

Determinazione quantitativa della Bilirubina Diretta nel siero o plasma. Metodo colorimetrico, reazione di diazotizzazione (DPD)

REF **CC1035** R1:3x20 mL+ R2: 1x15 mL

CC1036 R1:3x40 mL+ R2: 1x30 mL

CC1037 R1:3x80 mL+ R2: 1x60 mL

PRINCIPIO DEL METODO

In ambiente acido, la Bilirubina Diretta reagisce con un sale di diazonio, 3,5-diclorofenildiazonio tetrafluoroborato o DPD, per formare un diazo-composto fotometricamente misurabile (reazione di diazotizzazione). L'intensità del colore sviluppato, misurata a 546 nm, è proporzionale alla concentrazione di Bilirubina diretta 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 (Bilirubina 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)

Cloruro di Sodio	0,9%
Acido Cloridrico	120 mmol/L

Reagente (R2)

Acido Cloridrico	120 mmol/L
2,4 DPD	2 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.

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.

Prima dell'uso, miscelare delicatamente il Reagente R2 evitando la formazione di schiuma.

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

Pipettare come segue:

Reagente R1	800 µL
Campione /Calibratore	100 µL

Miscelare, incubare a 37° C, attendere 120 secondi, quindi aggiungere:

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

Azzerare il fotometro con Bianco Reagente, miscelare, trasferire in lettura, attendere 5 minuti e leggere l'Assorbanza (Abs) alla lunghezza d'onda di 546 nm.

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 Multicalibratore - 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 1,0 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 = 1,02; D.S. = 0,02; CV = 1,96%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 4,83 D.S. = 0,05; CV = 1,03%

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': 0,05 mg/dL

LINEARITA': 0,05 – 8 mg/dL

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Nessuna interferenza osservata con presenza di nei campioni di trigliceridi fino a 500 mg/dL. L'Emoglobina fino a 200 mg/dL non interferisce. 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 CLORIDRICO 0.2 mol/L , pH 1.5 – CAS 7647-01-0 - T R23 (H331)
C R35 (H314).

R2 Contiene:

3,5-dichlorophenyldiazonium tetrafluoroborate (DPD) – CAS 123333-91-5 R34 (H314)

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