

Uso previsto

Determinazione quantitativa della bilirubina totale nel siero umano utilizzando gli analizzatori Yumizen C230 e Yumizen C240. Esclusivamente per fini diagnostici *in vitro*. **Solo su prescrizione.**

Storia del metodo diagnostico

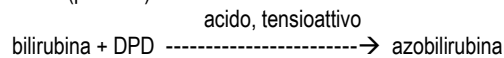
Nel 1883¹, Ehrlich presentò il metodo diazoico per la misurazione della bilirubina. Da allora sono state proposte numerose modifiche per migliorare la reazione. Il metodo di Malloy e Evelyn² utilizza il metanolo per catalizzare la reazione di accoppiamento azoico della bilirubina indiretta e per mantenere in soluzione l'azobilirubina. Questo metodo presenta un grave svantaggio: le proteine possono essere fatte precipitare dalla soluzione di metanolo, producendo risultati falsamente bassi.

Nel 1938, Jendrassik e Grof³ presentarono un test che dava risultati affidabili. Si trattava, però, di un metodo macchinoso, che comporta diverse fasi di pipettaggio.

Il metodo presentato in questa sede è stato sviluppato da Wahlefeld et al.⁴ Per accelerare la reazione ed evitare la precipitazione delle proteine si utilizza un reagente. Il reagente diazoico è il 2,5-diclorofenildiazonio tetrafluoroborato (DPD) che in condizioni acide reagisce molto rapidamente accoppiandosi con la bilirubina. La procedura che ne risulta è semplice, ma presenta una buona correlazione se confrontata con il metodo di Jendrassik e Grof.

Principio

La bilirubina totale si accoppia con un sale di diazonio (DPD) in un mezzo fortemente acido (pH 1 - 2).



L'intensità del colore dell'azobilirubina prodotta è proporzionale alla concentrazione di bilirubina totale e può essere misurata fotometricamente.

Reagenti

1. Reagente R1 per bilirubina totale: tampone acido 50 mmol/L, tensioattivo.
2. Reagente R2 per bilirubina totale: tampone acido >30 mmol/L, >2,0 mmol/L DPD e stabilizzatori.

Preparazione dei reagenti

I reagenti vengono forniti sotto forma di liquido pronto all'uso.

Conservazione dei reagenti

1. Conservare i reagenti ancora confezionati a 2-8°C. Se conservati seguendo le raccomandazioni, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.
2. Non congelare i reagenti.
3. Evitare di esporli alla luce diretta.

Deterioramento dei reagenti

1. Non utilizzare i reagenti se presentano tracce di contaminazione (torbidità)
2. Il reagente R2 può sviluppare una leggerissima precipitazione che non inficia i risultati e si dissolve se R2 viene leggermente riscaldato.
3. Se il reagente R2 contiene un precipitato che non si dissolve e provoca una decolorazione del prodotto, non va utilizzato.
4. Non utilizzare il reagente se non raggiunge i valori assegnati ai controlli di siero fresco.

Precauzioni

1. I reagenti sono tossici e corrosivi. Non pipettare per bocca. Evitare il contatto con la pelle e gli indumenti.
2. Il reagente è destinato esclusivamente a fini diagnostici *in vitro*.

Raccolta e conservazione dei campioni

1. Si raccomanda di prelevare siero fresco, non emolizzato.
2. I campioni devono essere analizzati entro due ore dal prelievo se conservati a temperatura ambiente e al buio, oppure entro dodici ore se conservati in frigorifero (2-8°C) e al riparo dalla luce.⁵
3. La bilirubina nel siero resta stabile per tre mesi se conservata in congelatore (-20°C) e al riparo dalla luce.⁵
4. La luce diretta del sole può far diminuire la bilirubina fino al 50% nell'arco di un'ora.⁶
5. Il prelievo dei campioni va eseguito in conformità con le linee guida indicate nel documento NCCLS M29-T2. Nessun metodo può offrire la totale certezza che i

campioni di sangue umano non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i campioni di sangue devono essere considerati potenzialmente infettivi.

Interferenze

1. Tutti gli studi sulle interferenze sono stati eseguiti applicando le procedure raccomandate dalle linee guida NCCLS n. EP7-P per i test di interferenza in chimica clinica.⁷
2. Livelli di emoglobina nel siero fino a 500 mg/dl non interferiscono con i risultati.
3. Livelli di trigliceridi nel siero fino a 1000 mg/dl non interferiscono con i risultati.
4. Numerosi farmaci e sostanze alterano l'attività risultati. Si veda Young, et al.⁸

Materiali in dotazione

1. Reagente R1 per bilirubina totale
2. Reagente R2 per bilirubina totale

Materiali necessari non in dotazione

1. Analizzatori Yumizen C230 / Yumizen C240
2. Manuale utente per gli analizzatori Yumizen C230 / Yumizen C240
3. Calibratore chimico Pointe, numero di catalogo C7506-50
4. Controllo chimico Pointe, numero di catalogo C7592-100

Parametri di analisi

Analisi:	TBIL	Sostanza chim.:	Bilirubina totale
N. chim:	207	Nome etichetta:	Bilirubina totale
Tipo reazione:	Endpoint	Direzione reazione:	positiva
Lungh. d'onda prim.:	546 nm	Lungh. d'onda sec.	630 nm
Decimale:	0,1	Tipo campione:	siero
T. bianco:	-2 -1	T. reazione:	18 19
Unità:	mg/dl	T. incubazione:	3

Vol. campione	Aspirato	Diluente	Vol. reagente	Diluente
Standard; 3	ul	ul	180	ul
Decremento:	ul	ul	47	ul
Incremento:	ul	ul		

Intervallo linearità (standard); 0.1-30	Limite linearità:
Intervallo linearità (decremento):	Esaurim. substrato:
Intervallo linearità (incremento):	Assorb. bianco mix: -40000 40000
Assorb. bianco R1: -40000 40000	Stabilità in macchina: 30
Risposta bianco -40000 40000	Limite allarme reagente: 5
Doppia chim.:	

Controllo eff. prozona:		
Q1:	Q2:	Q3:
Q4:	PC:	ABS:

Risultato qualitativo:	
Intervallo:	Val. fuori norma:

Pendenza Offset:			
Pendenza	Offset	Unità	
1	0	mg/dL	

Tratt. preliminare:	
Vol. campione pretratt.: ul	Vol. reagente pretratt.: ul

Kit reagenti Bilirubina totale Pointe

Intervallo rif.:					
Tipo campione:	Sesso:	Intervallo età:	Intervallo rif.:	Intervallo	critico
Unità:					

Parametri di configurazione della calibrazione

Analisi chim.	T.	Bili	Calibratore	Conc.	Pos.	N. lotto:
Impostazioni calibr.			acqua	0,0	W	
Modello mat.:	Lineare a 2		Cal. chim.	*	*	
punti						
Fattore:	Repliche: 2					
Limiti accettabilità						
T. calibr.:	168 h					
Diff. pendenza:		DS:				
Sensibilità:		Ripetibilità:				*Def. utente
Coeff. deter.:						
Calibr. autom.						
	T. calibr.					

Calibrazione

Utilizzare un calibratore per siero con tracciabilità NIST. Per la calibrazione, consultare il manuale di istruzioni dello strumento. Per le procedure e la frequenza di calibrazione, consultare il manuale di istruzioni dello strumento. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca la frequenza interna di calibrazione.

Calcolo (esempio)

abs. = assorbanza
camp. = campione paziente
cal. = calibratore

$\text{abs. camp.} - \text{abs. camp. bianco} \times \text{conc. cal. (mg/dl)} = \text{bilirubina totale (mg/dl)}$
abs. cal. – abs. cal. bianco

Campione: Se: abs. camp. = 0,35; abs. bianco non noto = 0,01; abs. calibratore = 0,25; abs. cal bianco = 0,01; concentrazione calibratore = 5,0 mg/dl

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

Controllo qualità

La bontà della reazione va monitorata utilizzando sieri di controllo con valori normali e patologici noti di bilirubina totale. I controlli vanno eseguiti in ogni turno in cui si effettuano dosaggi della bilirubina totale. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca la frequenza interna dei controlli. Il controllo qualità richiesto va eseguito in conformità con le normative locali, statali e/o federali o ai requisiti di accreditamento.

Limitazioni

- I campioni con valori superiori a 30 mg/dl andrebbero diluiti 1:1 con soluzione fisiologica, nuovamente analizzati e i risultati andrebbero moltiplicati per 2.
- Livelli di emoglobina nel siero fino a 500 mg/dl e di trigliceridi fino a 1000 mg/dl non interferiscono con i risultati.

Prestazioni

- Linearità: 30,0 mg/dl
- Limite di rivelabilità (sensibilità) 0,15 mg/dl
- Comparazione: È stato condotto uno studio comparativo tra l'impiego dell'analizzatore Yumizen serie 200 e di un analizzatore simile per l'applicazione del metodo. Si è ottenuto un coefficiente di correlazione di 0,999 e l'equazione di regressione $y = 0,902x + 0,02$.

- Precisione: gli studi sulla precisione sono stati condotti seguendo una modifica delle linee guida contenute nel documento EP5-T2 dell'istituto NCCLS e utilizzando un analizzatore Yumizen serie 200.⁹

Intra-giorn.			Inter-giorn.		
Media	D.S.	C.V.%	Media	D.S.	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

Valori attesi¹⁰

Totale: Adulti o bambini con più di un mese: 0,2-1,0 mg/dl

Neonati: nati a termine
fino a 24 ore 2,0-6,0 mg/dl
fino a 48 ore 6,0-10,0 mg/dl
giorni 3-5: 4,0-8,0 mg/dl

Riferimenti bibliografici

- 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).
- Martinek, R.G., Clin. Chim. Acta 13:161 (1966).
- Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p.1028 (1976).
- Documento NCCLS, "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, AACCC Press, (1997)
- Documento 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)

Legenda

Utilizzare entro (aaaa-mm-gg)	LOT Codice lotto e gruppo
REF N. catalogo	F Fabbricante
IVD Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	T Limiti di temperatura
Consultare il manuale utente	Rx Only: utilizzare solo su prescrizione
CE Marchio CE	EC REP Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea

REF 12-HB979-192 Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated - Pointe Brand 5449 Research Drive Canton, MI 48188 **IVD**

Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated – Pointe Brand
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Rappresentante autorizzato per l'Europa:

Obelis s.a.
Boulevard Général Wahis 53
1030 Bruxelles, BELGIO
tel: (32)2.732.59.54 fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



Reagenti certificati

I reagenti Pointe sono certificati per essere stati prodotti conformemente ai parametri specificati. Se entro la data di scadenza un reagente Pointe dovesse risultare non conforme alle specifiche, sarà prontamente sostituito senza alcun addebito.