BILIRUBINA (TOTALE E DIRETTA)		BILIRUBINA (TOTALE)		BILIRUBINA (DIRETTA)	
COD 11515 2x50+2x50mL	COD 11555 500 + 500 mL	COD 11510 4 x 50 mL	COD 11544 2 x 500 mL	COD 11511 4 x 50 mL	COD 11545 2 x 500 mL
CONSERVARE A 2-30ºC					
Reattivi per misurare la concentrazione di bilirubina Solo per uso *in vitro* nel laboratorio clinico					

BILIRUBIN (TOTAL AND DIRECT)
BILIRUBIN (TOTAL) BILIRUBIN (DIRECT)

BioSystems

CE

BILIRUBINA
SULFANILICO DIAZOTATO

PRINCIPIO DEL METODO

La bilirubina totale presente nel campione reagisce con l' acido sulfanilico diazotato in mezzo acido, originando un complesso colorato che può essere determinato spettrofotometricamente. La cetrimide solubilizza la bilirubina indiretta permettendone la reazione con la frazione diretta[1,2]. I termini "diretta" e "totale" si riferiscono alle caratteristiche di reazione in presenza o assenza di solubilizzanti (acceleratori). La bilirubina "diretta" e "indiretta" equivalgono solo approssimativamente alle frazioni coniugata e non coniugata.

CONTENUTO

	Reattivo AT	Reattivo AD	Reattivo BT	Reattivo BD
COD 11515	2 x 40 mL	2 x 40 mL	2 x 10 mL	2 x 10 mL
COD 11555	400 mL	400 mL	1 x 100 mL	1 x 100 mL
COD 11510	4 x 40 mL	—	4 x 10 mL	—
COD 11544	2 x 400 mL	—	2 x 100 mL	—
COD 11511	—	4 x 40 mL	—	4 x 10 mL
COD 11545	—	2 x 400 mL	—	2 x 100 mL

COMPOSIZIONE

BILIRUBINA (TOTALE)

AT. Reattivo. Acido sulfanilico 29 mmol/L, acido cloridrico 0,2 mol/L, cetrimide 50 mmol/L.
PERICOLO: H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P303+P361+P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.

BT. Reattivo. Nitrito sodico 11,6 mmol/L.

BILIRUBINA (DIRETTA)

AD. Reattivo. Acido sulfanilico 35 mmol/L, acido cloridrico 0,24 mol/L.
PERICOLO: H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. P303+P361+P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle/fare una doccia.

BD. Reattivo. Nitrito sodico 3,5 mmol/L.

Per maggiori avvertimenti e precauzioni, vedere la scheda di sicurezza del prodotto (SDS).

CONSERVAZIONE

Conservare a 2-30ºC.

Il Reattivi sono stabili sino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, purchè conservati ben chiusi e si eviti la contaminazione durante l'uso.

Indicazioni di deterioramento:

– Reattivi: Presenza di particelle, torbidità, assorbanza del bianco superiore a 0,05 a 540 nm (cuvetta da 1 cm).

REATTIVI SUPPLEMENTARI

S. Standard di Bilirubina (cod 11513). Ricostituire con 5,0 mL di acqua distillata (Nota 1). La concentrazione viene indicata sulla etichetta del vial. Il valore di concentrazione è riferabile al Materiale di Riferimento Certificato 916a (Istituto Nazionale di Standards e Tecnologia, USA). Proteggere lo Standard ricostituito dalla luce. Stabile 4 ore a 15-30ºC o 2 mesi a –18ºC congelato in aliquote.

PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Reattivo di lavoro: svuotare il contenuto di una fiala di reattivo BT in un flacone di reattivo AT per la determinazione della bilirubina totale, oppure il contenuto di una fiala di reattivo BD in un flacone di reattivo AD per la determinazione della bilirubina diretta (Nota 2). Agitare dolcemente. Per la preparazione di altri volumi, miscelare le seguenti proporzioni: 1 mL di reattivo BT + 4 mL di reattivo AT o 1 mL di reattivo BD + 4 mL di reattivo AD. Stabile per 20 giorni a 2-8ºC.

MATERIALE AGGIUNTIVO

– Analizzatore, spettrofotometro o fotometro con cuvetta termostatabile a 37ºC per letture a 540 ± 20 nm.
– Cuvette da 1,0 cm di cammino ottico (se si utilizza il fattore nei calcoli).

CAMPIONI

Siero raccolto mediante procedimenti standard..

La bilirubina nel siero è stabile 7 giorni a 2-8ºC se protetta dalla luce[3].

PROCEDURA BILIRUBINA TOTALE

1. Pipettare in provette: (Notas 1, 3)

	Bianco Reattivo	Bianco Campione	Campione	Standard
Acqua distillata	100 µL	—	—	—
Campione	—	100 µL	100 µL	—
Standard (S)	—	—	—	100 µL
Reattivo (AT)	—	1,0 mL	—	—
Reattivo di Lavoro	1,0 mL	—	1,0 mL	1,0 mL

2. Agitare bene e lasciare 2 minuti a temperatura ambiente.
3. Leggere l' assorbanza (A) dei Bianchi Campione a 540 nm contro acqua distillata.
4. Leggere l' assorbanza (A) dei Campioni e dello Standard a 540 nm contro Bianco dei Reattivi.

PROCEDURA BILIRUBINA DIRETTA

1. Pipettare in provette: (Notas 1, 3)

	Bianco Reattivo	Bianco Campione	Campione
Acqua distillata	100 µL	—	—
Campione	—	100 µL	100 µL
Reattivo (AD)	—	1,0 mL	—
Reattivo di Lavoro	1,0 mL	—	1,0 mL

2. Agitare bene e lasciar reagire esattamente 5 minuti a 37ºC.
3. Leggere l' assorbanza (A) dei Bianchi Campione a 540 nm contro acqua distillata.
4. Leggere l' assorbanza (A) dei Campioni a 540 nm contro Bianco dei Reattivi.

CALCOLI

La concentrazione di bilirubina nel campione si calcola partendo dalla seguente formula generale:

$$\frac{A_{Campione} - A_{Bianco\ Campione}}{A_{Standard}} \times C_{Standard} = C_{Campione}$$

Nel calcolo della bilirubina diretta, si utilizza il valore di assorbanza ottenuto dallo standard nel procedimento della bilirubina totale(Nota 4).

Concentrazione massa (mg/dL) x 17,1 = concentrazione sostanza (µmol/L)

VALORI DI RIFERIMENTO

Adulti:

Totale[4]	Fino 2,0 mg/dL = 34 µmol/L
Diretta[5]	Fino 0,2 mg/dL = 3,4 µmol/L

Neonati[4] (bilirubina totale):

Età	Prematuri	Non prematuri
Fino 24 h	1,0-8,0 mg/dL = 17-137 µmol/L	2,0-6,0 mg/dL = 34-103 µmol/L
Fino 48 h	6,0-12,0 mg/dL = 103-205 µmol/L	6,0-10 mg/dL = 103-171 µmol/L
3-5 giorni	10-14 mg/dL = 171-239 µmol/L	4,0-8,0 mg/dL = 68-137 µmol/L

Questi valori si danno unicamente a titolo orientativo; si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli di riferimento.

CONTROLLO DI QUALITA'

Si raccomanda l'uso di Siero di Controllo Titolato livello I (Cod. 18005, 18009 e 18042) e II (Cod. 18007, 18010 e 18043) per verificare la funzionalità del procedimento di misura.

Ogni laboratorio deve stabilire il proprio programma di Controllo di Qualità interno, cosí come procedimenti di correzione nel caso i controlli non corrispondano con le tolleranze accettabili.

CARATTERISTICHE METROLOGICHE

– Limite di rilevazione (bilirubina totale): 0,003 mg/dL = 0,05 µmol/L
– Limite di rilevazione (bilirubina diretta): 0,02 mg/dL = 0,34 µmol/L
– Limite di linearità: 20 mg/dL = 343 µmol/L. Qualora si ottengano valori superiori, diluire il campione 1/3 con acqua distillata e ripetere la determinazione.
– Ripetibilità (nella serie):

Bilirubina totale	CV	n	Bilirubina diretta	CV	n
0,59 mg/dL = 10,1 µmol/L	3,0 %	20	0,77 mg/dL = 13,2 µmol/L	1,2 %	20
6,74 mg/dL = 115,2 µmol/L	1,0 %	20	1,36 mg/dL = 23,2 µmol/L	0,5 %	20

– Riproducibilità (fra le serie):

Bilirubina totale	CV	n	Bilirubina diretta	CV	n
0,59 mg/dL = 10,1 µmol/L	3,6 %	25	0,77 mg/dL = 13,2 µmol/L	2,3 %	25
6,74 mg/dL = 115,2 µmol/L	3,3 %	25	1,36 mg/dL = 23,2 µmol/L	0,9 %	25

– Sensibilità (bilirubina totale): 88 mA·dL/mg = 5,15 mA·L/µmol
– Sensibilità (bilirubina diretta): 100 mA·dL/mg = 5,85 mA·L/µmol
– Veracità: I risultati ottenuti con questi reattivi non mostrano differenze sistematiche significative se comparati con reattivi di riferimento (Nota 4). I dettagli dello studio comparativo sono disponibili a richiesta.
– Interferenze: L' emolisi non interferisce (emoglobina 10 g/L). La lipemia (trigliceridi > 15 g/L) interferisce Altri farmaci e sostanze possono interferire[6].

Questi dati sono stati ottenuti utilizzando un analizzatore. I risultati possono variare al cambiare di strumento o realizzando il procedimento manualmente.

CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE

La bilirubina è un prodotto di scarto derivato dal gruppo emo della emoglobina degli eritrociti danneggiati o senescenti, che sono distutti nelle cellule reticoloendoteliali. Una volta prodotta, la bilirubina viene trasportata al fegato in associazione con l' albumina. La bilirubina nello epatocito si coniuga con l' acido glucoronico e viene escreta nella bile. Esistono una serie di malattie ereditate o acquisite che riguardano la produzione, captazione, metabolismo ed escrezione della bilirubina, che risultano in una iperbilirubinemia[4,7].

Si osserva iperbilirubinemia non coniugata in neonati (ittero fisiologico), in un aumento della distruzione di eritrociti (anemia emolitica, ematoma esteso), in eritropoiesi difettosa come in alcune malattie genetiche poco frequenti (sindrome di Gilbert, sindrome di Crigler-Najjar).

La iperbilirubinemia coniugata è associata ad una riduzione nell' escrezione di bile dovuta a malattie epatiche (epatiti o cirrosi) o ad una colestasi intra o extraepatica.

L' ittero è una manifestazione clinica della iperbilirubinemia, che consiste in una deposizione dei pigmenti biliari nella pelle, originando colorazione ambrata della pelle e mucose.

La diagnosi clinica non può essere fatta tenendo conto del risultato di un unico esame, ma deve integrare i dati clinici e di laboratorio.

NOTE

1. Per la determinazione di bilirubina neonatale, ricostituire lo Standard con 1,0 mL di acqua distillata. La concentrazione in tal caso sará quella indicata sull' etichetta moltiplicata per 5. E' conveniente ridurre il volume di campione (acqua, standard, siero) a 50 µL e utilizzare lo Standard concentrato. Si duplica cosí la linearità del metodo (fino 40 mg/dL= 686 µmol/L).
2. E' conveniente lavare il vial di Reattivo B con una piccola quantità della miscela preparata, al fine di prelevare i residui che rimangano sulle pareti del flacone.
3. Questo reattivo può essere utilizzato sulla maggioranza degli analizzatori automatici. Sollicitate informazione al vostro distributore.
4. La calibrazione con lo standard acquoso può causare slittamenti, specialmente su alcuni analizzatori. In questi casi, si raccomanda di calibrare usando uno standard a base serica (Calibratore Biochimica, cod. 18011 e 18044).

BIBLIOGRAFIA

1. Pearlman FC and Lee RTY. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents. Clin Chem 1974; 20: 447-453.
2. Zoppi F, Peracino A, Fenili D, Marcovina S and Ramella C. Metodo per la determinazione della bilirubina totale e coniugata. Uso di un tensioattivo cationico come agente solubilizzante. Giorn It Chim Cl 1976; 1:343-359.
3. World Health Organization (WHO). Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. Document WHO/DIL/LAB/99.1, Rev.2; 2002.
4. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
5. McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 20st ed. Saunders Elsevier, 2001:1427
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 2001.