

Réactif de la Bilirubine Directe

Méthode diazo acide

CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT

Stabilité	:	Jusqu'à péremption à 2-25°C
Limites de linéarité	:	Jusqu'à 340 µmol/L (20 mg/dL)
Nature de l'échantillon	:	Sérum
Méthode	:	Point final
Préparation du réactif	:	Fourni prêt à l'emploi.

IVD

UTILISATION PRÉVUE

Ce réactif est prévu pour la quantification in vitro de la bilirubine directe dans le sérum humain.

INTERET CLINIQUE

Les globules rouges sont décomposés à la fin de leur vie circulatoire dans le système réticulo-endothélial et principalement dans la rate. L'hème résultant, une fois le fer éliminé, est alors converti en bilirubine. Ce processus représente environ 80 pour cent des 500 µmol (300 mg) de bilirubine formés quotidiennement. D'autres sources de bilirubine incluent la chute de la myoglobine et des cytochromes et le catabolisme des globules rouges immatures dans la moelle. Une fois formée, la bilirubine est transportée dans le foie liée à l'albumine car elle est insoluble dans l'eau. Cette fraction de bilirubine désignée est appelée bilirubine indirecte ou non conjuguée. Dans le foie, la bilirubine est conjuguée à l'acide glucuronique (mono et di glucuronides) pour former la bilirubine conjuguée par l'enzyme transférase glucuronyle diphosphate uridylyle. La bilirubine conjuguée ou la bilirubine directe sont excrétées via le système biliaire dans l'intestin où elles sont métabolisées par des bactéries en un groupe de produits connus collectivement sous le nom de stercobilinogènes. L'élimination est pratiquement complète et les niveaux du plasma sont normalement négligeables.

La bilirubine totale est la somme des fractions non conjuguées et conjuguées. La bilirubine totale augmente dans des conditions provoquant l'obstruction du canal cholédoque, lors d'une hépatite, d'une cirrhose, lors de troubles hémolytiques et pour plusieurs insuffisances provoquées par des enzymes.

La bilirubine indirecte augmente par des causes pré-hépatiques telles que des troubles hémolytiques ou des affections hépatiques résultant en une entrée, un transport ou un conjugaison altérés dans le foie.

La surveillance de la bilirubine du nouveau-né, en particulier s'il est prématuré, présente une importance particulière. La gestion hépatique de la bilirubine étant dans ce cas souvent immature, l'ictère dû à une augmentation de la bilirubine non conjuguée est commun. La bilirubine non conjuguée non liée à l'albumine peut passer la barrière sanguine du cerveau plus facilement, ce qui accroît le danger de lésions cérébrales¹.

PRINCIPE DE LA METHODE

La plupart des méthodes actuellement utilisées pour doser la bilirubine sont basées sur la réaction entre la bilirubine et des solutions acides sulfaniliques diazotées. Dans des solutions aqueuses, seule la bilirubine directe (conjuguée) réagira de cette manière.

Ce réactif de la bilirubine directe utilise une méthode diazo acide. La bilirubine conjuguée réagit avec l'acide sulfanilique diazoté pour produire une azobilirubine acide, dont l'absorbance est proportionnelle à la concentration en bilirubine directe de l'échantillon et peut être mesurée à 550 nm. Pour les analyseurs bichromatiques la lecture du blanc doit se faire à 660 nm.

COMPOSITION DU RÉACTIF

Ingrédients actifs	Concentration
Réactif de la Bilirubine Directe	
Acide chlorhydrique	100 mmol/L
Acide sulfanilique	10 mmol/L
Réactif de la Nitrite Sodium	
Nitrite de sodium	144 mmol/L

PRECAUTIONS: NE PAS pipeter à la bouche. En cas de débordements ou de coulures rincer les surfaces affectées à l'eau. La fiche de sécurité sur le réactif de la Bilirubine Directe contient des informations plus détaillées.

Réactif de la Bilirubine Directe: Irritant!

R38	Irritant pour la peau.
R41	Risque de lésions oculaires graves.
S24/25	Éviter le contact avec la peau et les yeux.
S26	En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

SYMBOLES DE L'ÉTIQUETAGE DU PRODUIT

EC REP	Représentant Autorisé		Limites de température
IVD	Utilisation en diagnostique in vitro		Utiliser jusque
LOT	Numéro de lot		ATTENTION: Consulter les instructions d'utilisation
REF	Référence catalogue		Fabriqué par
	Consulter les instructions d'utilisation		Xn - Nocif
	Xi - Irritant	NIT	Réactif de la Nitrite Sodium
REAG	Réactif de la Bilirubine Directe		

Réactif de la Nitrite Sodium: Nocif!

R22	Nocif en cas d'ingestion.
S45	En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Réactif de test :

Ajouter le réactif de nitrite de sodium au réactif de la bilirubine directe selon le rapport 1:100. Par exemple, ajouter 0,1 mL de nitrite de sodium à 10 mL de réactif de la bilirubine directe (c'est environ égal à 3 gouttes mais on recommande que ceci soit vérifié par l'opérateur).

Réactif blanc :

Utiliser le réactif de la bilirubine directe tel qu'il est fourni.

STABILITÉ ET CONSERVATION

Stocké entre 2 et 25 °C, le réactif est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du flacon et de la boîte du kit.

Réactif opérationnel :

Le réactif opérationnel est stable pendant au moins 21 jours à 2-8°C.

Indications de la détérioration du réactif:

- Turbidité.
- Absorbance > 0,1 AU à 550nm; et/ou
- Impossibilité de ramener les valeurs de contrôle dans la plage définie.

PRELEVEMENT ET MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Sérum: Utilisation de sérum non-hémolysé.

Conservation: Les échantillons doivent être protégés d'une lumière directe car la bilirubine est photolabile. Les échantillons peuvent être stockés réfrigérés pendant 3 jours².

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Le cas échéant, des pipettes pour répartir précisément des volumes mesurés précisément.
- Un analyseur de biochimie capable de maintenir une température constante (30/37°C) et de mesurer l'absorbance à 550 nm.
- Consommables spécifiques à l'analyseur, p. ex. coupelles à échantillons.
- Matériau de contrôle dosé normal et anormal.
- Étalon ou standard d'bilirubine directe aqueux adéquat.

PROCÉDURE DE DOSAGE

On recommande d'effectuer un blanc témoin pour chaque échantillon. Un blanc témoin peut être obtenu en utilisant simplement le réactif de la bilirubine directe tel que fourni sans ajout de nitrite de sodium.

Le paramétrage suivant est recommandé. Des applications selon les analyseurs utilisés sont disponibles sur demande auprès de notre Service Applications.

PARAMETRAGE DU SYSTÈME	
Température	30/37°C
Longueur d'onde principale	550 nm
Longueur d'onde secondaire	660 nm
Type de dosage	Point final
Direction	Augmentation
Échantillon : Taux de réactif	1 : 20
p. ex. : Vol. échantillon	10 µL
Vol. réactif	200 µL
Temps d'incubation	300 secondes
Limites du réactif blanc	Basse 0,0 AU
(550 nm, chemin lumineux 1cm)	Haute 0,1 AU
Linéarité	340 µmol/L (20 mg/dL)
Sensibilité	2,5 ΔmAbs par µmol/L
(550 nm, chemin lumineux 1cm)	43 ΔmAbs par mg/dL

CALCULS

Les résultats sont calculés, habituellement automatiquement par l'instrument, comme suit :

$$\text{Bilirubine Directe} = \frac{\text{Absorbance de l'inconnu}}{\text{Absorbance de l'étalon}} \times \text{valeur de l'étalon}$$

Exemple :

$$\begin{aligned} \text{Absorbance de l'étalon (Test)} &= 0,038 \\ \text{Absorbance de l'étalon (Blanc)} &= 0,003 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Absorbance de l'inconnu (Test)} &= 0,029 \\ \text{Absorbance de l'inconnu (Blanc)} &= 0,01 \\ \text{Valeur de l'étalon} &= 15 \mu\text{mol/L (0,88 mg/dL)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Absorbance de l'étalon} &= 0,038 - 0,003 = 0,035 \\ \text{Absorbance de l'inconnu} &= 0,029 - 0,01 = 0,019 \end{aligned}$$

$$\text{Bilirubine Directe} = \frac{0,019}{0,035} \times 15 = 8,1 \mu\text{mol/L}$$

$$\text{Bilirubine Directe} = \frac{0,019}{0,035} \times 0,88 = 0,48 \text{ mg/dL}$$

REMARQUES

- Les spécimens présentant des valeurs supérieures à 340 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL) doivent être dilués et dosés à nouveau. Multiplier les résultats par le facteur de dilution.
- Conversion d'unité : $\mu\text{mol/L} \times 0,0585 = \text{mg/dL}$

CALIBRAGE

L'étalonnage est obligatoire. Un standard aqueux approprié ou un calibreux à base de sérum sont recommandés.

Se reporter aux spécifications du fabricant de l'appareil pour la fréquence d'étalonnage des instruments automatisés.

Cependant, la stabilité de l'étalonnage dépend des performances optimales de l'appareil et de l'utilisation de réactifs stockés selon les recommandations de la section stabilité et stockage de l'insert du présent ensemble. Un nouvel étalonnage est recommandé dès que l'un des événements suivants se produit :

- Le numéro de lot du réactif change.
- Après une maintenance préventive ou le remplacement d'un composant critique.
- Les valeurs de contrôle se sont décalées ou hors de la plage et un nouveau flacon de contrôle ne rectifie pas le problème.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Pour garantir un contrôle adéquat de la qualité, des contrôles normaux et anormaux à valeurs dosées doivent être testés comme des échantillons inconnus :

- Au moins toutes les huit heures.
- Si un nouveau flacon de réactif est utilisé.
- Après une maintenance préventive ou le remplacement d'un composant critique.

Des résultats de contrôle sous la limite supérieure ou sous la limite inférieure des plages établies indiquent un dosage peut-être hors contrôle.

Les actions correctrices suivantes sont prescrites dans ces situations :

- Répéter les mêmes contrôles.
- Si les résultats du contrôle répété sont hors limites, préparer un sérum de contrôle neuf et répétez le test.
- Si des résultats sont toujours hors contrôle, recalibrez avec un étalon neuf, puis répétez le test.
- Si des résultats sont toujours hors contrôle, effectuez un étalonnage avec un réactif neuf, puis répétez le test.
- Si les résultats sont toujours hors limites, contacter les services techniques ou votre distributeur local.

LIMITATIONS

- Les études pour déterminer le niveau d'interférence de l'hémoglobine et de la lipémie ont été effectuées et les résultats suivants ont été obtenus.

Hémoglobine : Éviter d'utiliser des échantillons hémolysés.

Lipémie : Aucune interférence avec la lipémie, mesurée comme triglycérides, jusqu'à 8,8 mmol/L (780 mg/dL).

- Young DS³ a publié une liste complète de médicaments et de substances pouvant interférer avec ce dosage.

VALEURS ATTENDUES²

Adultes et enfants en bas âge (> 1 mois) : 0-3 $\mu\text{mol/L}$ (> 0,2 mg/dL)

Les valeurs indiquées ne représentent que la plage prévue pour cette méthode et ne sont que des indications. Il est recommandé à chaque laboratoire de vérifier sa plage ou de dériver un intervalle de référence pour la population qu'il sert.⁴

MESURES

Les données suivantes ont été obtenues avec le réactif à Bilirubine Directe sur un analyseur de biochimie automatisé bien entretenu. Les utilisateurs doivent établir les performances du produit sur leur propre analyseur.

IMPRÉCISION

L'imprécision a été évaluée avec deux niveaux de contrôle du commerce en respectant la procédure NCCLS EP5-T.⁵

Dans la session:	NIVEAU I	NIVEAU II
Nombre de points de données	80	80
Moyenne ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	20,5 / 1,2	35,9 / 2,1
SD ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	1,9 / 0,11	1,9 / 0,11
CV (%)	<1	2,9

Total:	NIVEAU I	NIVEAU II
Nombre de points de données	80	80
Moyenne ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	20,5 / 1,2	35,9 / 2,1
SD ($\mu\text{mol/L}$ / mg/dL)	1,9 / 0,11	1,9 / 0,11
CV (%)	8,7	5,2

COMPARAISON DE METHODES

Des études comparatives ont été menées avec un autre réactif de la bilirubine directe du commerce similaire. Des échantillons de sérum ont été dosés en parallèle et les résultats comparés par régression du moindre carré. Les statistiques suivantes ont été obtenues.

Nombre d'échantillons en double	51
Plage de mesures des échantillons	5 - 488 $\mu\text{mol/L}$ (0,3 - 28,6 mg/dL)
Moyenne des mesures (référence)	107 $\mu\text{mol/L}$ (6,3 mg/dL)
Moyenne des résultats (Bilirubine Directe)	111 $\mu\text{mol/L}$ (6,5 mg/dL)
Pente	0,96
Coordonnées à l'origine	8,5 $\mu\text{mol/L}$ (0,5 mg/dL)
Coefficient de Corrélation	0,99

LINÉARITÉ


Effectué selon les recommandations, le dosage est linéaire jusqu'à 340 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL).

SENSIBILITÉ

S'il est effectué selon les recommandations, la sensibilité du présent dosage est de 2,5 ΔmAbs par $\mu\text{mol/L}$ ou 43 ΔmAbs par mg/dL (chemin lumineux de 1 cm, 550 nm).

RÉFÉRENCES

- Zilva JF, Pannal PR. "Liver Disease and Gall Stones" in Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment". Lloyd-Luke 1979; Chap XIII; 286-8.
- 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. AACC 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.

 Fisher Diagnostics
a division of Fisher Scientific Company, LLC
a part 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



© 2009 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.

REF

Information Commandes

No de Catalogue	REAG	NIT
TR33321	2 x 125 mL	1 x 10 mL
TR33326	2 x 250 mL	1 x 10 mL
TR33398	2 x 500 mL	1 x 20 mL
1225-200H (Hitachi)	4 x 50 mL	1 x 8 mL
TL33301 (iLab 600)	6 x 100 mL	1 x 20 mL