

Προβλεπόμενη χρήση

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

Ιστορικό μεθόδου

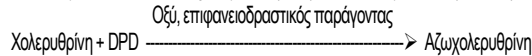
Από την εισαγωγή της μεθόδου diazo για τον προσδιορισμό της χοληρυθρίνης από τον Ehrlich το 1883¹, έχουν προστεθεί αρκετές τροποποιήσεις για την ενίσχυση της αντίδρασης. Στη μέθοδο Malloy και Evelyn² εφαρμόζεται μεθανόλη για την κατάλυση της αντίδρασης αζωσύνθεσης της έμμεσης χοληρυθρίνης, καθώς και για τη διατήρηση της αζωχοληρυθρίνης 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 εμπεριέχει πολλά βήματα αναρρόφησης με πιπέτα.

Η μέθοδος που παρουσιάζεται στο παρόν αναπτύχθηκε από τους Wahlefeld κ.α.⁴ Χρησιμοποιείται ένα απορρυπαντικό για την επιτάχυνση της αντίδρασης και την αποφυγή του σχηματισμού ιζήματος πρωτεΐνης. Το αντιδραστήριο diazo είναι 2,5-διχλωροφαινολοδιαζόνιο τετραφθοροβωρικό (DPD) το οποίο αντιδρά εξαιρετικά ταχέως στη σύζευξη με χοληρυθρίνη υπό όξινες συνθήκες. Η προκύπτουσα διαδικασία είναι απλή, ενώ παρουσιάζει καλή συσχέτιση όταν συγκρίνεται με τη μέθοδο των Jendrassik και Grof.

Αρχή

Η ολική χοληρυθρίνη συζεύγνυται με ένα άλας διαζωνίου (DPD) σε έντονα όξινο μέσο (pH 1 – 2).



Η ένταση του χρώματος της αζωχοληρυθρίνης που παράγεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ολικής χοληρυθρίνης και μπορεί να μετρηθεί φωτομετρικά.

Αντιδραστήρια

1. Αντιδραστήριο ολικής χοληρυθρίνης R1: όξινο ρυθμιστικό διάλυμα 50 mmol/L, επιφανειοδραστικός παράγοντας.
2. Αντιδραστήριο ολικής χοληρυθρίνης R2: όξινο ρυθμιστικό διάλυμα >30 mmol/L, >2,0 mmol/L DPD και σταθεροποιητές.

Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Τα αντιδραστήρια παρέχονται ως έτοιμα προς χρήση υγρά.

Αποθήκευση αντιδραστηρίων

1. Τα συσκευασμένα αντιδραστήρια μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία 2-8°C. Τα αντιδραστήρια παραμένουν σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον φυλάσσονται σύμφωνα με τις οδηγίες.
2. Μην καταψύχετε τα αντιδραστήρια.
3. Αποφύγετε την έκθεση σε άμεσο ηλιακό φως.

Αλλοίωση αντιδραστηρίου

1. Μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν υπάρχουν ενδείξεις μόλυνσης (θολρότητα)
2. Το αντιδραστήριο R2 μπορεί να σχηματίσει πολύ μικρό ίζημα που δεν επηρεάζει την απόδοση και μπορεί να επαναδιαλυθεί εάν το αντιδραστήριο R2 θερμανθεί ελαφρώς.
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.

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.

Συλλογή και αποθήκευση δειγμάτων

1. Συνιστάται η χρήση φρέσκου, μη αιμοκλιμένου ορού.
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.⁵
3. Η χοληρυθρίνη σε ορό παραμένει σταθερή για τρεις μήνες, εφόσον φυλάσσεται σε συνθήκες κατάψυξης (-20°C) και προστατεύεται από το φως.⁵

4. Το άμεσο ηλιακό φως μπορεί να προκαλέσει έως και 50% μείωση στη χοληρυθρίνη εντός μίας ώρας.⁶
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.⁷
2. Η αιμοσφαιρίνη ορού σε επίπεδα έως και 500 mg/dL δεν προκαλεί παρεμβολές στα αποτελέσματα.
3. Τα τριγλυκερίδια ορού σε επίπεδα έως και 1000 mg/dL δεν προκαλούν παρεμβολές στα αποτελέσματα.
4. Ορισμένα φάρμακα και ουσίες επηρεάζουν τα αποτελέσματα χοληρυθρίνης. Βλ. Young, et al.⁸

Παρεχόμενα υλικά

1. Αντιδραστήριο Total Bilirubin R1
2. Αντιδραστήριο Total Bilirubin 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:	TBIL	Χημικό στοιχείο:	Ολική χοληρυθρίνη
Χημικός αρ.:	207	Πλήρης ονομασία:	Ολική χοληρυθρίνη
Τύπος αντίδρασης:	Τελικό σημείο	Κατεύθυνση αντίδρασης:	Θετική
Πρωτ. κύμα:	546 nm	Δευτ. κύμα:	630 nm
Δεκαδικό:	0,1	Τύπος δείγματος:	Ορός
Χρόνος τυφλού:	-2 -1	Χρόνος αντίδρασης:	18 19
Μονάδα:	mg/dL	Χρόνος επώασης:	3

	Όγκος δείγματος	Αναρροφήθηκε	Αραιωτικό	Όγκος αντιδραστηρίου	Αραιωτικό
Πρότυπο,	3	uL	uL	180	uL
Μειωμένο,		uL	uL	47	uL
Αυξημένο,		uL	uL	uL	

Εύρος γραμμικότητας (Πρότυπο),	0,1-30	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 προζύμης:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Χρήση ποσοτικού αποτελέσματος:	
Εύρος:	Επισήμανση:

Σετ αντιδραστηρίων Pointe Total Bilirubin

Μεταπόση κλίσης:	Κλίση 1	Μεταπόση 0	Μονάδα mg/dL
------------------	------------	---------------	-----------------

Προεργασία:	Προεργασία όγκου δείγματος: uL	Προεργασία όγκου αντιδραστήριου: uL
-------------	--------------------------------	-------------------------------------

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

Παράμετροι ρύθμισης βαθμονόμησης

Χημ.: Ολ. Χολ.	Ρύθμιση βαθμονόμησης	Μαθηματικό μοντέλο: Γραμμικό δύο σημείων	Συντελεστής: Επαναλήψεις: 2
Αποδεκτά όρια	Χρόνος βαθμ.: 168 ώρες	Διαφ. κλίσης: SD:	Ευαισθησία: Επαναληψιμότητα: * Ορίζεται από τον χρήστη
Αυτόματη βαθμ.	<input type="checkbox"/> Χρόνος βαθμ.		

Βαθμονόμηση

Χρησιμοποιήστε βαθμονομητή ορού ιχθυόσιμο 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.

Υπολογισμοί (Παράδειγμα)

Abs. = Απορρόφηση
Αγν. = Άγνωστο
Βαθμ. = Βαθμονομητής

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

Δείγμα: Εάν Απορρ. Αγνώστου = 0,35, Απορρ. Αγνώστου Τυφλού = 0,01, Απορρ. Βαθμονομητή = 0,25, Απορρ. Τυφλού Βαθμονομητή = 0,01, Συγκέντρωση Βαθμονομητή = 5,0 mg/dL

$$\text{Τότε: } \frac{0,35 - 0,01}{0,25 - 0,01} \times 5 = \frac{0,34}{0,24} \times 5 = 7,1 \text{ mg/dL}$$

Ποιοτικός έλεγχος

Η εγκυρότητα της αντίδρασης πρέπει να παρακολουθείται μέσω της χρήσης ορών μάρτυρα με γνωστές φυσιολογικές και μη φυσιολογικές τιμές ολικής χολερυθρίνης. Αυτοί οι μάρτυρες πρέπει να υποβάλλονται σε ανάλυση τουλάχιστον σε κάθε βάρδια στην οποία διενεργούνται δοκιμασίες προσδιορισμού ολικής 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.

Περιορισμοί

- Τα δείγματα με τιμές πάνω από 30 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 500 mg/dL και τα τριγλυκερίδια σε επίπεδα έως και 1000 mg/dL δεν προκαλούν παρεμβολές στα αποτελέσματα.

Επίδοση

- Γραμμικότητα: 30,0 mg/dL
- Όριο ανίχνευσης (Ευαισθησία): 0,15 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 $y=0,902x + 0,02$.
- Πιστότητα: Οι μελέτες ακριβείας εκτελέστηκαν με τη χρήση αναλυτών της σειράς Yumizen 200 βάσει μιας τροποποίησης των κατευθυντηρίων οδηγιών που περιέχονται στο έγγραφο EP5-T2 της NCCLS.⁹

Εντός της ημέρας			Ημερησίως		
Μέση τιμή	S.D.	C.V.%	Μέση τιμή	S.D.	C.V.%
0,84	0,08	10,1	0,67	0,04	6,0
5,99	0,14	2,4	5,98	0,25	4,2

Αναμενόμενες τιμές¹⁰

Σύνολο: Ενήλικες και βρέφη ηλικίας άνω του 1 μηνός: 0,2–1,0 mg/dL

Βρέφη: Τελειόμηνο νεογνό
Έως και 24 ώρες: 2,0–6,0 mg/dL
Έως και 48 ώρες: 6,0–10,0 mg/dL
Ημέρες 3–5: 4,0–8,0 mg/dL

Βιβλιογραφία

- Ehrlich, P., *Chante 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).
- Marinek, R.G., *Clin. Chim. 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)
- Έγγραφο NCCLS "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).
- Tietz, *Textbook of Clinical Chemistry*, Philadelphia, W.B. Saunders, 3rd Ed., p. 1170 (1999)

Υπόμνημα συμβόλων

Χρήση έως (EEEE-MM-HH)	Παρτίδα και κωδικός παρτίδας
Αριθμός καταλόγου	Κατασκευαστής
<i>In vitro</i> διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν	Όρια θερμοκρασίας
Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης	Rx Only: Χρήση μόνο με ιατρική συνταγή
Σήμανση CE	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα

12-HB979-192

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



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, BE/ΓΙΟ
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 αντιδραστήριου της Pointe δεν πληροί τις προδιαγραφές έως την αναγραφόμενη ημερομηνία λήξης του θα αποκαθίσταται αμέσως χωρίς χρέωση.