



IDROSSIPROLINA SUPER

DETERMINAZIONE COLORIMETRICA NELLE URINE

CODICE 409000	CONF.20 x 3 DET.
----------------------	-------------------------

PRINCIPIO

L'idrossiprolina è presente nelle urine per il 3% in forma libera e per il 97% legata ai peptidi. Essa viene liberata mediante idrolisi. Ossidata a pirrolo, forma con il reattivo di Ehrlich un composto rosso misurabile fotometricamente.

Il metodo non prevede il complicato adsorbimento su resina a scambio cationico. E' previsto l'uso di gelatina di controllo per verificare l'efficacia della idrolisi e l'uso di urina di controllo come riferimento per eventuali cromogeni urinari.

SIGNIFICATO CLINICO

L'idrossiprolina è un aminoacido particolarmente abbondante nel collagene. L'eliminazione dell'idrossiprolina urinaria costituisce un utile parametro per valutare gli stati catabolici a carico del tessuto osseo e connettivo (metastasi ossee, morbo di Paget, processi osteolitici, traumi multipli, ecc.).

REAGENTI

STABILITA': i reagenti ben chiusi sono stabili a 4°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

Composizione del kit:	
*REAGENTE 1/2	20x150 mg
Reagente 1, ossidante, (predosato) contenuto nel tappo frattura. Reagente 2, tampone pH 6,0, contenuto nel flacone	20x2.5 ml
TOSSICITA': irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. SICUREZZA: conservare il recipiente ben chiuso e lontano da fonti di calore.	
*REAGENTE 3 Cromogeno	20x200 mg
TOSSICITA': irritante per gli occhi, le vie respiratorie e la pelle. SICUREZZA: in caso di contatto con gli occhi, lavare subito con abbondante acqua e consultare un medico: Usare indumenti protettivi adatti.	
*REAGENTE 4 Sodio idrato 1 M	1x120 ml
AVVERTENZA: Tenere il flacone di Reagente 4 ben chiuso. TOSSICITA': corrosivo. Provoca gravi ustioni. SICUREZZA: in caso di contatto con gli occhi, lavare subito con abbondante acqua e consultare un medico. Usare guanti adatti e proteggersi gli occhi e il viso.	
*REAGENTE 5 Alcool isopropilico	2x70 ml
TOSSICITA': facilmente infiammabile. SICUREZZA: conservare il recipiente ben chiuso, lontano da fiamme e scintille. Non fumare.	
*REAGENTE 6 Acido perclorico	1x30 ml
TOSSICITA': provoca gravi ustioni: Pericolo di esplosione per riscaldamento. SICUREZZA: non respirare i vapori. In caso di contatto con gli occhi, lavare subito con abbondante acqua e rivolgersi al medico. Indossare indumenti protettivi adatti.	
IDROSSIPROLINA STANDARD 250 mg/L	1x10 ml

Data modifica 15 April 2005 10.04 per marchio CE



GELATINA DI CONTROLLO 0.4 g/dl	4x4.2 ml
URINA DI CONTROLLO N valori in ambito normale.	4x4.2 ml
PROVETTE DA IDROLISI in vetro pyrex	60

REAGENTE NON COMPRESO NEL KIT

Acido cloridrico concentrato p.a.

STRUMENTAZIONE NECESSARIA

Spettrofotometro o fotometro a filtri (560 nm)

Centrifuga

Bagni termostatici a 60°C, 102°C o a 121°C

PREPARAZIONE DEI REAGENTI DI LAVORO

REAGENTE A (Reagenti 1/2+5)

Il Reagente 1 è contenuto nel tappo serbatoio già posizionato sul flacone del Reagente 2. Strappare la capsula gialla. Premere completamente il pistone rosso. In tal modo la polvere contenuta nel serbatoio cade nel flacone, agitare brevemente e togliere il tappo. Pipettare nel flacone 2,5 ml di Reagente 5 e agitare fino a completa solubilizzazione della polvere.

STABILITÀ: il Reagente A deve essere utilizzato al massimo entro 15 minuti dalla preparazione.

REAGENTE B (Reagenti 3+5+6)

In un flaconcino di Reagente 3 pipettare 4 ml di Reagente 5 e 1,2 ml di Reagente 6 e agitare fino a completa solubilizzazione.

STABILITÀ: il Reagente B deve essere utilizzato al massimo entro 2 ore dalla preparazione.

PREPARAZIONE DEI CONTROLLI

GELATINA DI CONTROLLO

In un flacone di Gelatina di controllo pipettare 4,2 ml esatti di acqua distillata. Agitare delicatamente fino a completa solubilizzazione.

STABILITÀ: 10 giorni a 4°C; 1 mese a -20°C.

URINE CONTROL N

In un flacone di Urina di controllo N pipettare 4,2 ml esatti di acqua distillata. Agitare delicatamente fino a completa solubilizzazione.

STABILITÀ: 10 giorni a 4°C; 1 mese a -20°C.

CAMPIONE Urine delle 24 ore

A partire dalle 24 ore precedenti l'inizio della raccolta e per tutta la durata della raccolta il paziente deve mantenere una dieta priva o povera di collagene. Eliminare dalla dieta la carne e i suoi derivati, il pesce, i gelati, i dolci e i prodotti contenenti gelatina. Sono permessi il latte e i suoi derivati, le uova, il brodo vegetale, la frutta e la verdura. Raccogliere le urine delle 24 ore in un recipiente mantenuto ben chiuso e conservarle a 4°C. Al termine della raccolta misurare il volume delle urine delle 24 ore e annotarne il valore, mescolarle con cura e prelevarne circa 10 ml per l'analisi. La presenza di un precipitato non interferisce con il test. In caso di urine molto torbide centrifugare e utilizzare il supernatante.

Annotare l'età, il peso corporeo e l'altezza del paziente.

STABILITÀ: 24 ore a 4°C, almeno 2 giorni a -20°C

TEST DI NORDIN

Con esso si può determinare l'escrezione urinaria di idrossiprolina indipendentemente dalla dieta seguita, dal grado di funzionalità renale, dal peso e dalla superficie corporea.

L'idrossiprolinuria viene determinata sulle seconde urine del mattino a digiuno e rapportate all'escrezione di creatinina sullo stesso campione di urina.

Pagina 1 di 2



Marchio registrato della:
Pokler Italia S.r.l.
Via Carducci,3
Genova - Italy



Paramedical S.r.l.
Via Imo - Pontecagnano Faiano (SA) Italy

Urine delle 2 ore

Alle ore 23 del giorno che precede l'esame, il paziente deve iniziare il digiuno (niente cibo e niente bevande neppure acqua) e deve smettere di fumare fino alle ore 9 del giorno successivo.

Alle ore 7 del giorno dell'esame, il paziente deve urinare svuotando completamente la vescica. Scartare l'urina. Far bere al paziente 250 ml di acqua distillata. Alle ore 9 raccogliere l'urina delle due ore e conservare un campione di essa.

CALCOLO E VALORI DI RIFERIMENTO PER IL TEST DI NORDIN

Determinare la concentrazione di idrossiprolina e rapportarla alla concentrazione di creatinina dello campione:

$$\text{Idrossipr. (mg/dl)/Creat. (mg/dl)} \times 1000 = \text{mg idrossipr./g creat.}$$

Valori di riferimento:

8-20 mg idrossiprolina/g creatinina
(5-17 mmol idrossiprolina/mol creatinina)

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda: 560 nm
Cammino ottico: 1 cm
Lettura: contro bianco
Temperatura: 102°C (121°C) e 60°C
Metodo: colorimetrico

NOTA: seguire il procedimento successivamente descritto con l'uso della gelatina di controllo solamente per il tempo sufficiente a standardizzare la procedura di idrolisi e ad impadronirsi della metodica.

Pipettare in 3 provette da idrolisi contrassegnate: C: Campione, U/C: Urina di controllo, G/C: Gelatina di controllo:

	C	U/C	G/C
Campione	2 ml	---	---
Urina di controllo	---	2 ml	---
Gelatina di controllo	---	---	2 ml
HCl concentrato	2 ml	2 ml	2 ml

ATTENZIONE: serrare con forza il tappo a vite delle provette, per assicurare una perfetta tenuta indispensabile per evitare la fuoriuscita di vapori durante l'idrolisi. Ciò comporterebbe la concentrazione del campione e probabili falsi positivi.

Incubare le provette per circa 16 ore (over night) a 102°C o per 5 ore a 121 °C. Raffreddare le provette con acqua corrente, centrifugare e pipettare in provette di plastica da 10 ml contrassegnandole: C: Campione; B: Bianco; S/I: Standard di idrossiprolina; U/C: Urina di controllo; G/C: Gelatina di controllo.

	C	B	S/I	U/C	G/C
Sovranatante	0.2 ml	---	---	0.2 ml	0.2 ml
Reagente 4	1.0 ml	---	---	1.0 ml	1.0 ml
Acqua distillata	---	1.2 ml	1.2 ml	---	---
St. di idrossiprol.	---	---	20 µl	---	---
Reagente A	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Mescolare con cura, attendere almeno 4 minuti e aggiungere					
Reagente B	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml

Chiudere le provette e agitare bene. Incubare per 20 minuti a 60°C, raffreddarle e leggere l'assorbanza del campione (Ac), dell'urina di controllo (Auc), dello standard di idrossiprolina (Asi) e della gelatina di controllo (Agc) a 560 nm contro il bianco.

CALCOLO

$$\text{Idrossiprolina (mg/l)} = (\text{Ac/Asi}) \times 50$$

Per calcolare l'escrezione nelle 24 ore moltiplicare il valore

ottenuto per il volume delle urine espresso in litri.

VALORI DI RIFERIMENTO

Adulti 10 - 40 mg di idrossiprolina / litri urina 24 ore

Giovani e anziani:

Valori in mg di idross./ litri urina 24 ore / mq di superf corp.

ETA'	MEDIA	INTERVALLO
fino a 1 anno	100	(55 - 220)
1 - 13 anni	50	(25 - 80)
oltre 65 anni	12	(5 - 17)

La superficie corporea viene calcolata per mezzo di apposite tabelle o normogrammi impiegati per la valutazione del metabolismo basale.

Oppure si può applicare la formula di Du Bois e Du Bois: superficie corporea in mq = $H^{0.725} \times W^{0.425} \times 71,84 \times 10^{-4}$ dove: H = altezza in cm e W = peso corporeo in kg.

CONTROLLI

CONTROLLO DELLA CORRETTA IDROLISI

I controlli dell'idrolisi che si possono eseguire sono, a scelta del laboratorista:

Agc / Asi = $1 \pm 10\%$

Auc / Asi = $1 \pm 10\%$

CONTROLLO DELLA PRESENZA INTERFERENTI

Auc con procedimento normale = Auc con estrazione con butanolo

NOTE

1) La sensibilità del test è tarata per poter dosare correttamente l'intervallo di concentrazione normalmente riscontrato. Per concentrazioni notevolmente superiori diluire il campione e tenere conto della diluizione nel calcolo.

2) Le urine di controllo servono a verificare l'avvenuta idrolisi dell'urina e la corretta estrazione con butanolo degli interferenti presenti nei campioni.

3) Se il colore che si sviluppa nella reazione risulta giallastro anzichè rosa ciclamino, le cause sono o idrolisi insufficiente o reagente B scaduto.

4) In casi di sospetta interferenza (presenza di cromogeni abnormi che possono portare a valori più elevati di assorbanza e quindi a una sopravvalutazione del contenuto di idrossiprolina) si può seguire il procedimento fino all'aggiunta del Reagente 4. Aggiungere al campione 4 ml di butanolo, agitare su vortex, separare le fasi centrifugando, aspirare e scartare la fase butanolica. Aggiungere il Reagente A e dopo 4 minuti aggiungere altri 4 ml di butanolo, agitare su vortex, centrifugare, eliminare la fase acquosa sottostante procedere nel modo descritto nel procedimento. Al termine il colore risulterà più vivo.

5) I volumi di reazione possono essere variati rispettando le proporzioni.

BIBLIOGRAFIA

D.J.Prockop et K.I. Kivirikko, Arch. Intern. Med. (1967), 1243.

J.C. Birkenhager, Folia Med. Neerl. 13 (1970), 79.

J. Turek et B.C. Goverde, Organorama, Anno 9, N.4, 1972.

Edizione mag 2003 MS Rev

(*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose