



NÁVOD K POUŽITÍ

BILIRUBIN 600 OX

KATALOGOVÉ ČÍSLO 205

IVD **CE**



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

POUŽITÍ

Souprava Bilirubin 600 OX se používá ke kvantitativnímu stanovení koncentrace celkového bilirubinu v krevním séru na automatických analyzátozech.

SOUHRN

Bilirubin je barvivo vznikající v lidském organismu především z hemu hemoglobinu v menší míře pak ze sloučenin, které obsahují hem. Hlavním orgánem, kde dochází k metabolizaci hemoglobinu je slezina. V první fázi vzniká zelený biliverdin, který je ještě ve slezině redukován na žlutý bilirubin. Vzniklý bilirubin je krví transportován do jater. Bilirubin je ve vodném prostředí nerozpustný a proto je navázán na hydrofilní nosič - albumin. Játra bilirubin z krevního oběhu vychytávají a pomocí cytosolu hepatocytů je přenesen do mikrosomální oblasti, kde dochází k esterifikaci bilirubinu za vzniku diglukuronidu bilirubinu. Tento proces se nazývá konjugace a jeho cílem je zajistit rozpustnost bilirubinu ve vodě. Bilirubin vázaný na albumin reaguje s činidly na jeho stanovení až po uvolnění z vazby na albumin a označujeme jej jako bilirubin nekonjugovaný nebo nepřímý. Z důvodu vazby na albumin nedochází k jeho průchodu zdravým glomerulem do moči. Esterifikovaný bilirubin je označován jako bilirubin konjugovaný, nebo-li přímý neboť přímo reaguje s činidly na stanovení bilirubinu. Při zvýšené koncentraci v plasmě tento bilirubin proniká do moči. Při delší konjugované hyperbilirubinémii dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi konjugovaným bilirubinem a albuminem za vzniku delta bilirubinu. Konjugovaný bilirubin jaterní buňka předává do primárních žlučovodů a žlučí se dostává do tenkého střeva, kde dochází k jeho redukci za vzniku řady barevných produktů z nichž největší podíl tvoří urobilinogen a sterkobilinogen.

Monitorování koncentrace bilirubinu u novorozenců a zejména nedonošených má velký význam. Metabolismus přeměny bilirubinu není u nich zcela vyvinut, bilirubin se může v jejich organismu hromadit a vyvolat tzv. *novorozeneckou žloutenku*, při které bilirubin proniká do lipofilních mozkových buněk a tyto nevratně poškodí¹.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

PRINCIP METODY

Bilirubin je v prostředí acetátového pufru v přítomnosti kofeinu oxidován pomocí hexakynoželezitanu draselného na biliverdin. Pokles intenzity zbarvení je lineárně závislý na koncentraci bilirubinu².

SLOŽENÍ SOUPRAVY

1 ČINIDLO 5x100 ml:	Acetátový pufr	683 mmol/l
	Benzoan sodný	389 mmol/l
	Kofein	193 mmol/l
	Chelaton III	1 mmol/l
	Detergenty, stabilizátory	
2 ČINIDLO 1 x 100 ml:	Hexakynoželezitan draselný	5 mmol/l
	Chlorid sodný	154 mmol/l

PŘÍPRAVA ČINIDEL

1 ČINIDLO a 2 ČINIDLO jsou připraveny k přímému použití.

STABILITA SOUPRAVY

1 ČINIDLO a 2 ČINIDLO jsou při teplotě 2 – 25 °C stabilní až do doby expirace.

POUŽITÝ MATERIÁL

Ke stanovení se používá krevní sérum. Sérum lze skladovat při teplotě 2 – 8 °C 7 dní a při teplotě –20 °C 6 měsíců. Sérum je nutné skladovat vždy ve tmě.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

POSTUP ANALÝZY

	VZOREK [μ l]	STANDARD [μ l]	KONTR. VZOREK [μ l]
SÉRUM	10	–	–
STANDARD	–	10	–
1. ČINIDLO	250	250	250

Vše se promíchá a za 5 min. se změří absorbance blanku standardu A_{BISt} a vzorku A_{BIVz} proti kontrolnímu vzorku.

	VZOREK [μ l]	STANDARD [μ l]	KONTR. VZOREK [μ l]
2. ČINIDLO	50	50	50

Promíchá se a za dalších 5 minut se změří absorbance standardu A_{St} a vzorku A_{Vz} . Měření se provádí při 480 nm (eventuálně 470-490 nm) v 10 mm skleněných popř. plastových kytetách. V případě bichromatického měření se vedlejší vlnová délka nastaví na hodnotu 660 nm.

VÝPOČET

$$fS_{\text{Bilirubin}} [\mu\text{mol/l}] = c_{St} \cdot \frac{A_{Vz} - A_{BIVz}}{A_{St} - A_{BISt}}$$

c_{St} – koncentrace bilirubinu ve standardu ($\mu\text{mol/l}$)

KALIBRACE A KONTROLA

Ke kalibraci se používají komerčně dodávané kalibrátory například LYONORM kalibrátor firmy ERBA-LACHEMA. Ke kontrole lze použít kontrolní séra dodávaná řadou firem, například LYONORM HUM N a HUM P firmy ERBA-LACHEMA.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

REFERENČNÍ INTERVAL³

Novorozenci, pupečnicková krev	< 34,2 $\mu\text{mol/l}$
0-1 den	24 – 149 $\mu\text{mol/l}$
1-2 dny	58 – 197 $\mu\text{mol/l}$
3-5 dní	26 – 205 $\mu\text{mol/l}$
Dospělí	5 – 21 $\mu\text{mol/l}$

ZNAKY ANALYTICKÉ METODY

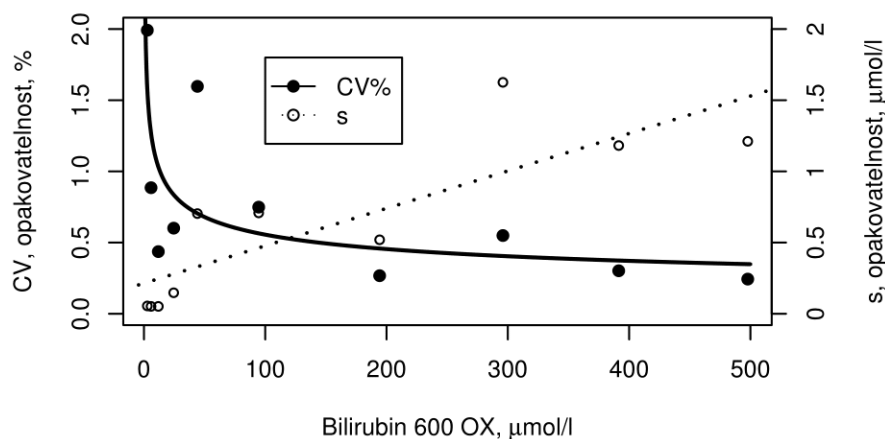
NEPŘESNOST

Odhady nepřesnosti v sérii a celkové nepřesnosti byly získány měřením na základě protokolu EP5-A NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)⁴. Celkový počet pozorování byl N=80 u každé koncentrace séra. Výsledky v tabulce jsou platné pro měření na analyzátoru ADVIA 1650, Bayer.

Vzorek	Průměr $\mu\text{mol/l}$	Směrodatná odchylka $\mu\text{mol/l}$				Celková CV %	N
		uvnitř série	Mezi sériemi	mezi dny	celková		
Nízký sérový pool	11,21	0,41	0,00	1,16	1,23	10,9	80
Vysoký sérový pool	171,21	1,64	0,00	4,84	5,10	2,98	80

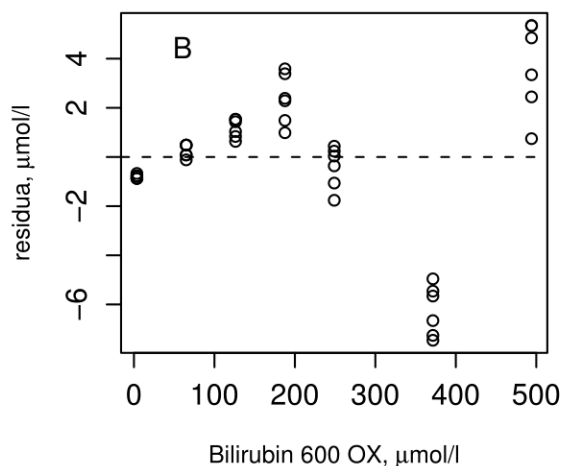
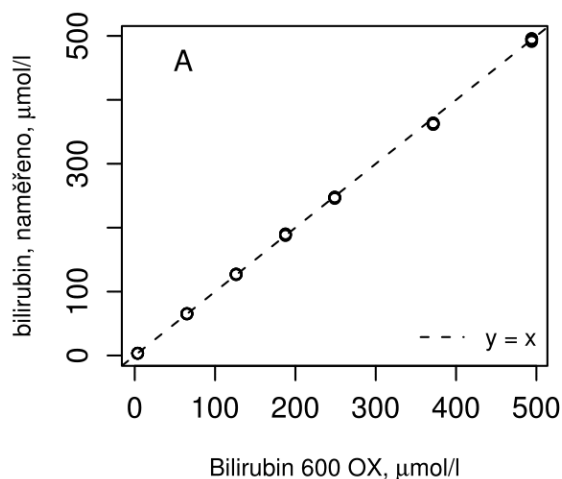
PROFIL PŘESNOSTI

Profil přesnosti byl sestaven na základě opakovaného měření vzorků sér deseti pacientů s koncentrací bilirubinu v rozmezí 3 – 500 $\mu\text{mol/l}$. Zatímco směrodatná odchylka opakovaných stanovení se zvyšuje s rostoucí koncentrací jen velmi mírně (tečkovaná čára), opakovatelnost vyjádřená jako variační koeficient (plná čára) prudce narůstá v oblasti pod 4 $\mu\text{mol/l}$, což dobře koresponduje s odhadnutou mezí stanovitelnosti (3,5 $\mu\text{mol/l}$) vypočtené z kalibrační křivky a přesností zjištěnou v experimentu EP5-A.



LINEARITA

Linearita stanovení celkového bilirubinu byla testována v oblasti koncentrací 3,6 – 500 µmol/l. V tomto intervalu korelační koeficient dosahuje hodnotu 0,9999, přímka prochází počátkem, což svědčí o uspokojivém proložení přímky měřenými body⁵. Residua nevykazují žádný významný trend. Maximální odchylka od linearity je při koncentraci 370 µmol/l a dosahuje 6,2 µmol/l, relativně 1,7 %. Statisticky jsou odchylky od linearity významné na hladině významnosti 0,01 ($F_{(5, 35)} = 10.7$ test, vážená lineární regrese, program⁶), prakticky však jsou odchylky malé, zvláště pokud vezme do úvahy maximální celkovou dovolenou chybu TE_a pro bilirubin odvozenou z biologické variability stanovení (31,1%)⁷.



Test linearity stanovení bilirubinu

A. Regresní přímka $y = 0,991 \cdot x + 0,801$, $r = 0,9999$, $s_{y/x} = 3,14 \mu\text{mol/l}$, $n = 42$.

Intercept statisticky nevýznamný od nuly $p > 0,05$.

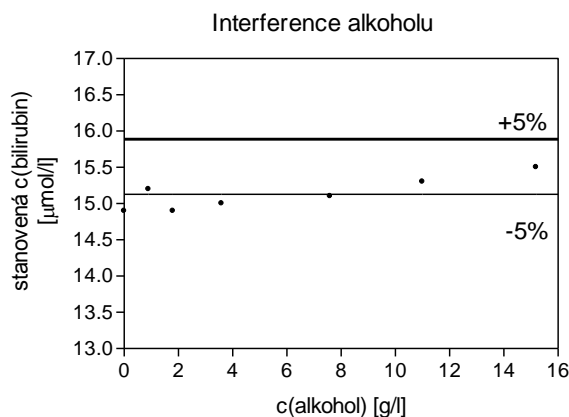
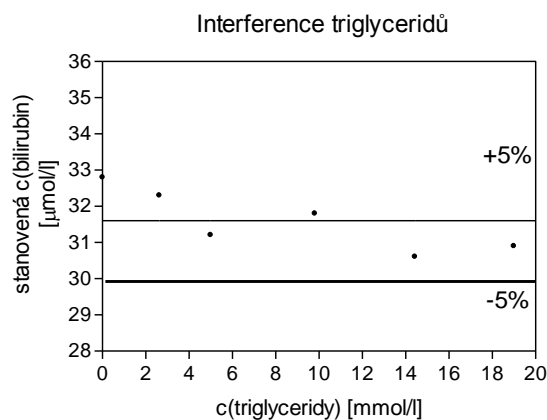
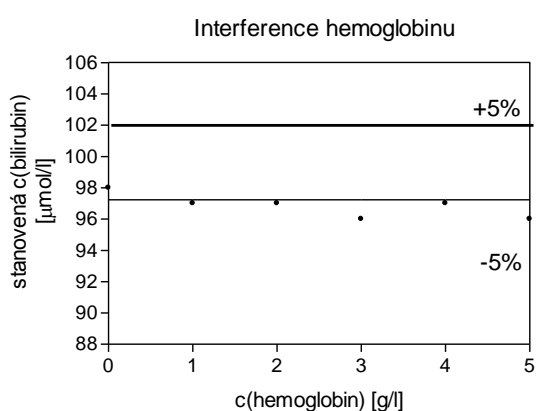
B. Graf residuí.

MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

Výpočtem z kalibrační křivky s použitím vážené lineární regrese ($n = 42$, interval 3,6 – 500 $\mu\text{mol/l}$) byla mez detekce stanovena na 2,6 $\mu\text{mol/l}$ a mez stanovitelnosti⁸ na 3,8 $\mu\text{mol/l}$.

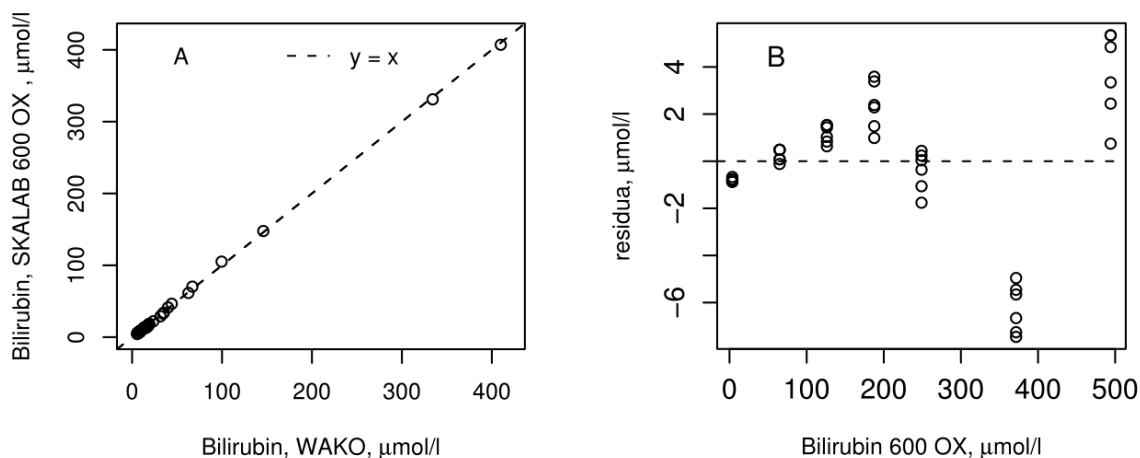
INTERFERENCE

- Hemoglobin neinterferuje až do koncentrace 5 g/l.
- Triacylglyceridy neinterferují až do koncentrace 20 mmol/l.
- Alkohol neinterferuje až do koncentrace 16 g/l.



SROVNÁNÍ S JINOU OXIDAČNÍ METODOU (WAKO)

Bylo analyzováno 50 vybraných vzorků pacientů s metodou stanovení bilirubinu fy WAKO pracující na obdobném oxidačním principu⁹ na analyzátoru COBAS Intergra. Stejně vzorky byly analyzovány soupravou SKALAB Bilirubin 600 OX na analyzátoru ADVIA 1650. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny neparametrickou metodou podle Passinga a Babloka⁵ a metodou diferenčního grafu. Pro vyhodnocení byl použit program⁶. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ není směrnice regresního vztahu signifikantně významná od 1,00 – proporcionalní složka chyby není přítomna; signifikantní úsek na ose y je potvrzením přítomnosti malé konstantní chyby $-0,8 \mu\text{mol/l}$. Bias vypočtený z regresní rovnice je při koncentraci $20 \mu\text{mol/l}$ asi $1 \mu\text{mol/l}$.



Srovnání stanovení bilirubinu

- A.** Passing-Bablokova regrese. Regresní rovnice $y = 0,995 x - 0,83$, $r = 0,995$. Intervaly spolehlivosti v tabulce.
- B.** Diferenční graf. Průměrná diference $-0,72 \mu\text{mol/l}$ je signifikatní na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ (párový t-test).

Srovnání metody stanovení bilirubinu SKALAB 600 OX a WAKO

Passingova-Bablokova regrese	n	Směrnice (95% CI)	Intercept (95% CI)	r *
	59	0,995 (0,979– 1,020)	-0,83 (-1,14 – (-0,49))	0,995

* pořadový korelační koeficient

Celková povolená analytická chyba (TE_a, CLIA) pro bilirubin je $7 \mu\text{mol/l}$, popř. 20 % (větší z hodnot)¹⁰. Konstantní chyba odhadnutá z regrese nebo srovnávacího grafu tvoří zanedbatelnou část TE_a.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

LITERATURA

1. Racek J. et al.: *Klinická biochemie*, Galen, Praha, 207-209, 1999, ISBN 80-7262-023-1.
2. O'Leary N., Pembroke A., Duggan P. F.: *A robust procedure for the automated measurement of total serum bilirubin using potassium ferricyanide*, Ann Clin Biochem 1993; 30: 175-179.
3. Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed. Saunders, Philadelphia, 1803, 1999, ISBN 0-7216-5610-2.
4. National Comitée for Clinical Chemistry Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Device; Approved Guideline. NCCLS document EP5-A, 1997.
5. Passing H., Bablok W.: *A New Biometrical Procedures for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods*. J.Clin.Chem.Clin.Biochem. 1983;21:709-720.
6. Linnet K.: *A Program for Statistical Analysis in Clinical Biochemistry*. Version 4.2.0. Denmark.1997-2001.
7. Fraser CG: *Biological Variation From Principles to Practice*. AACC Press, Washington, 140, 2001, ISBN 1-890883-49-2.
8. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus. Praha, 505-6, 1994, ISBN 80-85297-56-6.
9. Pracovní návod soupravy Bilirubin WAKO – *TOTAL BILIRUBIN L - TYPE*
10. CLIA Requirements for Analytical Duality. Dostupný z internetových stránek: <http://www.westgard.com/clia.htm> 2005-10-21.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

Datum poslední revize: 19. 3. 2015

Výrobce:



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
Tel.: +420 461 531 163
Mobil: +420 777 176 107, +420 777 324 399
Fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

