

# Reagente alla Bilirubina Diretta

## 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	:	Fornito pronto per l'uso.

IVD

### USO PREVISTO

Questo reagente consente la determinazione quantitativa in vitro della bilirubina diretta 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.<sup>1</sup>

### 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.

Questo reagente alla bilirubina diretta utilizza un metodo acido diazo. La bilirubina coniugata reagisce con l'acido solfanilico diazotato per produrre azobilirubina acida, la cui assorbanza è proporzionale alla concentrazione di bilirubina diretta nel campione e può essere misurata a 550 nm. Per gli analizzatori biometrici, la lunghezza d'onda blank dovrebbe essere impostata a 660 nm.

### COMPOSIZIONE DEL REAGENTE

Ingredienti attivi	Concentrazione
<b>Reagente alla Bilirubina Diretta</b>	
Acido idroclorico	100 mmol/L
Acido solfanilico	10 mmol/L
<b>Reagente Del Nitrito di Sodio</b>	
Nitrito di sodio	144 mmol/L

**AVVERTENZA:** Non usare 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 Diretta.

### Reagente alla Bilirubina Diretta: 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.

### SIMBOLI DI ETICHETTATURA PRODOTTO

	Rappresentante autorizzato		Limite di temperatura
	Per uso diagnostico in vitro		Usare entro/Data di scadenza
	Codice/Numero lotto		AVVERTENZA. Consultare le istruzioni d'uso.
	Numero catalogo		Prodotto da
	Consultare le istruzioni d'uso		Xn - Nocivo
	Xi - Irritante		Reagente Del Nitrito di Sodio
	Reagente alla Bilirubina Diretta		

### 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

#### Reagente di prova:

Aggiungere il reagente nitrito di sodio al reagente alla bilirubina diretta in un rapporto di 1:100. Ad esempio, in 10 mL di bilirubina diretta aggiungere 0,1 mL di nitrito di sodio (Equivalentemente a circa 3 gocce ma si consiglia all'operatore di eseguire una verifica).

#### Reagente blank:

Utilizzare il reagente alla bilirubina diretta fornito.

### STABILITA' 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.<sup>2</sup>

### 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 diretta appropriato.

### PROCEDURA DI ANALISI

Si consiglia di eseguire un blank campione su tutti i campioni. È possibile ottenere un blank campione semplicemente utilizzando il reagente alla bilirubina diretta fornito senza aggiungere nitrito di sodio.

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	300 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	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:

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

### Esempio:

$$\begin{aligned} \text{Assorbanza del calibratore (prova)} &= 0,038 \\ \text{Assorbanza del calibratore (blank)} &= 0,003 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Assorbanza sconosciuta (prova)} &= 0,029 \\ \text{Assorbanza sconosciuta (blank)} &= 0,01 \\ \text{Valore del calibratore} &= 15 \mu\text{mol/L (0,88 mg/dL)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Assorbanza del calibratore} &= 0,038 - 0,003 = 0,035 \\ \text{Assorbanza sconosciuta} &= 0,029 - 0,01 = 0,019 \end{aligned}$$

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

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

### 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 appropriato a base di siero o standard acquoso.

Per la frequenza di calibrazione mediante strumenti automatizzati, fare riferimento alle specifiche tecniche dello strumento.

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

- Cambiamento del numero di lotto del reagente.
- In seguito a manutenzione preventiva o sostituzione di un componente critico.
- I valori di controllo sono cambiati o sono fuori intervallo e una nuova fiale di controllo non rettifica il problema.

### 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 ogni otto ore
- Quando si utilizza una nuova bottiglia di reagente.
- In seguito a manutenzione preventiva o sostituzione di un componente critico.

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 emoglobina e lipemia, ottenendo i seguenti risultati:

**Emoglobina:** Evitare l'uso di campioni emolizzati.

**Lipemia:** Nessuna interferenza da lipemia, misurata come trigliceridi fino a 8,8 mmol/L (780 mg/dL).



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



- Young DS<sup>3</sup> ha pubblicato un elenco completo dei farmaci e sostanze in grado di interferire con questo saggio.

### VALORI PREVISTI<sup>2</sup>

Adulti e bambini (>1 mese): 0-3  $\mu\text{mol/L}$  (> 0,2 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.<sup>4</sup>

### PRESTAZIONI

I dati seguenti sono stati ottenuti utilizzando il reagente alla Bilirubina Diretta 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.<sup>5</sup>

Nel ciclo:	LIVELLO I	LIVELLO II
Numero di Punti Dati	80	80
Media ( $\mu\text{mol/L}$ / 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
<b>Totale:</b>	<b>LIVELLO I</b>	<b>LIVELLO II</b>
Numero di Punti Dati:	80	80
Media ( $\mu\text{mol/L}$ / 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

### PRECISIONE

Sono stati condotti degli studi utilizzando un altro reagente bilirubina diretta 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	51
Intervallo risultati campione	5 - 488 $\mu\text{mol/L}$ (0,3 - 28,6 mg/dL)
Media risultati metodo di rif.	107 $\mu\text{mol/L}$ (6,3 mg/dL)
Media risultati Bilirubina Diretta	111 $\mu\text{mol/L}$ (6,5 mg/dL)
Pendenza	0,96
Intercetta	8,5 $\mu\text{mol/L}$ (0,5 mg/dL)
Coefficiente di correlazione	0,99

### LINEARITÀ

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

### SENSIBILITÀ

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

### RIFERIMENTI

- 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.

© 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	Dati per nuovi ordini		
N°. Catalogo.	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	