

Usso previsto

Determinazione quantitativa della bilirubina diretta nel siero utilizzando l'analizzatore Yumizen C560. **Solo su prescrizione.**

Storia del metodo diagnostico

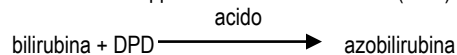
Nel 1883,¹ Ehrlich presentò il metodo diazoico per la misurazione della bilirubina. Da allora sono state proposte numerose modifiche per migliorare la reazione. Il metodo di Malloy e Evelyn² utilizza il metanolo per catalizzare la reazione di accoppiamento azoico della bilirubina indiretta e per mantenere 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 Grof.³ presentarono un test che dava risultati affidabili. Si tratta, però, di un metodo macchinoso, che comporta diverse fasi di pipettaggio.

Il metodo presentato in questa sede è stato elaborato da Wahlefeld et al.⁴ 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 diretta 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 diretta e può essere misurata fotometricamente.

Reagenti

Reagente R1 per bilirubina diretta: tampone acido 50 mmol/L, reagente R2 per bilirubina diretta: tampone acido >30 mmol/L, >2,0 mmol/L DPD e stabilizzatori

Precauzioni e pericoli

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*.

Pericoli:

R1 e R2: Classificazione dei pericoli: Corrosione/irritazione cutanea (categoria 1), Gravi lesioni/irritazioni oculari (categoria 1)

Indicazioni di pericolo: H314: Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari, H318: Provoca grave irritazione oculare

Consigli di prudenza: **Prevenzione:** P260: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. P264: Lavare accuratamente la pelle dopo l'uso. P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso. **Reazione:** P310: Contattare immediatamente un CENTRO

ANTIVELENI o un medico. P363: Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente. P301 + P330 + P331: IN CASO DI INGESTIONE:

Sciacquare la bocca. NON provocare il vomito. P303 + P361 + P353: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): Togliere immediatamente

tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la PELLE/ fare una doccia. P304+P340: IN CASO DI INALAZIONE: Trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. P305 + P351 + P338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. **Conservazione:** P404: Conservare in un recipiente chiuso. **Smaltimento:** P501: Smaltire il prodotto nella rete fognaria dopo averlo diluito con abbondante acqua, se in conformità con le normative locali. **Consultare la Scheda di sicurezza del prodotto (SDS-HB936) disponibile chiamando il numero: 1-734-487-8300.**



Parola segnaletica:
Pericolo

Preparazione dei reagenti

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

Conservazione e stabilità 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. Studi condotti dal produttore hanno dimostrato che, dopo essere stati inseriti nell'apposito caricatore refrigerato (2-10°C), i reagenti restano stabili per 30 giorni; tuttavia, la stabilità dei reagenti può variare in base alle condizioni dei singoli laboratori.
3. Non congelare i reagenti.
4. Evitare di esporli alla luce diretta.

Deterioramento dei reagenti

1. Non utilizzare i reagenti se presentano tracce di contaminazione microbica (torbidità).
2. Se il reagente R2 sviluppa una leggerissima precipitazione che si dissolve quando viene leggermente riscaldato, è possibile utilizzarlo.
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.

Raccolta e conservazione dei campioni

1. Si raccomanda di raccogliere siero fresco, non emolizzato.⁵
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.⁶
3. La bilirubina nel siero resta stabile per tre mesi se conservata in congelatore (-20°C) e al riparo dalla luce.⁶
4. La luce diretta del sole può far diminuire la bilirubina fino al 50% nell'arco di un'ora.⁷
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.⁸
2. Livelli di emoglobina nel siero fino a 66 mg/dl non interferiscono con i risultati.
3. Livelli di trigliceridi nel siero fino a 500 mg/dl non interferiscono con i risultati.
4. Numerosi farmaci e sostanze alterano l'attività risultati. Si veda Young, et al.⁹

Materiali in dotazione

Reagenti R1 e R2 per bilirubina diretta

Kit reagenti Bilirubina diretta Pointe

Materiali necessari non in dotazione

1. Analizzatore Yumizen C560.
2. Manuale utente per l'analizzatore Yumizen C560.
3. Calibratore chimico, numero di catalogo C7506-50
4. Controllo chimico, numero di catalogo C7592-100

Calibrazione

Utilizzare il calibratore chimico Pointe (numero di catalogo C7506-50). 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. Se i risultati del controllo risultano fuori range, potrebbe essere necessario effettuare una ricalibrazione. Gli studi sulla stabilità della calibrazione condotti dal produttore mostrano che, in condizioni operative classiche, la curva di calibrazione resta stabile per almeno 14 giorni.

Controllo qualità

La bontà della reazione va monitorata utilizzando sieri di controllo con valori normali e patologici noti di bilirubina diretta. I controlli vanno eseguiti in ogni turno in cui si effettuano dosaggi della bilirubina diretta. 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.

Valori attesi (metodo diretto)^{7,11}

Adulti e bambini (con più di un mese): 0 – 0,5 mg/dl

Si raccomanda che ogni laboratorio definisca il proprio intervallo di normalità.

Limitazioni

1. I campioni con valori superiori a 10 mg/dl andrebbero diluiti 1:1 con soluzione fisiologica, nuovamente analizzati e i risultati andrebbero moltiplicati per 2.
2. Livelli di emoglobina nel siero fino a 66 mg/dl e di trigliceridi fino a 500 mg/dl non interferiscono con i risultati.

Prestazioni

1. Intervallo di analisi: 0,0-10,0 mg/dl
2. Comparazione: È stato condotto uno studio comparativo tra l'impiego dell'analizzatore Yumizen C560 e di un analizzatore simile per l'applicazione del metodo. I risultati sono riportati nella tabella sottostante:

Metodo	Bilirubina diretta
N	135
Bilirubina diretta media (mg/dL)	1,625
Intervallo (mg/dL)	0,00-9,20
Deviazione standard	2,472
Analisi di regressione	$y = 1,097x - 0,065$
Coefficiente di correlazione	0,9912

3. Precisione: Gli studi sulla precisione sono stati condotti seguendo una modifica delle linee guida contenute nel documento EP5-T2 dell'istituto NCCLS e utilizzando l'analizzatore Yumizen C560.¹⁰

Campione	Intra-giorn.			Totale		
	BASSA	MEDIA	ALTA	BASSA	MEDIA	ALTA
N	20	20	20	40	40	40
Media	0,74	5,08	9,80	0,77	5,08	9,79
Deviazione standard	0,05	0,04	0,00	0,04	0,18	0,26
Coefficiente di variazione (%)	6,8%	0,8%	0,0%	6,6%	4,8%	2,7%

4. Sensibilità: 2SD limite di rilevabilità (95% conf) = 0,0 mg/dL

Riferimenti bibliografici

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

PARAMETRI CHIMICI

Analisi chim.:	DBIL	N.	205	Tipo campione:	Siero
Denominazione:	Bilirubina diretta			Nome etichetta:	DBIL
Tipo reazione:	End Point			Direzione reazione:	Positiva
Lungh. d'onda prim.:	546			Lungh. d'onda sec.:	660
Unità:	mg/dL			Decimale	0.1
T. bianco:	47 49			T. reazione:	80 82
	Vol. campione	Aspirato	Diluyente	Vol. reagente	Diluyente
Standard:	2.7 ul	--- ul	--- ul	R1:	120 ul --- ul
Decremento :	--- ul	--- ul	--- ul	R2:	31 ul -- ul
Incremento:	--- ul	--- ul	--- ul	R3:	--- ul -- ul
	<input type="checkbox"/> Bianco camp.	<input checked="" type="checkbox"/> Ripetiz. automat.		R4:	--- ul --- ul
<u>Regolazione pendenza/ Offset</u>					
Pendenza: 1		Offset: 0			

Intervallo linearità (standard)	0	10	Limite linearità:
Intervallo linearità (decremento)	---	---	Esaurim. substrato:
Intervallo linearità (incremento)	---	---	Assorb bianco mix:
Assorb bianco R1:	---	---	T. apertura
Risp. bianco:	---	---	Limite allarme reag.:
Doppia chim.:			<input type="checkbox"/> Est. Lineare enzimi
<input type="checkbox"/> Controllo eff. prozona		<input type="radio"/> Controllo livello	<input type="radio"/> Aggiunta antigene
Q1:	Q2:	Q3:	Q4:
PC:	ABS:		

Kit reagenti Bilirubina diretta Pointe

PAMETRI DI CALIBRAZIONE

Definizione calibratore						
Calibratore:	*	N. lotto:			*	
Data di scadenza:	*					
Caricatore		Pos.				
Caricatore campioni 1	*					
Caricatore campioni 2						
Caricatore campioni 3						
<u>Reagente/calibrazione</u>						
<u>Calibratore</u>	<u>Pos.</u>	<u>N. lotto</u>	<u>Data scad.</u>	<u>Analisi</u>	<u>Conc.</u>	<u>Unità</u>
Acqua	W	*	*	DBIL	0	mg/dL
Cal. chim.	*	*	*	DBIL	*	mg/dL
<u>Configurazione calibrazione</u>						
Analisi chim.:	DBIL					
<u>Impostazioni calibr.</u>						
Modello mat.:	Two-Point Linear					
Fattore:	Repliche: 2					
<u>Limiti accettabilità</u>						
T. calibr.:	336	h				
Diff. pendenza:	---	DS:		---		
Sensibilità:	---	Ripetibilità:		---		
Coeff. deter.:	---					
<u>Calibr. autom.</u>						
<input type="checkbox"/> Cambio flacone	<input type="checkbox"/> Cambio lotto	<input type="checkbox"/> Ora cal.				

Si raccomanda di analizzare quotidianamente due livelli di materiale di controllo. * Indica un parametro definito dall'utente.

REF 14-HB936-200



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



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.

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



Legenda



Utilizzare entro (aaaa-mm-gg)



Codice lotto e gruppo



N. catalogo



Fabbricante



Limitazioni di temperatura



Consultare il manuale di istruzioni



Dispositivo medico-diagnostico *in vitro* **Rx Only:** utilizzare solo su prescrizione