

Uso previsto

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

Storia del metodo diagnostico

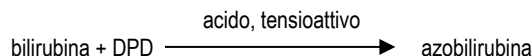
Nel 1883¹, Ehrlich presentò il metodo diazoico per la misurazione della bilirubina. Da allora sono state proposte numerose modifiche per migliorare la reazione. Il metodo di Malloy e Evelyn² utilizza il metanolo per catalizzare la reazione di accoppiamento azoico della bilirubina indiretta e per mantenere 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

Reagente R1 per bilirubina totale: tampone acido 50 mmol/L, tensioattivo. 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 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 del reagente può variare in base alle condizioni dei singoli laboratori.
3. Non congelare i reagenti.
4. Evitare di esporre i reagenti 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*.

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-HB979) disponibile chiamando il numero: 1-734-487-8300.**

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. Si è osservato che l'emoglobina presente nel siero interferisce con i risultati. Livelli di trigliceridi nel siero fino a 1000 mg/dl non interferiscono con i risultati.
3. Numerosi farmaci e sostanze alterano l'attività risultati. Si veda Young, et al.⁸



Parola segnaletica:
Pericolo

Kit reagenti Bilirubina totale Pointe

Materiali in dotazione

Reagente R1 per bilirubina totale, Reagente R2 per bilirubina totale

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 7 giorni.

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

1. 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.
2. Livelli di trigliceridi nel siero fino a 1000 mg/dl non interferiscono con i risultati.
3. Si è osservato che l'emoglobina presente nel siero interferisce con i risultati.

Prestazioni

1. Intervallo di analisi: 0,0-30,0 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 totale
N	149
Bilirubina T media (mg/dL)	4,38
Intervallo (mg/dL)	0,0-29,7
Deviazione standard	7,18
Analisi di regressione	$y = 0.988x + 0.12$
Coefficiente di correlazione	0,9940

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 C560.⁹

Campione	Intra-giorn.			Totale		
	BASSA	MEDIA	ALTA	BASSA	MEDIA	ALTA
N	20	20	20	40	40	40
Media	0,70	4,33	21,38	0,87	4,34	22,04
Deviazione standard	0,00	0,09	0,20	0,07	0,16	0,71
Coefficiente di variazione (%)	0,0%	2,1%	0,9%	8,3%	3,8%	3,2%

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

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

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. Martinek, R.G., Clin. Chim. Acta 13:161 (1966).
6. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, p.1028 (1976).
7. Documento NCCLS, "National Evaluation Protocols for Interference Testing", Evaluation Protocol Number 7, Vol. 4, No. 8, (June 1984).
8. Young, D.S., Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Tests, Washington DC, AACC Press, (1997)
9. Documento NCCLS "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices", 2nd Ed. (1992).
10. Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders, 3rd Ed., p. 1170 (1999)

PARAMETRI CHIMICI

Analisi chim.:	TBIL	N.	207	Tipo campione:	Siero
Denominazione:	Total Bilirubin			Nome etichetta:	TBIL
Tipo reazione:	End Point			Direzione reazione:	Positiva
Lungh. d'onda prim.:	546			Lungh. d'onda sec.:	605
Unità:	mg/dL			Decimale	0.1
T. bianco:	47	49		T. reazione:	80 82
	Vol. campione	Aspirato	Diluente	Vol. reagente	Diluente
Standard:	2.0 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
Regolazione pendenza/ Offset					
	Pendenza: 1	Offset: 0			

Intervallo linearità (standard)	0	30	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 totale Pointe

PARAMETRI DI CALIBRAZIONE

Definizione calibratore						
Calibratore:	*	N. lotto:			*	
Data di scadenza:	*					
Caricatore		Pos.				
Caricatore campioni 1		*				
Caricatore campioni 2						
Caricatore campioni 3						
Reagente/calibrazione						
<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	*	*	TBIL	0	mg/dL
Cal. chim	*	*	*	TBIL	*	mg/dL
Configurazione calibrazione						
Analisi chim.:	TBIL					
<u>Impostazioni calibr.</u>						
Modello mat.:	Two-Point Linear					
Fattore:	Repliche: 2					
<u>Limiti accettabilità</u>						
T. calibr.:	168	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-HB979-365



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



IVD

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)

LOT

Codice lotto e gruppo

REF N. catalogo



Fabbricante



Limitazioni di temperatura



Consultare il manuale di istruzioni

IVD

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