol/l
sale 2,4-diclorofenildiazonio	5 mmol/l

Tensioattivo

Precauzioni

1. Seguire sempre buone prassi di sicurezza di laboratorio quando si maneggiano reagenti di laboratorio. (NCCLS, GP17-A2).
2. I reagenti (R1 e R2) sono soluzione acide. NON inalare né ingerire ed evitare qualunque contatto con occhi e pelle. In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico. In caso di contatto accidentale con la pelle, risciacquare immediatamente con acqua per 10 minuti. In caso di ingestione, consultare immediatamente un medico. Per informazioni su rischi, pericoli e sicurezza fare riferimento alle schede di sicurezza (SDS).
3. Come per qualunque altra procedura di test diagnostico, i risultati devono essere interpretati alla luce dei risultati prodotti da altri test e dello stato clinico del paziente.
4. Non utilizzare cuvette lavate.

ISTRUZIONI PER LA MANIPOLAZIONE, LA CONSERVAZIONE E LA STABILITÀ DEL REAGENTE

Il reagente viene fornito pronto all'uso. Il reagente in confezione chiusa si mantiene stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta se conservato ad una temperatura di 2-8 °C. Il reagente rimane stabile on-board nel vano reagenti refrigerato nell'analizzatore EasyRA per il numero di giorni programmati sul chip RFID del flacone del reagente. Non usare il reagente qualora questo si presenti torbido od opaco o nel caso in cui non riesca a recuperare i valori noti di controllo del siero.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI/STABILITÀ

È necessario usare siero o plasma puliti non emolizzati. Proteggere i campioni dall'esposizione diretta alla luce solare e artificiale in quanto la bilirubina diretta (non coniugata) è instabile.⁵ Il test deve essere eseguito entro 5 ore dal prelievo, in quanto la bilirubina nel campione è instabile. Se il campione non può essere analizzato entro questo tempo, è possibile conservarlo per 3 giorni a 2-8 °C.⁶ I campioni possono anche essere conservati per 3 mesi a -70 °C. Per la raccolta di plasma è possibile utilizzare provette rivestite di litio eparina.

PROCEDURA

Materiale fornito

Flacone di reagente per bilirubina totale Medica, REF 10207

Ulteriore materiale necessario

Medica EasyCal Chimica, REF 10651

Medica EasyQC® Chimica/Elettroliti – Livello A, REF 10793

Medica EasyQC Chimica/Elettroliti – Livello B, REF 10794

Flacone per analisi colorimetrica di precisione Medica, REF 10764

Flacone di detergente Medica – Chimica e ISE, REF 10660, *oppure*

Flacone di detergente – Chimica, REF 10661

Istruzioni per l'uso

Il reagente viene fornito pronto all'uso. Rimuovere il tappo e collocare il reagente nel piatto reagenti dell'analizzatore EasyRA situato nell'area reagenti refrigerata. Il reagente aperto è stabile on-board nella zona reagenti refrigerata dell'analizzatore EasyRA per il numero di giorni programmato sul chip RFID sul flacone del reagente (28 giorni al massimo) o quando rimosso e conservato refrigerato a 2-8 °C (tappato) dopo la prima apertura.

Nota: verificare che non sia presente schiuma nella parte interna del collo del flacone dopo aver rimosso il tappo e aver collocato il flacone sull'analizzatore. Qualora fosse presente schiuma, rimuoverla con un tampone o una pipetta monouso prima di eseguire il test. Usare pipette monouso o tamponi diversi per i reagenti R1 e R2.

Calibrazione

Per la calibrazione dell'analisi si consiglia Medica EasyCal Chimica (REF 10651). L'intervallo di calibrazione (7 giorni massimo) è programmato sul chip RFID posto sul flacone del reagente. Ogni qual volta il numero di lotto del reagente cambia o si verifica uno spostamento nei valori di controllo qualità è necessario eseguire nuovamente la calibrazione.

Controllo qualità

Si consiglia di eseguire due livelli di controllo del siero umano (normale e anomalo) con l'analisi giornalmente qualora vengano effettuati test sui pazienti e ogni qual volta il lotto di reagenti cambia. Il mancato raggiungimento dell'intervallo corretto di valori nel test del materiale di controllo può essere indice di deterioramento del reagente, malfunzionamento dello strumento o errori procedurali. Quando viene utilizzato il materiale di controllo qualità, il laboratorio deve inoltre attenersi alla normativa locale, nazionale e federale in materia di controllo di qualità.

Risultati

Dopo aver completato l'analisi, l'analizzatore chimico Medica EasyRA estrapola la concentrazione di bilirubina totale dal rapporto tra l'assorbanza corretta del campione sconosciuto e l'assorbanza corretta del calibratore moltiplicato per il valore del calibratore.

$$TBIL \text{ (mg/dl)} = \frac{[(A_{U_{550}} - A_{U_{600}}) - (A_{RBIk_{550}} - A_{RBIk_{600}})] - [(A_{U_{550}} - A_{U_{600}}) SBIk - (A_{RBIk_{550}} - A_{RBIk_{600}}) SBIk] \times dF}{[(A_{C_{550}} - A_{C_{600}}) - (A_{RBIk_{550}} - A_{RBIk_{600}})] - [(A_{C_{550}} - A_{C_{600}}) SBIk - (A_{RBIk_{550}} - A_{RBIk_{600}}) SBIk] \times dF} \times CalValue$$

Dove A_U e A_C indicano rispettivamente i valori di assorbanza del campione sconosciuto e del calibratore; A_{RBIk} indica l'assorbanza del bianco reagente; $SBIk$ indica il bianco campione; e "Cal Value" indica la concentrazione di bilirubina totale nel calibratore (mg/dl). Poiché il volume della reazione viene modificato dall'aggiunta ritardata del reagente R2, nel calcolo è compreso un fattore di correzione della diluizione (dF).

Il bianco campione viene corretto per la differenza del fattore di diluizione introdotta usando R1 invece di (R1 e R2) nel modo seguente:

$$dF = \frac{Vol \text{ reag}_1 + Vol. \text{ dil.} + Vol. \text{ camp.}}{Volume \text{ totale}}$$

Valori Attesi¹⁰

L'intervallo di riferimento per la bilirubina totale serica è il seguente:

Adulti: 0,2-1,0 mg/dl

Tali valori rappresentano esclusivamente delle linee guida consigliate. Si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire il proprio intervallo di valori normali, in quanto esistono differenze tra strumenti, laboratori e popolazioni locali.

Limiti procedurali (ad es. se il campione è al di sopra dell'intervallo di misura)

Usare esclusivamente campioni di siero o plasma non emolizzati. Questo test non è stato valutato nei neonati.

L'analizzatore EasyRA evidenzia qualunque risultato al di sopra di 20 mg/dl come "LH" (linearità alta). Se l'icona di "Riesecuzione" viene selezionata, è possibile che il campione venga ritestato utilizzando la metà (1/2) del volume del campione. I risultati del test rieseguito vengono calcolati tenendo conto dell'uso di volumi inferiori del campione. In tal modo l'intervallo accettabile del test della bilirubina totale viene esteso a 40 mg/dl.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE⁹

Intervallo accettabile

L'intervallo accettabile è compreso tra 0,08 e 20 mg/dl. L'intervallo esteso è compreso tra 0,08 e 40 mg/dl quando viene utilizzata la metà del campione (fattore di diluizione 1:1).

Imprecisione/Correlazione (CLSI, EP9-A2)

La tabella seguente elenca i dati ottenuti in un confronto del reagente per bilirubina totale Medica (y) su un analizzatore EasyRA con la prestazione di un reagente per bilirubina totale simile (x) sull'analizzatore Roche COBAS MIRA. I dati di seguito illustrati rappresentano le singole determinazioni ottenute sull'analizzatore EasyRA a fronte della media di 2 valori ripetuti ottenuti sull'analizzatore Roche COBAS MIRA.

Numero di campioni	65	Intervallo dei campioni	da 0,05 a 19,8 mg/dl
Pendenza	1,0043	Intercetta y	-0,1966
Coefficiente di correlazione	0,9957	Equazione di regressione:	$Y = 1,0043 * X - 0,1966$

* Cobas Mira è un marchio registrato di Roche Diagnostics, INC., Indianapolis, IN.

La tabella seguente elenca i dati ottenuti in un confronto di campioni corrispondenti di siero (x) e di plasma (y) utilizzando il reagente per bilirubina totale Medica sull'analizzatore EasyRA. I dati seguenti rappresentano una singola determinazione del plasma rispetto alla media di due campioni di siero ripetuti.

Numero di campioni	62	Intervallo dei campioni	da 0,17 a 16,78 mg/dl
Pendenza	0,9952	Intercetta y	-0,0079
Coefficiente di correlazione	0,9998	Equazione di regressione	$Y = 0,9952 * X - 0,0079$

Imprecisione (CLSI, EP5-A2)

Le misurazioni duplicate di ciascuno dei tre livelli di materiale di controllo qualità sono state analizzate due volte al giorno per 20 giorni. Da questi dati sono state determinate sia la precisione intra-serie che quella totale.

Imprecisione intra-serie:

Livello QC mg/dl	SD intra-serie mg/dl	CV intra-serie %
3,36	0,02	0,67
1,66	0,02	1,13
0,44	0,01	2,64

Imprecisione totale:

Livello QC mg/dl	SD imprecisione totale mg/dl	CV imprecisione totale %
3,36	0,05	1,35
1,66	0,03	2,09
0,44	0,02	3,81

Linearità (CLSI, EP6-A)⁹

Lineare da 0,08 a 20 mg/dl basata sulla regressione lineare $Y = 0,98 * X + 0,0921$.

Limite di vuoto:	0,04 mg/dl	(CLSI, EP17-A)
Limite di rilevamento:	0,06 mg/dl	(CLSI, EP17-A)
Limite di quantificazione:	0,05 mg/dl	(CLSI, EP17-A)

Sostanze interferenti (CLSI, EP7-A)

Le interferenze inferiori al 10% sono state classificate come "non significative".

L'interferenza con livelli di emoglobina superiori a 125 mg/dl si presenta significativa.

Potrebbe verificarsi un'interferenza significativa con i trigliceridi. Non utilizzare campioni lipemici.

È stata riscontrata interferenza positiva clinicamente significativa da parte del verde indocianina.

Campioni contenenti livelli elevati di immunoglobulina M (IgM) o campioni di pazienti con macroglobulinemia di Waldenström possono produrre risultati non affidabili.

Young fornisce un elenco di medicinali e altre sostanze che interferiscono con i test chimici clinici.⁷

Riferimenti

1. Malloy H.T. and Evelyn, K.A., *The Determination of Bilirubin with the Photoelectro Colorimeter.*, J.Biol. Chem 119:481-490 (1973).
2. Jendrassik, L and Grof.P. *Vereinfachte, Photometrische Methoden zur Bestimmung des Blubilirubins*, Biochem. A. 297: 81-89 (1938).
3. Walters, M. and Gerarde, H. *An Ultramicromethod for the Determination of Conjugated and Total Bilirubin in Serum or Plasma*. Microchem. J. 15:231-243 (1970).
4. Winsten, J. and Cehelyk, B., *A Rapid Micro Diazo Technique for Measuring Total Bilirubin.*, Clin. Chem. Acta 25: 441-446 (1969).
5. Henry, R.J. *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, Hagerstown, MD: Harper and Row, Publishers 1974:1058.
6. Tietz NW. *Textbook of Clinical Chemistry*, WB Saunders and Co., Philadelphia, PA, 1986: p1388.
7. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4th ed. Washington, DC: AACC Press; 1995.
8. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC. AACC Press; 1997.
9. Dati in archivio presso Medica.
10. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R. (Eds), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
11. NCCLS EP9-P
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards, *User Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices* (NCCLS) Document EP5-T2 (ISBN 1-56238-145-8), 1992.

Parametri dell'analisi EasyRA (TBIL)

Lunghezza d'onda principale (nm)	550
Lunghezza d'onda secondaria (nm)	600
Tipo di reazione	Punto finale (2)
Direzione di reazione	Aumento
Bianco reagente	Sì (con ciascuna calibrazione)
Bianco campione	Sì
Tempo di reazione	5,6 min
Intervallo di calibrazione (massimo)	7 giorni
Stabilità on-board del reagente	28 giorni

Siero/Plasma

Volume del campione (µl)	8,0
Volume del diluente 1 (µl)	15
Volume del diluente 2 (µl)	15
Volume del reagente R1 (µl)	150
Volume del reagente R2 (µl)	38
Posizioni decimali (predefinite)	2
Unità (valori predefiniti)	mg/dl
Fattore di diluizione	1:1 (per estendere l'intervallo di misurazione)
Linearità	da 0,08 a 20 mg/dl



Medica Corporation, 5 Oak Park Drive
Bedford, Massachusetts 01730-1413 USA



Emergo Europe, Westervoortsewijk 60
6827 AT Arnhem, The Netherlands