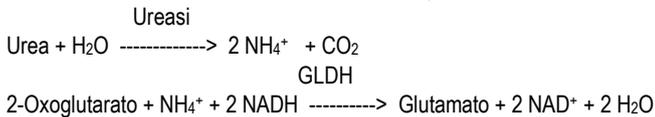


Determinazione quantitativa dell' UREA nel siero, nel plasma o nelle urine. Metodo enzimatico cinetico in UV (Ureasi – GLDH).

REF **CC1314** R1:3x20 mL+R2: 1x15 mL+R3 1x3mL - **CC1312** R1:3x40 mL + R2:1x30 mL+R3 1x3mL - **CC1310** R1:3x80 mL+R2: 1x60 mL+R3 1x3mL

PRINCIPIO DEL METODO

La determinazione enzimatica procede con il seguente schema:



La trasformazione dell'NADH in NAD determina una diminuzione di Assorbanza misurabile fotometricamente a 340 nm. La velocità di diminuzione è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'Urea nel campione.

SIGNIFICATO CLINICO

L'Urea è il prodotto finale del metabolismo proteico. Essa si forma a livello epatico a partire dall'ammoniaca, viene riversata nel sangue, filtrata dai reni ed eliminata con le urine. I livelli ematici di Urea dipendono pertanto dalla sintesi di ammoniaca (apporto alimentare e catabolismo delle proteine tissutali), dalla funzionalità epatica e da quella renale. Alti livelli ematici di Urea si riscontrano per un eccessivo apporto di azoto, come avviene in chi segue una dieta iperproteica. Lo stesso avviene anche in caso di aumentato catabolismo proteico e danno tissutale, come nell'ipertiroidismo, nel digiuno prolungato, durante severe infezioni ed in presenza di neoplasie. Un elevato livello di Urea nel sangue può presentarsi anche nelle emorragie gastrointestinali (ulcera peptica), nel morbo di Addison, dopo un trauma e nell'insufficienza renale. Quest'ultima condizione può essere causata da un danno d'organo - conseguente ad esempio a diabete o ipertensione - ma anche da un'ostruzione delle vie urinarie, ad esempio per la presenza di un calcolo renale o di un tumore. Un'insufficiente apporto di sangue ai reni (in disidratazione, ustioni, emorragie e insufficienza cardiaca), può aumentare i livelli sierici di urea. Bassi livelli ematici di Urea sono poco comuni e di norma non preoccupanti. Generalmente accadono per insufficiente apporto di azoto (nelle diete ipoproteiche, nell'alcolismo e nella malnutrizione), ma anche nel malassorbimento. Altre condizioni caratterizzate dal calo dei livelli plasmatici di Urea sono gli stati di iper idratazione (eccessiva assunzione di liquidi), la gravidanza, le gravi malattie epatiche con danno d'organo ed il morbo di Simmonds (panipopituitarismo). La determinazione parallela dell'urea e della creatinina può differenziare l'azotemia pre-renale e post-renale. L'azotemia pre-renale, causata da disidratazione, aumento del catabolismo proteico, trattamento con cortisolo o da diminuzione della perfusione renale, porta ad un aumento dei livelli di urea, mentre i valori di creatinina rimangono all'interno dell'intervallo di riferimento. Nelle azotemie post-renali, causate dall'ostruzione delle vie urinarie, aumentano sia i livelli di urea che di creatinina, ma la creatinina in misura minore. Nelle malattie renali le concentrazioni di urea sono elevate quando la velocità di filtrazione glomerulare è marcatamente ridotta e quando l'assunzione di proteine è superiore a 200 g/die.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

Reagente R1:

Tampone Tris, pH 7,8	120 mmol/L
2-Oxoglutarato	7 mmol/L
ADP	0,6 mmol/L
Ureasi	> 6 kU/L
GLDH (Glutamato deidrogenasi)	> 1 kU/L

Reagente R2:

NADH	0,25 mmol/L
------	-------------

Reagente R3:

Standard (Urea)	valore 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.

Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati oppure se l'Assorbanza del Bianco Reagente < 1.000 a 340 nm ed in cuvetta da 1 cm di percorso.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riportarli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

Per la Procedura Reagente Starter, i reagenti R1 ed R2 sono pronti all'uso.

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 15-25° C, 4 settimane a 2-8°C.

CAMPIONI

Siero, Plasma da EDTA (evitare ammonio eparina). Urine.

Diluire le urine 1:50 (1+49; p.es 10 µL + 490 µL) con acqua distillata.

Stabilità nel siero/plasma: 7 giorni a 4-25°C, 3 mesi a -20°C.

Stabilità nelle urine: 2 giorni a 20-25°C; 7 giorni a 4-8°C; 1 mese a -20°C.

Scartare i campioni contaminati.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	340 nm
Temperatura:	37°C
Misura:	contro acqua distillata

Procedimento come Monoreagente (Campione Starter).

Pipettare come segue:

Soluzione Lavoro	1000 µL
Campione /Calibratore/H ₂ O	10 µL

Miscelare, attendere 30 secondi e leggere l'Assorbanza (Abs1). Dopo altri 60 secondi leggere di nuovo l'Assorbanza (Abs2). Calcolare Δ Abs (Abs2 – Abs1).

Procedimento come bi-reagente (Reagente Starter).

Pipettare come segue:

Reagente R1	800 µL
Campione /Calibratore	10 µL

Miscelare, attendere 30 secondi, quindi aggiungere:

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

Miscelare, attendere 30 secondi e leggere l'Assorbanza (Abs1). Dopo altri 60 secondi leggere di nuovo l'Assorbanza (Abs2). Calcolare Δ Abs (Abs2 – Abs1).

CALCOLO

Siero o Plasma:

$$\Delta \text{ Abs (Abs2 - Abs1) Campione}$$

$$\text{Urea} = \frac{\Delta \text{ Abs (Abs2 - Abs1) Campione}}{\Delta \text{ Abs (Abs2 - Abs1) Calibratore}} \times \text{Conc. Calibratore}$$

Urina:

Calcolare come per il siero/plasma e moltiplicare il risultato per 50 (diluizione iniziale del campione).

$$\text{Urea Urine (mg/dL)} \times \text{Vol Urine 24h (litri)}$$

$$\text{Urine 24h (g/24h)} = \frac{\text{Urea Urine (mg/dL)} \times \text{Vol Urine 24h (litri)}}{100}$$

100

Fattori di conversione:

$$\text{Urea mg/dL} \times 0,1665 = \text{Urea mmol/L}$$

$$\text{Urea md/dL} \times 0,467 = \text{BUN (Blood Urea Nitrogen) mg/dL}$$

$$\text{Bun (Blood Urea Nitrogen) mg/dL} \times 2,14 = \text{Urea mg/dL}$$

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.

In alternativa allo standard accluso alla confezione, usare il Calibratore

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

Siero / Plasma:

	[mg/dL]	[mmol/L]
Donne < 50 anni	15-40	2.6-6.7
Donne > 50 anni	21-43	3.5-7.2
Uomini < 50 anni	19-44	3.2-7.3
Uomini > 50 anni	18-55	3.0-9.2

Bambini

1-3 anni	11-36	1.8-6.0
4-13 anni	15-36	2.5-6.0
14-19 anni	18-45	2.9-7.5

Urea in Urine

26 – 43 g/24h (0.43 – 0.72 mol/24h)

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 = 29,8; D.S. = 0,61; CV = 2,05%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 117; D.S. = 1,48; CV = 1,27%

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

$$y = 0.971x + 1.49 \quad ; \quad r = 0.992$$

SENSIBILITA': 2 mg/dL

LINEARITA': 2 – 300 mg/dL

INTERFERENZA E SPECIFICITA'

Nessuna interferenza osservata con presenza di Bilirubina fino a 20 mg/dL, Emoglobina fino a 500 mg/dL e Trigliceridi fino a 1000 mg/dL. Ioni ammonio interferiscono, non usare ammonio eparina come anticoagulante.

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 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.

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 AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

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

BIBLIOGRAFIA

Thomas L. Clinical Lab. Diagn. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 374-7.

Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 1838.