

Determinazione quantitativa della Bilirubina Diretta nel siero o plasma. Metodo colorimetrico, reazione di diazotizzazione (acido solfanilico e nitrito)

REF CC1032 R1:3x20 mL + R2: 1x15 mL; **CC1034** R1:3x40 mL+ R2: 1x30mL; **CC1030** R1: 3x80 mL + R2: 1x60 mL;

CC1031 R1: 3x40 mL + R2: 3x10 mL

PRINCIPIO DEL METODO

La Bilirubina Diretta reagisce immediatamente con Acido Sulfanilico e Nitrito di Sodio per formare un diazo-complesso colorato misurabile fotometricamente alla lunghezza d'onda di 546 nm. L'intensità del colore che si sviluppa è proporzionale alla concentrazione della Bilirubina Diretta presente nel campione.

SIGNIFICATO CLINICO

La Bilirubina proviene dal catabolismo della emoglobina. La frazione libera (non coniugata o Bilirubina Indiretta) è apolare ed insolubile in acqua per cui si lega all'albumina sierica per passare dalla milza al fegato dove viene coniugata con acido glucuronico che la solubilizza (coniugata o Bilirubina Diretta) e dove è escreta nei dotti biliari. Una iperbilirubinemia può essere dovuta ad incremento del catabolismo emoglobinico (ittero pre epatico), dal danno del parenchima epatico (ittero intra epatico), dalla occlusione dei dotti biliari (ittero post epatico). Una iperbilirubinemia congenitamente alta si ha nella sindrome di Gilbert oppure nell'ittero neonatale. I metodi attuali consentono il dosaggio della sola frazione diretta oppure della totale, la indiretta si calcola per differenza.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagente (R1)

Acido Sulfanilico	29 mmol/L
Acido Cloridrico	0.2 mol/L

Reagente (R2)

Nitrito di Sodio	11.6 mmol/L
------------------	-------------

PREPARAZIONE REAGENTI E STABILITA'

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti.

Per la procedura Campione Starter, preparare una Soluzione di Lavoro miscelando 4 parti di R1 ed 1 parte di R2 (per esempio 20 mL di R1 + 5 mL di R2). Stabilità: 5 gg a 2-8° C, 15 giorni a 2-8°C.

Per la Procedura Reagente Starter, i reagenti R1 ed R2 sono pronti all'uso e stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta se si evitano contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione. Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riporli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

CAMPIONI

Siero o plasma da eparina o EDTA.

Proteggere i campioni dalla luce per la nota fotosensibilità della Bilirubina.

Stabilità:

1 giorno a 15 - 25 °C

7 giorni a 2 - 8 °C

3 mesi a - 20 °C se congelati immediatamente.

Congelare una sola volta. Scartare i campioni contaminati.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda: 546 nm (530 – 580 nm)

Misura: contro bianco reagente

Procedimento come Monoreagente (Campione Starter).

Pipettare come segue:

Soluzione Lavoro	1000 µL
Campione /Calibratore	100 µL

Azzerare il fotometro con Bianco Reagente, miscelare, trasferire in lettura, attendere 5 minuti e leggere l'Assorbanza (Abs)

Procedimento come bi-reagente (Reagente Starter).

Pipettare come segue:

Reagente R1	800 µL
Campione / Calibratore	100 µL

Miscelare, incubare a 37° C, attendere 2 minuti, quindi aggiungere:

Reagente R2	200 µL
-------------	--------

Azzerare il fotometro con Bianco Reagente, miscelare, trasferire in lettura, attendere 5 minuti e leggere l'Assorbanza (Abs)

CALCOLO

$$\text{Bilirubina Diretta} = \frac{\text{Abs Campione}}{\text{Abs Calibratore}} \times \text{Concentrazione Calibratore}$$

Fattore Conversione: Bilirubina [mg/dL] x 17.1 = Bilirubina [µmol/L]

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Usare il Calibratore di **MTD Diagnostics:**

Chemistry Multicalibrator - REF CAL1010 (10 x 3 mL).

CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare il materiale di controllo di qualità di MTD Diagnostics:

Chemistry Control N - REF CNN1010 10x5 mL (Livello 1)

Chemistry Control P - REF CNP1020 10x5 mL (Livello 2)

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

<u>Età</u>	<u>Bilirubina Totale</u>	<u>Bilirubina Diretta</u>
Adulti	fino a 1 mg/dL	fino a 0.2 mg/dL
Neonati (fino a 24 h)		
Prematuri	1.0 – 6.0 mg/dL	
A Termine	2.0 – 6.0 mg/dL	
Neonati (24 – 48 h)		
Prematuri	1.0 – 7.0 mg/dL	

A Termine	2.0 – 7.0 mg/dL
Bambini (3-5 gg)	
Prematuri	10.0 – 15.0 mg/dL
A Termine	4.0 – 12.0 mg/dL

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 0,36; D.S. = 0,01; CV = 3,12%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 2,07 D.S. = 0,03; CV = 1,3%

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE): Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 0.95 x + 0.04 \quad r = 0.995$$

SENSIBILITA': 0,1 mg/dL

LINEARITA': 0,1 – 8 mg/dL

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Nessuna interferenza osservata con presenza nei campioni di Trigliceridi fino a 500 mg/dL, di Emoglobina fino a 200 mg/dL. Altre sostanze o farmaci possono interferire.

NOTE

1. Per la determinazione della Bilirubina Diretta nei neonati, pipettare 50 µL di campione o standard e seguire la procedura descritta in precedenza.
2. Questo metodo può essere utilizzato con diversi strumenti. Qualsiasi applicazione a uno strumento deve essere convalidata per dimostrare che i risultati soddisfano le caratteristiche di prestazione del metodo. Si consiglia di convalidare periodicamente lo strumento. Contattare il proprio distributore per qualsiasi domanda sul metodo di applicazione.
3. La diagnosi clinica non dovrebbe essere fatta sui risultati di un singolo risultato del test, ma dovrebbe integrare sia i dati clinici che quelli di laboratorio.

PRECAUZIONI

R1 contiene:

ACIDO SULFANILICO 11.6 mmol/L - CAS N.: 121-57-3 - Xi R36/38 (H319 – H315) – R43 (H317).

ACIDO CLORIDRICO 0.2 mol/L , pH 1.5 – CAS 7647-01-0 - T R23 (H331) C R35 (H314).

R2 CONTIENE:

NITRITO DI SODIO 11.6 mmol/L - CAS N. 7632-00-0 - O R8 () C R35 (H314).

H290: Può essere corrosivo per i metalli

H301: Tossico se ingerito

H314: Provoca gravi ustioni.

H315: Provoca irritazione cutanea

H317: Può provocare una reazione allergica cutanea

H318: Provoca gravi lesioni oculari

H331: Tossico se inalato

Il prodotto contiene sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 (CLP), pertanto, esso necessita della etichettatura speciale prevista dalla suddetta regolamentazione. Il prodotto è etichettato secondo la direttiva per la marcatura CE (98/79/CE). Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè si maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali, applicando la legislazione vigente.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA COMPLETA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.

Pearlman FC and Lee RTY. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents. ClinChem 1974; 20: 447-453.

Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1994.

Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Press, 1997.

Zoppi F, Peracino A, Fenili D, Marcovina S and Ramella C. Metodo per la determinazione della bilirubina totale e coniugata. Uso di un tensioattivo cationico come agente solubilizzante. GiornItChim Ci 1976; 1:343-359.