

Determinazione quantitativa delle Proteine Totali nelle urine o nel liquor (CSF). Metodo colorimetrico al Rosso di Pirogallolo. End Point.

REF **CC1290** R1: 4x60 mL + R2:1x3 mL (Standard)

PRINCIPIO DEL METODO

Le proteine, in soluzione acida ed in presenza di molibdato, si legano al Rosso di Pirogallolo formando un complesso colorato la cui intensità di colore, misurata fotometricamente a 600 nm, è direttamente proporzionale alla concentrazione proteica presente nel campione in esame.

SIGNIFICATO CLINICO

Normalmente le proteine presenti nel sangue (globuline, albumine, ecc.), a causa delle loro dimensioni, non riescono a oltrepassare il filtro renale, ma in varie condizioni patologiche che coinvolgono il rene, questi non è più in grado di trattenerle, consentendone la perdita nelle urine. Una normale escrezione urinaria di proteine è inferiore a 150 mg al giorno. Escrezione urinaria di proteine superiore a 150 mg al giorno viene definita proteinuria. Una proteinuria che persiste oltre una singola misurazione non deve essere ignorata e deve essere valutata dal medico. Qualche volta i pazienti hanno evidenti sintomi come: edema (gonfiore delle gambe o del corpo), sangue nelle urine (ematuria) o pus (piuria), ma in molti casi i pazienti con proteinuria non hanno sintomi.

La presenza di proteine nelle urine può associarsi a diverse altre condizioni e patologie, tra cui:

Glomerulonefrite acuta, Glomerulonefrite focale, Amiloidosi, Nefropatie IgA dipendenti, Malattie cardiache (pericardite, insufficienza cardiaca), Mieloma multiplo, Leucemia, Malaria, Anemia falciforme, Artrite reumatoide, Sarcoidosi, Lupus eritematoso sistemico, Avvelenamento da metalli pesanti, Glomerulonefriti a proliferazione mesangiale, Infezione renale, Tumore alla vescica, Farmaci potenzialmente tossici per i reni, Sindrome di Goodpasture, Rene policistico, Infezione delle vie urinarie.

Oltre a queste circostanze patologiche, sensibili rialzi delle concentrazioni proteiche urinarie possono associarsi anche a condizioni abbastanza fisiologiche (si parla in questo caso di proteinuria transitoria). L'esposizione al freddo o al calore intenso, la febbre, gli stress emozionali severi e l'esercizio fisico strenuo (sia sportivo che lavorativo), possono infatti elevare significativamente la quantità di proteine riscontrata nel campione urinario. Anche la gravidanza può associarsi ad una lieve proteinuria, anche se concentrazioni proteiche significative dovrebbero far sospettare un'infezione urinaria in corso o lo sviluppo di pre-eclampsia.

La proteinuria ortostatica è una patologia relativamente comune nei bambini e nei giovani adulti, che si associa a perdite significative di proteine nell'urina durante la posizione eretta (ortostatica). Presumibilmente, tale condizione è legata all'aumento della pressione sui glomeruli renali, cosa che forza anche il passaggio delle proteine tra le maglie di questi filtri. Nella posizione sdraiata (clinostatica), la pressione diminuisce e la perdita di proteine si riduce; i medici considerano questo disturbo di origine benigna, dato che nella grande maggioranza dei casi regredisce spontaneamente con la crescita. La proteinuria ortostatica viene diagnosticata attraverso una raccolta delle urine divisa in 2 campioni: uno ottenuto in posizione eretta e uno ottenuto di notte, dopo che il giovane paziente ha riposato per alcune ore ed ha vuotato la vescica prima di caricarsi.

Concentrazioni elevate nel liquor (CSF) possono essere causate da infezioni e pressioni intra craniche. In questo caso sono necessari ed urgenti altri esami di laboratorio

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagent (R1)

Tampone Succinato pH 2.5	60 mmol/L
Rosso di Pirogallolo	0,06 mmol/L
Molibdato di Sodio	0,04 mmol/L
Detergenti	< 2 %

Reagent (R2)

Standard (Proteine)	Valore riportato in etichetta
---------------------	-------------------------------

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. Conservare il Reagente R1 a 15 ° - 25 ° C, il Reagente R2 (Standard) a 2° - 8° C

Scartare il reagente se vi sono segni di deterioramento (presenza di particelle e torbidità o mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati o Bianco Reagente >0.200 a 600 nm ed in cuvetta da 1 cm).

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

Urine 24 ore – Liquor (CSF – Liquido Cefalo Rachidiano)

Raccogliere le urine senza aggiungere alcun additivo.

Stabilità nelle urine: 1 giorno a 20-25° C ; 2 giorni a 2-8° C.

Stabilità nel liquor: 1 giorno a 20-25° C; 6 giorni a 2-8° C; 1 anno a -20°C.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	600 nm (578 - 620 nm)
Temperatura:	37° C
Misura:	contro acqua distillata

Pipettare come segue:

Reagent R1	1000 µL
Campione, Std / Cal / H ₂ O	20 µL

Miscelare, incubare 5' e leggere l'Assorbanza entro 30'.

CALCOLO

Urine / CSF

$$\text{Proteine Totali} = \frac{\text{Abs Campione} - \text{Abs Bianco Reagente}}{\text{Abs Std/Cal} - \text{Abs Bianco Reagente}} \times \text{Conc. Std/Cal}$$

Urine 24 ore

$$\text{Proteine Totali (mg/24 h)} = \text{Proteine Totali (mg/L)} \times \text{Vol (L) urine/24 h}$$

$$\text{Proteine Totali (mg/24 h)} = \text{Proteine Totali (mg/dL)} \times \text{Vol (L) urine/24 h} \times 10$$

Fattori Conversione:

mg/dL x 10 = mg/L
mg/dL x 0.01 = g/L
mg/L x 0.1 = mg/dL
mg/L x 0.001 = g/L

CALIBRAZIONE

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

Utilizzare lo standard accluso alla confezione.

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

In campioni occasionali di urina normalmente non vi sono proteine ma occasionalmente è possibile trovarle nel range 0 – 200 mg/L (0 – 20 mg/dL). In tal caso il test deve essere ripetuto sulle urine delle 24 ore.

Urine 24 ore :

- Adulti < 100 mg/24h
- Gravidie < 150 mg/24h

CSF :

- Bambini 300 -1000 mg/L
- Adulti: 150 - 450 mg/L

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 = 178; D.S. = 5,23; CV = 2,94%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 1560; D.S. = 27,6; CV = 1,77%

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

$$y = 1,02 x + 2,20 \quad r = 0,99$$

SENSIBILITA': 20 mg/L (2 mg/dL)

LINEARITA': 20 – 3000 mg/L (2-300 mg/dL)

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

Valori di Bilirubina fino a 5 mg/dL non interferiscono mentre l'emoglobina ha un effetto sulla reazione. Altri farmaci e sostanze che si concentrano nelle urine possono interferire, per esempio alcuni antibiotici (aminoglicosidi, gentamicina, tobramicina). Nel Liquor, una puntura traumatica capace di prelevare anche emazie può incrementare i valori anche di 10 mg/L per ogni 1000 eritrociti.

NOTE

1. Questo metodo può essere utilizzato con diversi strumenti. Qualsiasi applicazione a uno strumento deve essere validata per dimostrare che i risultati soddisfano le caratteristiche di prestazione del metodo. Si consiglia di validare periodicamente lo strumento. Contattare il proprio distributore per qualsiasi domanda sul metodo di applicazione.

2. 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

Il prodotto non contiene sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali. 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
	Numero di catalogo		Scadenza
	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

Boege F. Urinary proteins. In: Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 382-400.

Felgenhauer K. Laboratory diagnosis of neurological diseases. In: Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 1308-26.

Johnson AM, Rohlfes EM, Silverman LM. Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 477-540.

Orsonneau JL, Douet P, Massoubre C, Lustenberger P, Bernard S. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. ClinChem 1989;35:2233-6.

Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, Yamanaka M, Ohsawa S, Makino K et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex. Manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. ClinChem 1986;32:1551-4.