

Reagente alla Bilirubina Totale

Metodo acido diazo

SOMMARIO DEL PRODOTTO

Stabilità	:	Fino alla scadenza a 2-25°C
Intervallo lineare	:	Fino a 340 µmol/L (20 mg/dL)
Tipo di campione	:	Siero
Metodo	:	Endpoint
Preparazione reagente	:	Aggiungere nitrito di sodio (NIT) in una proporzione 1:50.

IVD

SIMBOLI DI ETICHETTATURA PRODOTTO

EC REP	Rappresentante autorizzato	Limite di temperatura
IVD	Per uso diagnostico in vitro	Usare entro/Data di scadenza
LOT	Codice/Numero lotto	AVVERTENZA. Consultare le istruzioni d'uso.
REF	Numero catalogo	Prodotto da
<i>i</i>	Consultare le istruzioni d'uso	Xi - Irritante
Xn	Xn - Nocivo	NIT
REAG	Reagente alla Bilirubina Totale	Reagente Del Nitrito di Sodio

USO PREVISTO

Questo reagente consente la determinazione quantitativa in vitro della bilirubina totale nel siero umano.

IMPORTANZA CLINICA

Al termine della loro vita circolatoria, i globuli rossi vengono scomposti nel sistema reticolo-endoteliale, principalmente nella milza. L'eme risultante, una volta rimosso il ferro, viene quindi convertito in bilirubina. Questo processo contribuisce per circa l'80% dei 500 µmol (300 mg) di bilirubina formata quotidianamente. Altri processi che producono bilirubina includono la scomposizione di mioglobina e citocromi e il catabolismo di globuli rossi immaturi nel midollo osseo.

La bilirubina prodotta viene trasportata nel fegato legata all'albumina poiché è insolubile all'acqua. Questa frazione di bilirubina è chiamata bilirubina indiretta o libera. Nel fegato la bilirubina è coniugata con l'acido glucuronico (mono e diglucuronidi) per formare la bilirubina coniugata mediante l'enzima uridil difosfato glucuronil-transferasi. La bilirubina coniugata o bilirubina diretta viene escreta attraverso il sistema biliare nell'intestino dove viene metabolizzata dai batteri in un gruppo di prodotti noti collettivamente come stercobilinogeno. L'eliminazione della bilirubina è quasi completa e i livelli nel plasma sono irrilevanti.

La bilirubina totale è la somma delle frazioni di bilirubina libera e coniugata. Livelli elevati di bilirubina totale sono riscontrabili in condizioni che causano l'ostruzione del dotto biliare, epatite, cirrosi, disturbi emolitici e diverse deficienze enzimatiche ereditarie.

Livelli elevati di bilirubina indiretta sono imputabili a cause pre-epatiche quali disturbi emolitici o malattie al fegato derivanti da ingresso, trasporto o coniugazione alterata con il fegato.

Il monitoraggio della bilirubina nei neonati, in particolare se prematuri, è di estrema importanza. Dal momento in cui in questi casi il controllo epatico della bilirubina è spesso immaturo, è frequente la comparsa di itterizia dovuta a un aumento della bilirubina libera. La bilirubina libera non legata all'albumina può attraversare la barriera ematica cerebrale con più facilità, aumentando il rischio di danni cerebrali.¹

METODOLOGIA

La maggior parte dei metodi attualmente utilizzati per analizzare la bilirubina si basa sulla reazione tra bilirubina e soluzioni di acido solfanilico diazotato. In soluzione acquosa solo la bilirubina diretta (coniugata) reagirà in questo modo. A questo punto, per poter valutare la bilirubina totale, la bilirubina non coniugata deve essere liberata dal suo legame all'albumina, e resa solubile in acqua. Ciò si può ottenere con l'aggiunta di un acceleratore o di un solvente. Nel metodo Malloy-Evelyn², ampiamente utilizzato, viene usato il metanolo mentre il metodo Jendrassik-Grof³ fa uso di caffeina/benzoato di sodio. Il reagente Bilirubina totale è una modifica del metodo Pearlman and Lee⁴ nel quale, come solvente, viene adottato un surfattante. La bilirubina coniugata e non coniugata solubile reagiscono con l'acido solfanilico diazotato che produce un acido azobilirubinico, la cui assorbanza è proporzionale alla concentrazione di bilirubina del campione che può essere misurata a 550 nm. Per gli analizzatori bicromatici, la lunghezza d'onda blank dovrebbe essere impostata a 660 nm.

COMPOSIZIONE DEL REAGENTE

Ingredienti attivi

	Concentrazione
Reagente alla Bilirubina Totale:	
Surfattante	1%
Acido idroclorico	100 mmol/L
Acido solfanilico	5 mmol/L
Reagente Del Nitrito di Sodio:	
Nitrito di sodio	144 mmol/L

AVVERTENZA: Non mouth la pipetta. In caso di versamento, lavare l'area interessata con abbondante acqua. Smaltire con abbondante acqua. Per maggiori informazioni, consultare la documentazione di sicurezza del Reagente Bilirubina Totale.

Reagente alla Bilirubina Totale: Irritante!

R38	Irritante per la pelle.
R41	Rischio di gravi lesioni oculari.
S24/25	Evitare il contatto con gli occhi e con la pelle.
S26	In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.

Reagente Del Nitrito di Sodio: Nocivo!

R22	Nocivo per ingestione.
S45	In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

PREPARAZIONE DEL REAGENTE

Aggiungere il reagente nitrito di sodio al reagente alla bilirubina totale in un rapporto di 1:50. Ad esempio, in 10 mL di bilirubina diretta aggiungere 0,2 mL di nitrito di sodio (Equivalente a circa 6 gocce ma si consiglia all'operatore di eseguire una verifica).

Per le istruzioni su come azzerare il campione, fare riferimento all'applicazione dello strumento appropriato.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Se conservato a una temperatura di 2-25°C, il reagente è stabile fino alla data di scadenza indicata sul flacone e sull'etichetta del contenitore del kit.

Reagente operativo:

Il reagente operativo è stabile per almeno 21 giorni a 2-8°C.

Indications of Reagent Deterioration:

- Torbidità.
- Assorbanza del reagente > 0,1 AU a 550nm; e/o
- Mancato ripristino dei valori di controllo nell'intervallo assegnato.

RACCOLTA E MANIPOLAZIONE CAMPIONI

Siero: Utilizzare siero non emolizzato.

Conservazione: Proteggere i campioni dalla luce poiché la bilirubina è fotolabile. I campioni possono essere conservati in congelatore per 3 giorni.⁵

STRUMENTAZIONE AGGIUNTIVA NECESSARIA NON FORNITA

- Se necessario, pipette per il dosaggio accurato dei volumi misurati.
- Un analizzatore chimico clinico in grado di mantenere la temperatura costante (30/37°C) e misurare l'assorbanza a 550 nm.
- Materiali di consumo specifici per l'analizzatore, ad esempio: contenitore per campioni.
- Materiale di controllo analizzato normale e anormale.
- Calibratore o uno standard acquoso per l'bilirubina totale appropriato.

PROCEDURA DI ANALISI

Si consiglia di attenersi ai seguenti parametri di sistema. Singole applicazioni strumentali sono fornite su richiesta dal Gruppo di assistenza tecnica.

PARAMETRI DI SISTEMA

Temperatura	30/37°C
Lunghezza d'onda primaria	550 nm
Lunghezza d'onda secondaria	660 nm
Tipo di analisi	Endpoint
Direzione	Aumento
Campione: Rapporto reagente	1 : 20
ad es.: Vol. campione	10 µL
Vol. reagente	200 µL
Tempo di incubazione	600 secondi
Limiti Blank del reagente	Basso 0,0 AU
(550nm, 1cm percorso luce)	Alto 0,1 AU
Linearità	340 µmol/L (20 mg/dL)
Sensibilità Analitica	2,5 ΔmAbs per µmol/L
(550nm, 1cm percorso luce)	43 ΔmAbs per mg/dL

CALCOLO

I risultati vengono solitamente calcolati automaticamente dallo strumento come segue:

$$\text{Bilirubina Totale} = \frac{\text{Assorbanza di sconosciuto}}{\text{Assorbanza del calibratore}} \times \text{Valore calibratore}$$

Esempio:

$$\begin{aligned} \text{Assorbanza del calibratore} &= 0,24 \\ \text{Assorbanza di sconosciuto} &= 0,13 \\ \text{Valore del calibratore} &= 95 \mu\text{mol/L (5,6 mg/dL)} \end{aligned}$$

$$\text{Bilirubina Totale} = \frac{0,13}{0,24} \times 95 = 52 \mu\text{mol/L}$$

$$\text{Bilirubina Totale} = \frac{0,13}{0,24} \times 5,6 = 3,0 \text{ mg/dL}$$

NOTA

- I campioni con valori superiori a 340 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL) devono essere diluiti e quindi analizzati nuovamente. Moltiplicare i risultati per il fattore di diluizione.
- Conversione unità: $\mu\text{mol/L} \times 0,0585 = \text{mg/dL}$

CALIBRAZIONE

La calibrazione è necessaria. Si consiglia di utilizzare un calibratore a base di siero o acquoso standard con un valore assegnato tracciabile a uno standard principale (ad esempio NIST oppure IRMM). Per la frequenza di calibrazione mediante strumenti automatizzati, fare riferimento alle specifiche tecniche dello strumento utilizzato.

In ogni caso, la stabilità di calibrazione dipende dalle prestazioni ottimali dello strumento e dall'impiego di reagenti conservati secondo le indicazioni fornite nella sezione di questo inserto relativa alla stabilità e alla conservazione. Si consiglia di effettuare una nuova calibrazione in ognuno dei seguenti casi:

- Cambiamento del numero di lotto del reagente
- Esecuzione di manutenzione preventiva o sostituzione di un componente critico.
- Cambiamento dei valori di controllo o valori fuori intervallo; problema non risolto con una nuova fiala di controllo.

CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Per garantire un controllo qualità adeguato i controlli normali e anormali con i valori analizzati devono essere effettuati come campioni sconosciuti:-

- Almeno una volta al giorno oppure secondo quanto stabilito dal laboratorio.
- Quando si utilizza una nuova bottiglia di reagente.
- In seguito a manutenzione preventiva o sostituzione di un componente critico.
- Con ogni calibratura.

Risultati di controllo superiori al limite superiore o inferiori al limite inferiore degli intervalli stabiliti indicano che l'analisi potrebbe essere fuori controllo.

In tali situazioni si consiglia di effettuare le seguenti azioni correttive:

- Ripetere gli stessi controlli.
- Se i risultati dei controlli ripetuti non rientrano nei limiti, preparare del siero di controllo nuovo e ripetere il test.
- Se i risultati continuano ad essere fuori controllo, ricalibrare utilizzando un calibratore nuovo e ripetere il test.
- Se i risultati continuano ad essere fuori controllo, effettuare una calibrazione con reagente appena preparato, quindi ripetere il test.
- Se i risultati sono ancora fuori controllo, contattare l'Assistenza tecnica o il distributore locale.

LIMITAZIONI

- Sono stati condotti degli studi per determinare il livello di interferenza da lipemia, ottenendo i seguenti risultati:
Lipemia: Nessuna interferenza da lipemia, misurata come trigliceridi fino a 3,2 mmol/L (280 mg/dL).
- Si deve evitare l'emolisi poiché, con i metodi diazo, questa produce valori falsamente bassi.⁵
- Young DS⁵ ha pubblicato un elenco completo dei farmaci e sostanze in grado di interferire con questo saggio.

VALORI PREVISTI⁵

Adulti e bambini di età superiore a 1 mese:
3,4 - 17,1 $\mu\text{mol/L}$ (0,2 - 1,0 mg/dL)

Nascita prematura:

Fino a 24 ore	17 - 137 $\mu\text{mol/L}$	(1 - 8 mg/dL)
Fino a 48 ore	103 - 205 $\mu\text{mol/L}$	(6 - 12 mg/dL)
Giorni 3-5	171 - 239 $\mu\text{mol/L}$	(10 - 14 mg/dL)

Nascita a termine:

Fino a 24 ore	34 - 103 $\mu\text{mol/L}$	(2 - 6 mg/dL)
Fino a 48 ore	103 - 171 $\mu\text{mol/L}$	(6 - 10 mg/dL)
Giorni 3-5	68 - 137 $\mu\text{mol/L}$	(4 - 8 mg/dL)

I valori indicati sono rappresentativi dell'intervallo previsto per questo metodo e hanno scopo unicamente di guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di verificare questo intervallo o di procurare un intervallo di riferimento per la popolazione a cui si riferisce.⁷

PRESTAZIONI

I dati seguenti sono stati ottenuti utilizzando il reagente alla Bilirubina Totale su un analizzatore chimico clinico automatico mantenuto in efficienza. Gli utenti dovrebbero stabilire la prestazione del prodotto sui loro analizzatori specifici utilizzati.

IMPRECISIONE

L'imprecisione è stata valutata utilizzando due livelli di controllo commerciale e seguendo la procedura NCCLS EP5-T.⁸

Nel ciclo:	LIVELLO I	LIVELLO II
Numero di Punti Dati	80	80
Media ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	23 / 1,33	46 / 2,71
SD ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	0,5 / 0,03	0,7 / 0,04
CV (%)	2,6	1,5
Totale:	LIVELLO I	LIVELLO II
Numero di Punti Dati:	80	80
Media ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	23 / 1,33	46 / 2,71
SD ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	1,0 / 0,06	2,4 / 0,14
CV (%)	4,8	5,0

CONFRONTO DI METODO

Sono stati condotti degli studi utilizzando un altro reagente bilirubina totale simile reperibile sul mercato. I campioni di siero sono stati analizzati in parallelo e i risultati confrontati con regressioni al minimo quadrato. Le statistiche ottenute sono come segue.

Numero di coppie di campioni	929
Intervallo risultati campione	0,5-485 $\mu\text{mol/L}$ (0,03-28 mg/dL)
Media risultati metodo di rif.	21 $\mu\text{mol/L}$ (1,2 mg/dL)
Media risultati Bilirubina Totale	21 $\mu\text{mol/L}$ (1,2 mg/dL)
Pendenza	1,10
Intercetta	-2,09 $\mu\text{mol/L}$ (-0,12 mg/dL)
Coefficiente di correlazione	1,00

LINEARITÀ

Quando condotta secondo le raccomandazioni, l'analisi è lineare fino a 340 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL).

SENSIBILITÀ ANALITICA

Quando condotta secondo le raccomandazioni la sensibilità di quest'analisi è 2,5 ΔmAbs per $\mu\text{mol/L}$ o 43 ΔmAbs per mg/dL (1cm percorso della luce, 550nm).

RIFERIMENTI

- Zilva JF, Pannall PR. "Liver Disease and Gall Stones" in Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment". Lloyd-Luke 1979; Chap XIII; 286-8.
- Malloy HT, Evelyn KA. J Biol Chem 1937; 119:481-90.
- Jendrassik L, Grof B. Biochem Zeit 1938; 297:81-9.
- Pearlman FC, Lee RT. Clin Chem 1974; 20:447-53.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Second Edition. Burtis CS and Ashwood ER (Eds), WB Saunders Company, 1994.
- Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, Third Edition. AAC Press, 1990.
- Watchel M et al. Creation and Verification of Reference Intervals. Laboratory Medicine, 1995; 26: 593-7.
- National Committee for Clinical Chemistry Standards. User evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Devices NCCLS; 1984, NCCLS Publication EP5-T.

© 2008 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Hitachi is a registered trademark of Roche Diagnostics, Indianapolis, IN 46250. ILab 600 is a registered trademark of Instrumentation Laboratory Company, Lexington, MA 02421. All other trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.



Fisher Diagnostics
a division of Fisher Scientific Company, LLC
a subsidiary of Thermo Fisher Scientific Inc.
Middletown, VA 22645-1905 USA
Phone: 800-528-0494
540-869-3200
Fax: 540-869-8132



MDCI Ltd.
Arundel House
1 Liverpool Gardens
Worthing, West Sussex BN11 1SL UK



REF

Dati per nuovi ordini

N°_Catalogo.	REAG	NIT
TR32321	2 x 125 mL	1 x 8 mL
TR32326	2 x 250 mL	2 x 10 mL
TR32398	2 x 500 mL	1 x 20 mL
TL32301 (ILab 600)	6 x 100 mL	1 x 20 mL
TH32301 (Hitachi)	4 x 50 mL	1 x 10 mL
TY32301 (Hitachi)	4 x 50 mL	1 x 10 mL