



NÁVOD K POUŽITÍ

BILIRUBIN PŘÍMÝ 360 OX

KATALOGOVÉ ČÍSLO 306

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 přímý 360 OX se používá ke kvantitativnímu stanovení koncentrace přímého bilirubinu v krevním séru na automatických analyzátorech.

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 vycytávají 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 žlučových 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

Přímý bilirubin je v prostředí imidazolového pufru oxidován měďnatými ionty na biliverdin. Pokles intenzity zabarvení je lineárně závislý na koncentraci přímého bilirubinu.

SLOŽENÍ SOUPRAVY

1. ČINIDLO 3 x 100 ml:	Kyselina citronová	683 mmol/l
	Imidazol	389 mmol/l
	Thiomočovina	193 mmol/l
	Chelaton III	1 mmol/l
	Detergenty, stabilizátory	
2. ČINIDLO 1 x 100 ml:	Síran měďnatý pentahydrát	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	15	–	–
STANDARD	–	15	–
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 450 nm (eventuálně 440-460 nm) v 10 mm skleněných kyvetách. V případě bichromatického měření se vedlejší vlnová délka nastaví na hodnotu 546 nm.

VÝPOČET

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

C_{St} – koncentrace přímého 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 INTERVAL

Muži, ženy 0 – 3,4 $\mu\text{mol/l}$

ZNAKY ANALYTICKÉ METODY

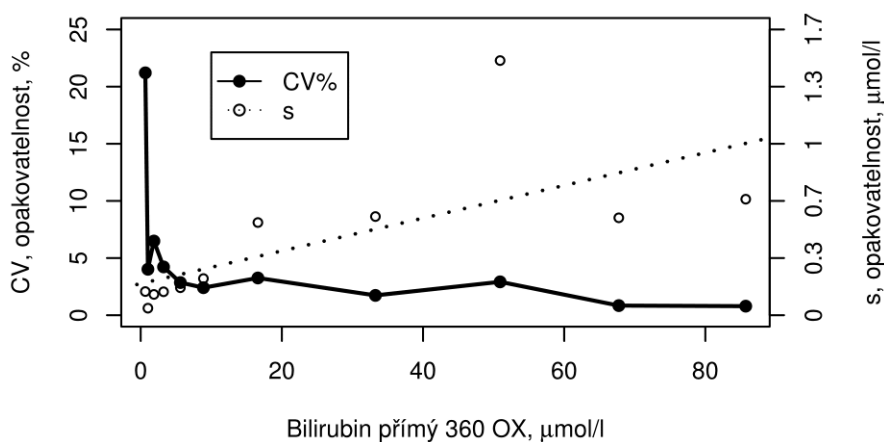
NEPŘESNOST

Odhady nepřesnosti v sérii a celkové nepřesnosti byly získány měřením na základě protokolu EP5-A NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)³. Celkový počet pozorování byl N=80 u každého 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	7,4	0,34	0,00	0,55	0,64	8,7	80
Vysoký sérový pool	62,0	0,84	0,00	1,65	1,85	3,0	80

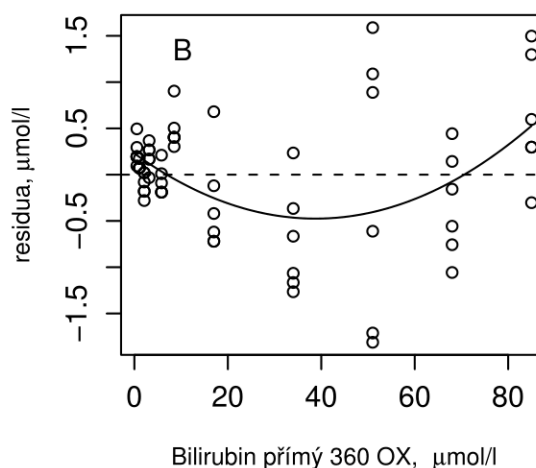
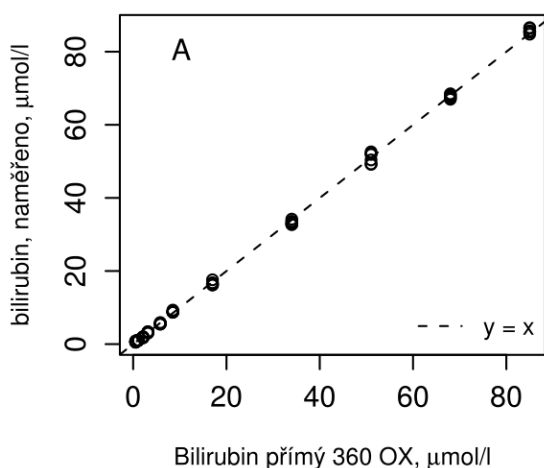
PROFIL PŘESNOSTI

Profil přesnosti byl stanoven na základě opakovaného měření jedenácti vzorků sér s koncentrací přímého bilirubinu v rozmezí 0,65 – 85,7 $\mu\text{mol/l}$. 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 koncentrací menších než 1,0 $\mu\text{mol/l}$. Výsledky dobře korespondují s odhadnutou mezí stanovitelnosti (1,1 $\mu\text{mol/l}$) a přesností zjištěnou v experimentu EP5-A.



LINEARITA

Linearita stanovení přímého bilirubinu dosahuje minimálně hodnoty 85,7 μmol/l. V tomto intervalu je korelační koeficient lineární regrese 0,9997, přímka prochází počátkem. To svědčí o uspokojivém proložení přímky měřenými body⁴. Rovněž přímka proložená residui má oba koeficienty statisticky nevýznamné od nuly na hladině významnosti 0,001.



A. Regresní přímka $y = 1,003x - 0,126$, $r=0,9997$, $s_{y/x}=0,655$ g/l, $n = 66$.

B. Graf residuí.

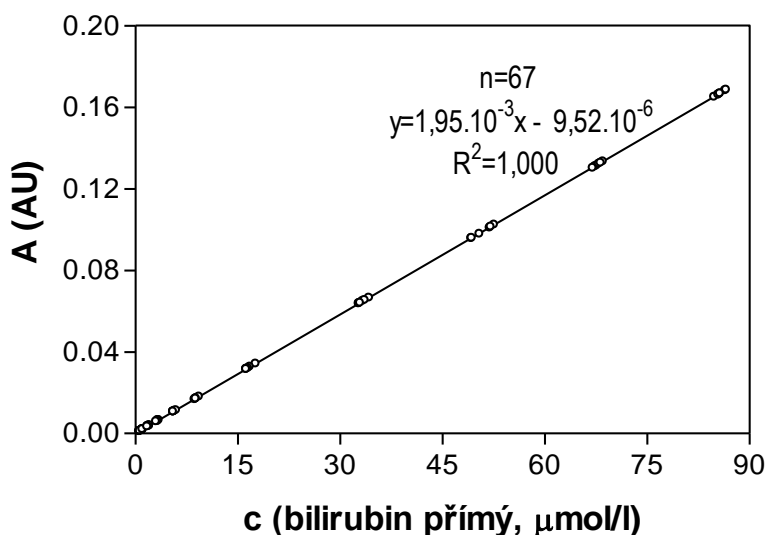


F-test rozptylů na základě lineární regrese nevykazuje odchylky od linearitu ($F_{(9,55)} = 2,8823$, $p = 0,051$), program⁸.

MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

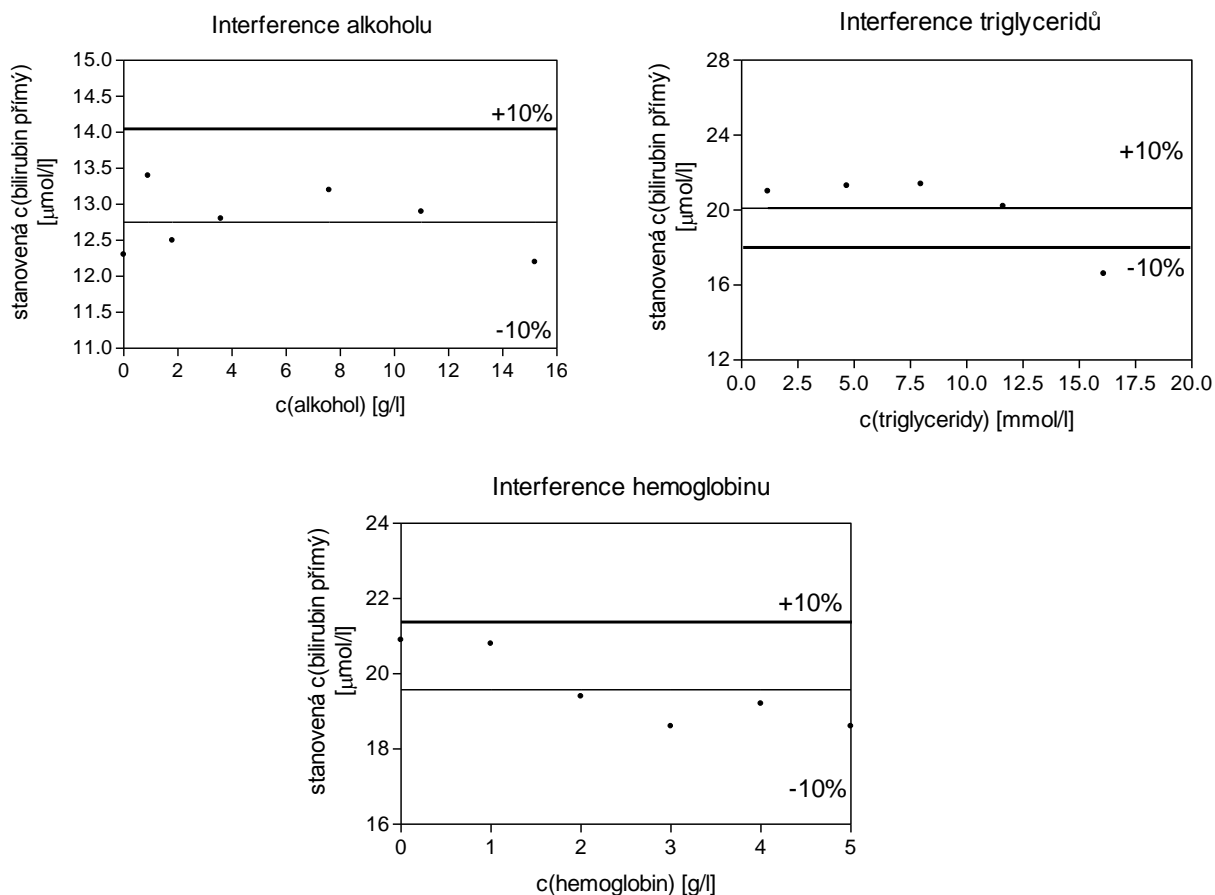
Výpočtem z opakovaného měření blanku ($n = 13$) byla mez detekce odhadnuta na $0,4 \mu\text{mol/l}$ a mez stanovitelnosti⁵ na $1,1 \mu\text{mol/l}$.

Kalibrační křivka, Bilirubin přímý 360 OX



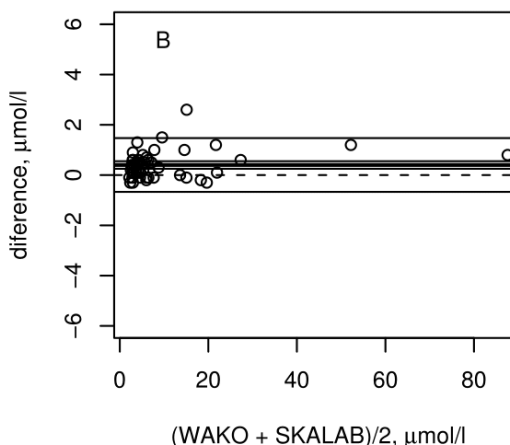
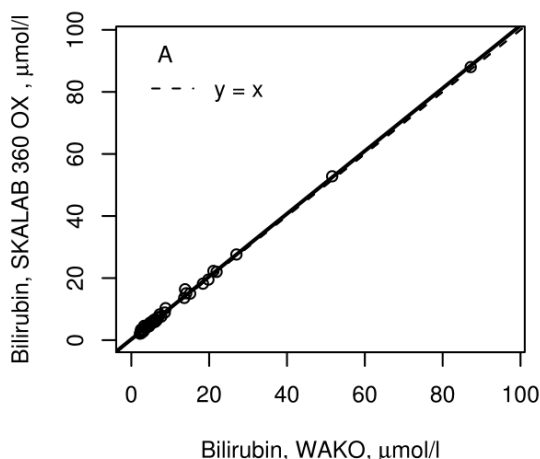
INTERFERENCE

- Hemoglobin neinterferuje až do koncentrace 5 g/l .
- Triacylglyceridy neinterferují až do koncentrace 20 mmol/l .
- Alkohol neinterferuje až do koncentrace 15 g/l .



SROVNÁNÍ S JINOU OXIDAČNÍ METODOU (WAKO)

Bylo analyzováno 50 vybraných vzorků pacientů s metodou stanovení bilirubinu fy WAKO pracující na obdobném oxidačním principu⁸ na analyzátoru COBAS Integra. Stejně vzorky byly analyzovány soupravou SKALAB Bilirubin 360 OX na analyzátoru ADVIA 1650. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny neparametrickou metodou podle Passinga a Babloka⁴ metodou diferenčního grafu. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ není směrnice regresního vztahu signifikantně významná od 1,00 – proporcionální složka chyby není přítomna; signifikantní úsek na ose y je potvrzením přítomnosti malé konstantní chyby 0,4 $\mu\text{mol/l}$. Bias vypočtený z regresní rovnice je při koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ asi 0,3 $\mu\text{mol/l}$, stejnou hodnotu má i medián difference v párovém neparametrickém ve Wilcoxonově testu ($p < 0,001$). Pro vyhodnocení byl použit program⁵.



Srovnání stanovení bilirubinu

- A.** Passing-Bablokova regrese. Regresní rovnice $y = 1,011 x + 0,263$, $r = 0,977$. Intervaly spolehlivosti koeficientů jsou v tabulce.
- B.** Diferenční graf. Průměrná diference $0,40 \mu\text{mol/l}$ je signifikantní na hladině významnosti $\alpha = 0,01$ (párový t-test). Wilcoxonův test: medián diference $0,3 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,001$.

Srovnání metody stanovení bilirubinu SKALAB 360 OX a WAKO

Passingova-Bablokova regrese	n	Směrnice (95% CI)	Intercept (95% CI)	r *
	50	1,011 (1,000– 1,042)	0,263 (0,065 – 0,300)	0,977

* pořadový korelační koeficient

Celková povolená analytická chyba TE_a^{10} je pro bilirubin je 44,5%. Konstantní chyba odhadnutá z regrese nebo srovnávacího grafu tvoří malou 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. 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; Aprovede Guidline. 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. Pracovní návod soupravy Bilirubin WAKO – *TOTAL BILIRUBIN L – TYPE*
9. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias Derived from Biological Variation. Dostupný z internetových stránek: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm> 2006-02-22.

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



Návod k použití

BILIRUBIN PŘÍMÝ 360 OX
kód 306



Strana 10/10