

Προβλεπόμενη χρήση

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της άμεσης χολερυθρίνης σε ορό με τη χρήση των αναλυτών Yumizen C230 και Yumizen C240. Αποκλειστικά για *in vitro* διαγνωστική χρήση. **Rx Only.**

Ιστορικό μεθόδου

Από την εισαγωγή της μεθόδου diazo για τον προσδιορισμό της χολερυθρίνης από τον Ehrlich το 1883,¹ έχουν προταθεί αρκετές τροποποιήσεις για την ενίσχυση της αντίδρασης. Στη μέθοδο Malloy και Evelyn² εφαρμόζεται μεθανόλη για την κατάλυση της αντίδρασης αζωσουλφικής της έμμεσης χολερυθρίνης, καθώς και για τη διατήρηση της αζωχολερυθρίνης στο διάλυμα. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η πρωτεΐνη μπορεί να ιζηματοποιηθεί λόγω του διαλύματος μεθανόλης, αποδίδοντας αποτελέσματα ψευδώς χαμηλότερων τιμών.

Το 1938, οι Jendrassik και Grof³ παρουσίασαν μια δοκιμασία προσδιορισμού που απέδωσε αξιόπιστα αποτελέσματα. Ωστόσο, η μέθοδος είναι δύσκολη και εμπιέχει πολλά βήματα αναρρόφησης με πιπέτα.

Η μέθοδος που παρουσιάζεται στο παρόν αναπτύχθηκε από τους Wahlefeld κ.α.⁴ Το αντιδραστήριο diazo είναι 2,5-δihλωροφαινόλυδοαζόνιο τετραφθοροβόρικο (DPD) το οποίο αντιδρά εξαιρετικά ταχέως στη σύζευξη με χολερυθρίνη υπό όξινες συνθήκες. Η προκύπτουσα διαδικασία είναι απλή, ενώ παρουσιάζει καλή συσχέτιση όταν συγκρίνεται με τη μέθοδο των Jendrassik και Grof.

Αρχή

Η άμεση χολερυθρίνη συζεύσσεται με ένα άλας διαζωνίου (DPD) σε έντονα όξινο μέσο (pH 1 – 2).



Η ένταση του χρώματος της αζωχολερυθρίνης που παράγεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της άμεσης χολερυθρίνης και μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά.

Αντιδραστήρια

1. Αντιδραστήριο Direct Bilirubin R1: όξινο ρυθμιστικό διάλυμα 50 mmol/L
2. Αντιδραστήριο Direct Bilirubin R2: όξινο ρυθμιστικό διάλυμα >30 mmol/L, >2,0 mmol/L DPD και σταθεροποιητές

Προφυλάξεις

1. Τα αντιδραστήρια είναι τοξικά και διαβρωτικά. Μην εκτελείτε αναρρόφηση με πιπέτα από το στόμα. Αποφεύγετε την επαφή με το δέρμα και τα ρούχα.
2. Αυτό το αντιδραστήριο προορίζεται μόνο για *in vitro* διαγνωστική χρήση.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Τα αντιδραστήρια παρέχονται έτοιμα προς χρήση.

Αποθήκευση αντιδραστηρίων

1. Τα συσκευασμένα αντιδραστήρια μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία 2-8°C. Το αντιδραστήριο παραμένει σταθερό μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον φυλάσσεται σύμφωνα με τις οδηγίες.
2. Μην καταψύχετε τα αντιδραστήρια.
3. Αποφεύγετε την έκθεση σε άμεσο ηλιακό φως.

Αλλοίωση αντιδραστηρίου

1. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν υπάρχουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης (θολρότητα).
2. Εάν το αντιδραστήριο R2 σχηματίσει πολύ μικρό ίζημα το οποίο επαναδιαλύεται όταν το R2 θερμανθεί ελαφρώς, το αντιδραστήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί.
3. Τυχόν αντιδραστήριο R2 που περιέχει ίζημα που δεν επαναδιαλύεται και οδηγεί στον αποχρωματισμό του προϊόντος, δεν πρέπει να χρησιμοποιηθεί.
4. Μην χρησιμοποιείτε το αντιδραστήριο εάν δεν επιτευχθούν οι εκχωρημένες τιμές δοκιμασίας προσδιορισμού των φρέσκων ορών μάρτυρα.

Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων

1. Συνιστάται η χρήση φρέσκου, μη αιμολυμένου ορού.⁵
2. Τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση εντός δύο ωρών από τη συλλογή, εάν διατηρούνται σε σκοτεινό μέρος με θερμοκρασία δωματίου, και εντός δώδεκα ωρών, εάν διατηρούνται στο ψυγείο (2-8°C) και προστατεύονται από το φως.⁶
3. Η χολερυθρίνη σε ορό παραμένει σταθερή για τρεις μήνες, εφόσον φυλάσσεται σε συνθήκες κατάψυξης (-20°C) και προστατεύεται από το φως.⁶
4. Το άμεσο ηλιακό φως μπορεί να προκαλέσει έως και 50% μείωση στη χολερυθρίνη εντός μίας ώρας.⁷
5. Η συλλογή δειγμάτων πρέπει να πραγματοποιείται σύμφωνα με το M29-T2 της NCCLS. Καμία μέθοδος δεν μπορεί να διασφαλίσει πλήρως ότι τα δείγματα ανθρώπινου αίματος δεν αποτελούν μολυσματικό παράγοντα. Συνεπώς, όλα τα δείγματα αίματος πρέπει να θεωρούνται εν δυνάμει μολυσματικά.

Αλληλεπιδράσεις

1. Όλες οι μελέτες παρεμβολών πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις διαδικασίες που συνιστώνται στην κατευθυντήρια οδηγία με αρ. EP7-P της NCCLS για τις δοκιμές παρεμβολών κλινικής χημείας.⁸
2. Η αιμοσφαιρίνη ορού σε επίπεδα έως και 100 mg/dL δεν προκαλεί παρεμβολές στα αποτελέσματα.
3. Τα τριγλυκερίδια ορού σε επίπεδα έως και 500 mg/dL δεν προκαλούν παρεμβολές στα αποτελέσματα.
4. Ορισμένα φάρμακα και ουσίες επηρεάζουν τα αποτελέσματα χολερυθρίνης. Βλ. Young, et al.⁹

Παρεχόμενα υλικά

Αντιδραστήρια άμεσης χολερυθρίνης R1 και R2

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

1. Αναλυτής Yumizen C230 / Yumizen C240.
2. Εγχειρίδιο λειτουργίας Yumizen C230 / Yumizen C240.
3. Pointe Chemistry Calibrator, αριθμός καταλόγου C7506-50
4. Pointe Chemistry Control, αριθμός καταλόγου C7592-100

Παράμετροι εξέτασης

| | | | |
|-------------------|---------------|------------------------|-------------------|
| Εξέταση: | DBIL | Χημικό στοιχείο: | Άμεση χολερυθρίνη |
| Χημικός αρ.: | 205 | Πλήρης ονομασία: | Άμεση χολερυθρίνη |
| Τύπος αντίδρασης: | Τελικό σημείο | Κατεύθυνση αντίδρασης: | Θετική |
| Πρωτ. κύμα: | 546 nm | Δευτ. Κύμα: | 670 nm |
| Δεκαδικό: | 0,1 | Τύπος δείγματος: | Ορός |
| Χρόνος τυφλού: | -2 -1 | Χρόνος αντίδρασης: | 18 19 |
| Μονάδα: | mg/dL | Χρόνος επίτασης: | 3 |

| | Όγκος δείγματος | Αναρροφήθηκε | Αραιωτικό | Όγκος αντιδραστηρίου | Αραιωτικό |
|-----------|-----------------|--------------|-----------|----------------------|-----------|
| Πρότυπο, | 4 | uL | uL | 180 | uL |
| Μειωμένο, | | uL | uL | 47 | |
| Αυξημένο, | | uL | uL | | |

| | | | |
|---------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
| Εύρος γραμμικότητας (Πρότυπο), | 0,1-10 | Όριο γραμμικότητας: | |
| Εύρος γραμμικότητας (Μειωμένο): | | Μείωση υποστρώματος: | |
| Εύρος γραμμικότητας (Αυξημένο): | | Μικτή απορρόφηση τυφλού: | -40000 40000 |
| Απορρόφηση τυφλού R1: | -40000 40000 | Σταθερότητα επί του συστήματος: | 30 Ημέρες |
| Απόκριση τυφλού | -40000 40000 | Όριο συναγερμού αντιδραστηρίου: | 5 |
| Διπλές χημείες: | | | |

| | | |
|-------------------|-----|------|
| Έλεγχος προζώνης: | | |
| Q1: | Q2: | Q3: |
| Q4: | PC: | ABS: |

| | |
|--------------------------------|-------------|
| Χρήση ποσοτικού αποτελέσματος: | |
| Εύρος: | Επίσημανση: |

| | | | |
|--------------------|-------|------------|--------|
| Μετατόπιση κλίσης: | | | |
| | Κλίση | Μετατόπιση | Μονάδα |
| | 1 | 0 | mg/dL |

Σετ αντιδραστηρίων Pointe Direct Bilirubin

Προεργασία:

Προεργασία όγκου δείγματος: uL Προεργασία όγκου αντιδραστηρίου: uL

Εύρος αναφοράς:

Τύπος δείγματος: Φύλο: Εύρος ηλικίας: Εύρος αναφοράς: Κρίσιμο εύρος: Μονάδα:

Παράμετροι ρύθμισης βαθμονόμησης

Χημ.: Ρύθμιση βαθμονόμησης
Μαθηματικό μοντέλο: Γραμμικό δύο σημείων
Συντελεστής: Επαναλήψεις: 2

Αποδεκτά όρια
Χρόνος βαθμ.: 336 ώρες
Διαφ. κλίσης: SD:
Ευσαιθησία: Επαναληψιμότητα: * Ορίζεται από τον χρήστη
Συντ. προσδ.:
Αυτόματη βαθμ. Χρόνος βαθμ.

| Βαθμονομητής | Συγκ. | Θέση | Αρ. παρτίδας |
|-------------------|-------|------|--------------|
| Νερό | 0,0 | W | |
| Χημ. βαθμονομητής | * | * | |

Βαθμονόμηση

Χρησιμοποιήστε βαθμονομητή ορού ιχθυλάσιμο με τη μέθοδο NIST. Για τη βαθμονόμηση, ακολουθήστε τις οδηγίες εφαρμογής του οργάνου. Για τις διαδικασίες και τη συχνότητα βαθμονόμησης, ανατρέξτε στις οδηγίες του εγχειριδίου του οργάνου. Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθορίζει τη δική του συχνότητα βαθμονόμησης.

Ποιοτικός έλεγχος

Η εγκυρότητα της αντίδρασης πρέπει να παρακολουθείται μέσω της χρήσης ορών μάρτυρα με γνωστές φυσιολογικές και μη φυσιολογικές τιμές άμεσης χολερυθρίνης. Αυτοί οι μάρτυρες πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση τουλάχιστον σε κάθε βάρδια στην οποία διενεργούνται δοκιμασίες προσδιορισμού άμεσης χολερυθρίνης. Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθορίζει τη δική του συχνότητα προσδιορισμού με μάρτυρες. Πρέπει να καθιερωθούν απαιτήσεις ποιοτικού ελέγχου σε συμμόρφωση με τους τοπικούς, κρατικούς, ή/και ομοσπονδιακούς κανονισμούς ή τις απαιτήσεις πιστοποίησης.

Υπολογισμοί (Παράδειγμα)

Abs. = Απορρόφηση

Άγν. = Άγνωστο

Βαθμ. = Βαθμονομητής

$Abs. \text{ Άγν.} - \text{Απορρ. Άγν. Τυφλού} \times \text{Συγκέντρωση Βαθμ. (mg/dL)} = \text{Άμεση χολερυθρίνη (mg/dL)}$

$Abs. \text{ Βαθμ.} - \text{Απορρ. Τυφλού Βαθμ.}$

Δείγμα: Εάν Απορρ. Άγνωστο = 0,35, Απορρ. Άγνωστο Τυφλού = 0,01, Απορρ. Βαθμονομητή 0,25, Απορρ. Τυφλού Βαθμονομητή = 0,01, Συγκέντρωση Βαθμονομητή = 4,0 mg/dL

Τότε: $\frac{0,35 - 0,01}{0,25 - 0,01} \times 4 = \frac{0,34}{0,24} \times 4 = 5,7 \text{ mg/dL}$

Αναμενόμενες τιμές (άμεσες)^{7,11}

Ενήλικες και βρέφη (άνω του ενός μηνός): 0 – 0,5 mg/dL

Συνιστάται αυστηρά κάθε εργαστήριο να καθορίζει το δικό του εύρος φυσιολογικών τιμών.

Περιορισμοί

- Τα δείγματα με τιμές πάνω από 10 mg/dL πρέπει να αραιώνονται με ισοτονικό φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:1, να υποβάλλονται σε εκ νέου δοκιμασία προσδιορισμού και το τελικό αποτέλεσμα να πολλαπλασιάζεται επί δύο.
- Η αιμοσφαιρίνη ορού σε επίπεδα έως και 100 mg/dL και τα τριγλυκερίδια σε επίπεδα έως και 500 mg/dL δεν προκαλούν παρεμβολές στα αποτελέσματα.

Επίδοση

- Γραμμικότητα: 10,0 mg/dL
- Όριο ανίχνευσης (Ευσαιθησία): 0,1 mg/dL
- Σύγκριση: Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε μεταξύ των αναλυτών της σειράς Yumizen 200 και παρόμοιου αναλυτή με τη χρήση αυτής της μεθόδου, προέκυψε συντελεστής συσχέτισης 0,999 με εξίσωση παλινδρόμησης $y=0,985x - 0,12$.

- Πιστότητα: Οι μελέτες ακριβείας εκτελέστηκαν με τη χρήση αναλυτή της σειράς Yumizen 200 βάσει μιας τροποποίησης των κατευθυντηρίων οδηγιών που περιέχονται στο έγγραφο EP5-T2 της NCCLS.¹⁰

| Εντός της ημέρας | | | Ημερησίως | | |
|------------------|------|-------|-----------|------|-------|
| Μέση τιμή | S.D. | C.V.% | Μέση τιμή | S.D. | C.V.% |
| 0,48 | 0,05 | 10,1 | 0,39 | 0,05 | 12,8 |
| 1,92 | 0,09 | 4,5 | 1,91 | 0,11 | 5,8 |

Βιβλιογραφία

- Ehrlich, P., Charite Ann. 8:140(1883).
- Malloy, H.T., Evelyn, K.A., J. Biol. Chem. 119:481 (1937).
- Jendrassik, L., Grof, P., Biochem. Zeitschr. 297:81 (1938).
- Wahlefeld AW, et al. Scand J Clin Lab Invest. 29 Supplement 126(1972).
- Michaelsson, M. Scand. J. Clin. Lab. Invest (Suppl. 49) 13:1 (1961)
- Martinek, R.G., Clin. Chem. Acta 13:161 (1966).
- Tietz, N.W. Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, P. 1028 (1976).
- NCCLS document, "National Evaluation Protocols for Interference Testing", Evaluation Protocol Number 7, Vol. 4, No. 8, (June 1984).
- Young, D.S., Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests, Washington DC, AACC Press, (1997)
- NCCLS document, "Evaluations of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992)
- Gambino, S.R., et al, Bilirubin Assay (Revised), Commission on Continuing Education, Am. Soc. of Clin. Path., Chicago, (1968).

Υπόμνημα συμβόλων

Χρήση έως (EEEE-MM-HH)

LOT Παρτίδα και κωδικός παρτίδας

REF Αριθμός καταλόγου

Κατασκευαστής

IVD *In vitro* διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν

Όρια θερμοκρασίας

Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης

Rx Only: Χρήση μόνο με ιατρική συνταγή

Σήμανση CE Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα

REF 12-HB936-156 Παρασκευάζεται από HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188 **IVD**

Παρασκευάζεται από την HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand 5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρώπη:
Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Brussels, ΒΕΛΓΙΟ
Τηλ.: (32)2.732.59.54 Φαξ: (32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net

Αντιδραστήρια πιστοποιημένα ως προς την απόδοση

Τα αντιδραστήρια της Pointe είναι πιστοποιημένα για παρασκευή σύμφωνα με καθορισμένες παραμέτρους. Οποιοδήποτε προϊόν αντιδραστηρίου της Pointe δεν πληροί τις προδιαγραφές έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης του θα αποκαθίσταται αμέσως χωρίς χρέωση.