

REF 10212-4 4 x 29 mL / 8 mL

DIREKTES BILIRUBIN (DBIL)

Die Patronen enthalten jeweils ein Nutzvolumen von 29 mL R1-Reagens und 8 mL R2-Reagens.

VERWENDUNGSZWECK

Das EasyRA-DBIL-Reagens ist für die quantitative Bestimmung von direktem Bilirubin im menschlichen Serum und Plasma von Erwachsenen anhand des klinischen MEDICA EasyRA-Analysators vorgesehen. Bilirubin wird bei der Diagnose und Behandlung von Leber-, hämolytischen, hämatologischen und Stoffwechselerkrankungen, darunter Hepatitis und Gallenkolik, gemessen.

Es ist nur für die *In-vitro*-Diagnose und den professionellen Einsatz bestimmt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Bei Bilirubin handelt es sich um ein Pigment, das aus Hämoglobin entsteht und als Ergebnis der Zerstörung von roten Blutkörperchen im Serum enthalten ist. Ein erhöhter Bilirubinwert kann auf hämolytische Prozesse, ein Leberleiden oder Erkrankungen des Gallengangs zurückzuführen sein. Bilirubin existiert in zwei Formen: nichtkonjugiert (indirekt) und konjugiert (direkt). Nichtkonjugiertes Bilirubin wird zur Leber transportiert, wo es von Albumin gebunden und so mit Glukuronsäure konjugiert (direkt) wird. Das Produkt wird schließlich ausgeschieden. Nichtkonjugiertes Bilirubin ist in einer wässrigen Lösung nicht löslich. Zur Solubilisierung sind Alkohole und andere Lösungsmittel erforderlich. In Tests, bei denen diese Lösungsmittelarten zum Einsatz kommen, kann die Gesamtmenge an Bilirubin ermittelt werden. Bilirubinmono- und -diglukuronidkonjugate sind wasserlöslich. Bei Tests mit diesen Verbindungen wird direktes Bilirubin gemessen. Bei der Standardmethode nach Ehrlich¹ reagiert Bilirubin mit einem Diazoreagens (z. B. diazotierte Sulfanilsäure), wobei die farbige Verbindung Azobilirubin entsteht. Bei diesem Test wird direktes (konjugiertes) Bilirubin auf Grundlage der Verbindung mit einem Diazoniumsalz in Gegenwart einer Sulfaminsäure zu Azobilirubin.

PRINZIP

Diese Endpunktreaktion basiert auf dem Einsatz von 2,4-Dichlorphenyldiazoniumsalz als Diazoreagens:

Direktes Bilirubin + 2,4-Dichlorphenyldiazonium → Azobilirubinsalz

Direktes Bilirubin (konjugiert) verbindet sich mit dem Diazoreagens, wobei Azobilirubin entsteht. Die Absorbanzerhöhung, die bei 550 nm gemessen wird, ist proportional zur Konzentration des direkten Bilirubins.

REAGENZIEN

DBIL-Reagens (R1):

EDTA-Na ₂	0,1 mmol/L
NaCl	154 mmol/L
Sulfaminsäure	100 mmol/L

DBIL-Reagens (R2):

2,4-Dichlorphenyldiazoniumsalz	5 mmol/L
HCl	0,9 mol/L
EDTA-Na ₂	0,13 mmol/L

Vorsichtsmaßnahmen

1. Die „Gute Laborpraxis“ sollte bei der Handhabung jeglicher Laborreagenzien befolgt werden (CLSI, GP17-A2).
2. Auf KEINEN Fall einatmen oder einnehmen. Kontakt mit Haut und Augen vermeiden. Bei Kontakt mit Augen sofort mit viel Wasser ausspülen und einen Arzt konsultieren. Bei Hautkontakt sofort 10 Minuten lang mit Wasser abspülen. Wenn verschluckt, unverzüglich ärztliche Hilfe aufsuchen. Informieren Sie sich im Sicherheitsdatenblatt über Risiken, Gefahren und Sicherheit.
3. Wie bei Diagnosetests üblich sollte die Auswertung der Ergebnisse unter Beachtung aller Testergebnisse und des klinischen Status des Patienten erfolgen.
4. Verwenden Sie keine gewaschenen Küvetten.

ANWEISUNGEN ZUR HANDHABUNG, LAGERUNG UND STABILITÄT DES REAGENS

Das Reagens wird gebrauchsfertig geliefert. Ungeöffnetes Reagens ist bis zum Verfallsdatum auf dem Etikett stabil, wenn es bei einer Temperatur von 2–8 °C gelagert wird. Das Reagens ist im gekühlten Reagensbereich des EasyRA-Analysators über den Zeitraum stabil, der auf dem RFID-Chip der Reagenspatrone programmiert ist. Verwenden Sie das Reagens nicht, wenn es trübe bzw. unklar ist und/oder nicht in der Lage ist, bekannte Kontrollwerte für Serum wiederherzustellen.

PROBENENTNAHME UND LAGERUNG/STABILITÄT

Zu verwenden ist klares, nicht hämolysiertes Serum oder Plasma. Proben vor direkter Sonneneinstrahlung und künstlichen Lichtquellen schützen, da direktes (nichtkonjugiertes) Bilirubin instabil² ist. Der Test sollte innerhalb von 2 Stunden nach der Probenentnahme erfolgen, da Bilirubin in der Probe instabil ist. Ist die Einhaltung dieses Zeitraums nicht möglich, Proben bei 2–8 °C³ bis zu 3 Tage lagern. Die Proben können bei –70 °C auch 3 Monate gelagert werden. Mit Lithiumheparin beschichtete Röhrchen können für die Plasmasammlung verwendet werden.

PROZEDUR

Bereitgestellte Materialien

Medica-DBIL-Reagenspatrone, REF 10212

Zusätzlich erforderliche Materialien

Medica-EasyCal-Testsubstanz, REF 10651

Medica-EasyQC®-Testsubstanz/Elektrolyte – Stufe A, REF 10793

Medica-EasyQC-Testsubstanz/Elektrolyte – Stufe B, REF 10794

Medica-Präzisionstest-Farbstoffpatrone, REF 10764

Medica-Reinigungspatrone – Testsubstanz + ISE, REF 10660 oder

Medica-Reinigungspatrone – Testsubstanz, REF 10661

Gebrauchsanweisung

Das Reagens wird gebrauchsfertig geliefert. Entfernen Sie den Deckel und geben Sie das Reagens in die Reagensschale des EasyRA-Analysators im Reagensbereich. Geöffnetes Reagens ist im gekühlten Reagensbereich des EasyRA-Analysators über den Zeitraum stabil, der auf dem RFID-Chip der Reagenspatrone programmiert ist (max. 30 Tage), oder wenn es herausgenommen und nach dem ersten Öffnen gekühlt und mit dem Deckel verschlossen bei 2–8 °C gelagert wird.

Hinweis: Überprüfen Sie das Innere der Patronenhäule auf Schaum, nachdem Sie die Deckel entfernt und die Patrone in den EasyRA-Analysator eingesetzt haben. Entfernen Sie etwaigen Schaum mit einem Tupfer oder einer Einwegpipette, bevor Sie den Test durchführen. Verwenden Sie für R1 und R2 verschiedene Tupfer und Einwegpipetten.

Kalibration

Medica-EasyCal-Testsubstanz (REF 10651) wird für die Kalibration des Tests empfohlen. Das Kalibrationsintervall (max. 30 Tage) ist auf dem RFID-Chip der Reagenspatrone programmiert. Eine Neukalibration ist immer dann erforderlich, wenn sich die Reagens-Chargennummer ändert oder sich Qualitätskontrollwerte verschieben.

Qualitätskontrolle

Es wird empfohlen, täglich bei jedem Patiententest und bei jedem Wechsel der Reagens-Charge zwei Stufen menschlicher, serumbasierter Kontrollsubstanzen (normal und abnorm) mit dem Test durchzuführen. Befinden sich die Werte bei dem Durchlauf der Kontrollsubstanzen außerhalb des gültigen Wertebereichs, kann dies auf Reagensverfall, eine Instrumentenfehlfunktion oder Verfahrensfehler zurückzuführen sein. Bei der Verwendung von Kontrollsubstanzen sollte das Labor Qualitätskontrollrichtlinien auf lokaler, Landes- und Bundesebene befolgen.

Ergebnisse

Nach Abschluss des Tests berechnet der EasyRA-Analysator die Konzentration des direkten Bilirubins über das Verhältnis der korrigierten Absorbanz (abzüglich der Absorbanz von Blindreagens und Blindprobe) der Probe zur auf ähnliche Weise korrigierten Absorbanz des Kalibrators (nach Subtraktion der Absorbanz von Blindreagens und Blindprobe) multipliziert mit der Konzentration des Kalibrators.

$$\text{DBIL (mg/dL)} = \frac{[(A_{U550} - A_{U700}) - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})] - [(A_{U550} - A_{U700})_{SBIK} - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})_{SBIK}] \times dF}{[(A_{C550} - A_{C700}) - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})] - [(A_{C550} - A_{C700})_{SBIK} - (A_{RBIK550} - A_{RBIK700})_{SBIK}] \times dF} \times \text{Kal. - Wert}$$

A_U ist die Absorbanz der Unbekannten, A_{RBIK} die Absorbanz des zur unbekannten Probe gehörenden Blindreagens. $SBIK$ ist die Absorbanz der zur unbekannten Probe gehörenden Blindprobe. Alle Absorbanzwerte mit einem tiefgestellten „C“ gehören zum Kalibrator. Aufgrund der verzögerten Zugabe des R2-Reagens fließt ein Verdünnungskorrekturfaktor (dF) in die Berechnung mit ein.

Erwartungswerte³

Der Bezugsbereich für DBIL im Serum stellt sich wie folgt dar:

Erwachsene: 0,0–0,20 mg/dL (0,0–3,4 µmol/L)

Bei diesen Werten handelt es sich um Richtlinien. Dabei ist es wichtig, dass jedes Labor eigene Erwartungswertebereiche festlegt, da zwischen Instrumenten, Labors und der lokalen Bevölkerung Unterschiede bestehen.

Verfahrensbeschränkungen (z. B. wenn Probe über Testbereich)

Zu verwenden sind ausschließlich nicht hämolysierte Serum- oder Plasmaproben. Dieser Test wurde noch nicht für Neugeborene beurteilt.

Der EasyRA-Analysator kennzeichnet jedes Ergebnis über 10 mg/dL als „Linearität hoch“ (LH). Über das „Wiederholen“-Symbol kann die Probe unter Verwendung der Hälfte (1/2) des Probenvolumens erneut getestet werden. Bei den Ergebnissen wird das kleinere Probenvolumen mit einberechnet. Dies erweitert den möglichen Bereich des DBIL-Tests auf 20 mg/dL.

LEISTUNGSDATEN⁴

Möglicher Bereich

Der mögliche Bereich erstreckt sich von 0,06 bis 10 mg/dL. Der erweiterte Bereich reicht von 0,06 bis 20 mg/dL, wenn die Hälfte der Probe verwendet wird (1:1-Verdünnung).

Ungenauigkeit/Korrelation (CLSI, EP9-A2)

In der folgenden Tabelle sind die Daten aus einem Vergleich zwischen dem Medica-Reagens für DBIL (y) auf dem EasyRA-Analysator bei einer Primärwellenlänge von 550 nm und einer Sekundärwellenlänge von 700 nm und der Leistung desselben DBIL-Reagens (x) auf dem EasyRA-Analysator bei einer Primärwellenlänge von 550 nm zu finden. Die unten aufgeführten Daten stellen Einzelbestimmungen vom EasyRA-Analysator im Vergleich zum Durchschnitt zweier Wiederholwerte vom EasyRA-Analysator dar.

Probenanzahl	53	Probenbereich	0,06 bis 9,50 mg/dL
Steigung	1,0376	y-Abschnitt	-0,0456
Korrelationskoeffizient	0,9986	Regressionsgleichung	$y = 1,0376 \cdot X - 0,0456$

In der folgenden Tabelle sind die Daten aus einem Vergleich zwischen abgestimmten Proben von Serum (x) und Plasma (y) unter Verwendung des Medica-Reagens für DBIL auf dem EasyRA-Analysator zu finden. Die nachstehenden Daten repräsentieren eine einzelne Plasmabestimmung im Vergleich zum Durchschnitt von zwei Wiederholungsserumproben.

Probenanzahl	52	Probenbereich	0,07 bis 9,95 mg/dL
Steigung	1,0064	y-Abschnitt	0,01
Korrelationskoeffizient	0,9992	Regressionsgleichung	$y = 1,0064 \cdot X - 0,01$

Impräzision (CLSI, EP5-A2)

Zweifachmessungen für jede der drei Stufen von QK-Substanzen wurden 20 Tage lang zweimal pro Tag getestet. Sowohl die Präzision während des Durchlaufs als auch die Gesamtpräzision wurde aus diesen Daten gefolgert.

Impräzision bei Durchlauf:

QK-Stufe mg/dL	SA Durchlauf mg/dL	VK Durchlauf %
2,47	0,04	1,59
1,31	0,02	1,83
0,20	0,01	5,49

Gesamtpräzision:

QK-Stufe mg/dL	SA Gesamtpräzision mg/dL	VK Gesamtpräzision %
2,47	0,05	2,09
1,31	0,02	1,87
0,20	0,01	6,93

Linearität (CLSI, EP6-A)

Linear von 0,06 bis 10 mg/dL, basierend auf der linearen Regression $y = 0,98 \cdot x + 0,0365$

Erfassungsgrenze (LoB):	0,04 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Nachweisgrenze (LoD):	0,06 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Quantifizierungsgrenze (LoQ):	0,05 mg/dL	(CLSI, EP17-A)

Störsubstanzen (CLSI, EP7-A)

Weniger als 10 % Störung wurde als keine signifikante Störung eingestuft.

Es besteht eine signifikante negative Störung von Hämoglobin. Zu verwenden sind **ausschließlich** nicht hämolysierte Serum- oder Plasmaproben.

Bei Konzentrationen bis 460 mg/dL Triglyzeride (unter Verwendung von Intralipid*) wurde keine signifikante Störung für eine DBIL-Konzentration von 2,55 mg/dL festgestellt. Medica empfiehlt, von der Verwendung sichtlich trüber Proben abzusehen. Es besteht eine signifikante positive Interferenz von Indocyanin Grün. Proben mit erhöhten Immunglobulin-M-Werten (IgM) oder Proben von Patienten mit Morbus Waldenström können zu unzuverlässigen Ergebnissen führen.

*Intralipid ist eine eingetragene Marke von Pharmacia AB, Clayton, NC.

Liste von Medikamenten und anderen Substanzen nach Young, die klinische Labortests^{5,6} störend beeinflussen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ehrlich, P., *Sulfadiazobenzol, ein Reagens auf Bilirubin*. Centr. Klin. Med. 4; 721–723 (1883).
2. Gordon, E. R., *The Conjugate of Bilirubin*. *Hepatology* (NY) 2: 19 (1975)
3. Burtis, C. A. und Ashwood, E. R. (Herausg.), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2. Ausg., W. B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
4. Daten hinterlegt bei Medica.
5. Young D. S. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4. Ausg. Washington, D. C.: AACC Press; 1995.
6. Young D. S. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2. Ausg. Washington, D. C.: AACC Press; 1997.

EasyRA-Testparameter (DBIL)

Primärwellenlänge (nm)	550
Sekundärwellenlänge (nm)	700
Reaktionstyp	Endpunkt (2)
Reaktionsrichtung	Erhöhung
Blindreagens	ja (bei jeder Kalibration)
Blindprobe	ja
Reaktionszeit	4,5 min
Kalibrationsintervall (max.)	28 Tage
Einlegestabilität Reagens	30 Tage

Serum/Plasma

Probenvolumen (µl)	10.0
Volumen Verdünner 1 (µl)	10
Volumen Verdünner 2 (µl)	10
Volumen Reagens R1 (µl)	160
Volumen Reagens R2 (µl)	40
Dezimalstellen (Standard)	2
Einheiten (Standardwerte)	mg/dL
Verdünnungsfaktor	1:1 (zur Linearbereichserweiterung))
Linearität	0,06 bis 10 mg/dL



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



Emergo Europe, Prinsessegracht 20
2514 AP The Hague, The Netherlands