

REF 10212-4 4 x 29 mL / 8 mL

BILIRUBINA DIRETTA (DBIL)

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

USO PREVISTO

Il reagente EasyRA DBIL è indicato per la determinazione quantitativa della bilirubina diretta nel siero e nel plasma umano 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 epatite e blocchi della cistifellea.

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

RIEPILOGO E SPIEGAZIONE

La bilirubina è un pigmento prodotto a partire dall'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 la bilirubina diretta. Il metodo standard descritto da Ehrlich¹ implica la reazione della bilirubina con un reagente diazo (ad es. l'acido sulfanilico diazotizzato) per formare il composto colorato azobilirubina. L'analisi misura la bilirubina diretta (coniugata) sulla base della sua combinazione con un sale di diazonio in presenza di acido sulfamico per formare azobilirubina.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Questa reazione a termine è basata sull'uso di sale 2,4-diclorofenildiazonio come reagente diazo:

Bilirubina diretta + 2,4-diclorofenildiazonio → sale azobilirubina

La bilirubina diretta (coniugata) si lega al reagente diazo per formare azobilirubina. L'aumento nell'assorbanza misurata a 550 nm è proporzionale alla concentrazione di bilirubina diretta.

REAGENTI

Reagente per bilirubina diretta (R1)

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

Reagente per bilirubina diretta (R2)

Sale 2,4-diclorofenildiazonio	5 mmol/L
HCL	0,9 mol/L
EDTA-Na ₂	0,13 mmol/L

Precauzioni

1. Seguire sempre buone prassi di sicurezza di laboratorio quando si maneggiano reagenti di laboratorio. (CLSI, GP17-A2).
2. 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 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 tutti gli 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 esso sia torbido o presenti sedimenti o nel caso in cui non sia possibile riottenere valori noti di controllo del siero.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI/STABILITÀ

È necessario usare siero o plasma trasparenti non emolizzati. Proteggere i campioni dall'esposizione diretta alla luce solare e artificiale in quanto la bilirubina diretta (non coniugata) è instabile.² Il test deve essere eseguito entro 2 ore dal prelievo, in quanto la bilirubina nel

campione è instabile. Se il campione non può essere analizzato entro questo lasso di tempo, è possibile conservarlo fino a 3 giorni a 2-8° C.³ I campioni possono anche essere conservati per 3 mesi a -70° C. Per la raccolta del plasma è possibile utilizzare provette rivestite di litio eparina.

PROCEDURA

Materiale fornito

Flacone di reagente per bilirubina diretta Medica, REF 10212

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. 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 (30 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 EasyRA. 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 (30 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 quando 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 attenersi alla normativa locale, nazionale e federale in materia di controllo di qualità.

Risultati

Dopo aver completato l'analisi, l'analizzatore chimico Medica EasyRA calcola la concentrazione di bilirubina diretta dal rapporto tra l'assorbanza corretta (sottraendo l'assorbanza del bianco reagente e del bianco campione) del campione e l'assorbanza corretta allo stesso modo del calibratore (dopo aver sottratto l'assorbanza del bianco reagente e del bianco campione) moltiplicato per la concentrazione del calibratore.

$$DBIL \text{ (mg/dL)} = \frac{[(A_{U_{550}} - A_{U_{700}}) - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})] - [(A_{U_{550}} - A_{U_{700}})_{SBIK} - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})_{SBIK}] \times dF}{[(A_{C_{550}} - A_{C_{700}}) - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})] - [(A_{C_{550}} - A_{C_{700}})_{SBIK} - (A_{RBIK_{550}} - A_{RBIK_{700}})_{SBIK}] \times dF} \times CalValue$$

Dove A_U è l'assorbanza del campione sconosciuto, A_{RBIK} è l'assorbanza del bianco reagente associato al campione sconosciuto, $SBIK$ è l'assorbanza del bianco campione associato al campione sconosciuto. Tutte le assorbanze contrassegnate da una "C" sono associate al calibratore. Conseguentemente all'aggiunta ritardata del reagente R2, nel calcolo è compreso un fattore di correzione della diluizione (dF).

Valori Attesi³

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

Adulti: 0,0 - 0,20 mg/dL (0,0 - 3,4 µmol/L).

Tali valori rappresentano delle linee guida. Si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire il proprio intervallo di valori attesi, 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 10 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 misurabile dal test della bilirubina diretta viene esteso a 20 mg/dL.

CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE⁴

Intervallo misurabile

L'intervallo misurabile è compreso tra 0,06 e 10 mg/dL. L'intervallo esteso è compreso tra 0,06 e 20 mg/dL quando viene utilizzata la metà del campione (fattore di diluizione 1:1).

Inaccuratezza/Correlazione (CLSI, EP9-A2)

La tabella seguente elenca i dati ottenuti in un confronto tra le prestazioni del reagente per bilirubina diretta Medica (y) su un analizzatore EasyRA che utilizzi una lunghezza d'onda principale di 550 nm e una lunghezza d'onda secondaria di 700 nm e quelle dello stesso reagente per bilirubina diretta (x) sull'analizzatore EasyRA che utilizzi solo la lunghezza d'onda principale di 550 nm. I dati di seguito illustrati rappresentano le singole determinazioni ottenute sull'analizzatore EasyRA a fronte della media di due valori ripetuti ottenuti sull'analizzatore EasyRA.

Numero di campioni	53	Intervallo dei campioni	da 0,06 a 9,50 mg/dL
Pendenza	1,0376	Intercetta y	-0,0456
Coefficiente di correlazione	0,9986	Equazione di regressione	$Y = 1,0376 * X - 0,0456$

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 diretta 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	52	Intervallo dei campioni	da 0,07 a 9,95 mg/dL
Pendenza	1,0064	Intercetta y	0,01
Coefficiente di correlazione	0,9992	Equazione di regressione	$Y = 1,0064 * X - 0,01$

Imprecisione (CLSI, EP5-A2)

Misurazioni duplicate di ciascuno di 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 %
2,47	0,04	1,59
1,31	0,02	1,83
0,20	0,01	5,49

Imprecisione totale:

Livello QC mg/dL	SD imprecisione totale mg/dL	CV imprecisione totale %
2,47	0,05	2,09
1,31	0,02	1,87
0,20	0,01	6,93

Linearità (CLSI, EP6-A)

Lineare da 0,06 a 10 mg/dL, sulla base della regressione $Y = 0,98 * X + 0,0365$.

Limite di bianco (LOB):	0,04 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Limite di rilevamento (LOD):	0,06 mg/dL	(CLSI, EP17-A)
Limite di quantificazione (LOQ):	0,05 mg/dL	(CLSI, EP17-A)

Sostanze interferenti (CLSI, EP7-A)

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

È stata riscontrata una significativa interferenza negativa con l'emoglobina. Usare **esclusivamente** campioni di siero o plasma non emolizzati. Per bilirubina diretta a 2,55 mg/dL non sono state riscontrate interferenze significative in presenza di trigliceridi a concentrazioni fino a 460 mg/dL (usando Intralipid*). Medica consiglia di non utilizzare campioni visibilmente torbidi. 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.

*Intralipid è un marchio registrato di Pharmacia AB, Clayton, NC.

Young fornisce un elenco di medicinali e altre sostanze che interferiscono con i test chimici clinici.^{5,6}

RIFERIMENTI

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. and Ashwood, E.R. (Eds), *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 2nd edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1994).
4. Dati in archivio presso Medica.
5. Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests* 4th ed. Washington, DC: AACC Press; 1995.
6. Young DS. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests*. 2nd ed. Washington, DC. AACC Press; 1997.

Parametri dell'analisi EasyRA (DBIL)

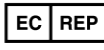
Lunghezza d'onda principale (nm)	550
Lunghezza d'onda secondaria (nm)	700
Tipo di reazione	A termine (2)
Direzione di reazione	Incremento
Bianco reagente	Sì (con ciascuna calibrazione)
Bianco campione	Sì
Tempo di reazione	4,5 min
Intervallo di calibrazione (massimo)	28 giorni
Stabilità on-board del reagente	30 giorni

Siero/Plasma

Volume del campione (µl)	10,0
Volume diluente 1 (µl)	10
Volume diluente 2 (µl)	10
Volume reagente R1 (µl)	160
Volume reagente R2 (µl)	40
Posizioni decimali (predefinite)	2
Unità (valori predefiniti)	mg/dL
Fattore di diluizione	1:1 (per estendere l'intervallo di linearità)
Linearità	da 0,06 a 10 mg/dL



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



Emergo Europe, Westervoortsedijk 60
6827 AT Arnhem, The Netherlands