

Determinazione turbidimetrica quantitativa della Microalbumina nelle urine

REF **TB1043** R1: 2x25 mL + R2: 1x5 mL + R3: 1x1 mL

Calibratore (Albumina)

valore in etichetta

PRINCIPIO DEL METODO

Aggiungendo anticorpi anti Albumina umana a campioni urinari contenenti Albumina, si sviluppa una reazione antigene anticorpo con formazione di complessi insolubili. La soluzione incrementa la propria assorbanza misurabile a 340 nm. La misura di questo incremento è direttamente proporzionale alla quantità di Albumina presente nel campione in esame. L'uso di una curva di calibrazione a valori noti consente di determinare la concentrazione di Albumina nel campione incognito.

SIGNIFICATO CLINICO

La microalbuminuria (MA) è la presenza di albumina in tracce nell'urina, cioè concentrazione modesta ma comunque significativa dal punto di vista clinico. La MA è considerata un indicatore precoce di nefropatia diabetica. In caso di diabete, l'iperglicemia cronica determina un danneggiamento dei capillari del glomerulo renale, aumentandone la permeabilità, per cui sostanze normalmente trattenute nel sangue passano nelle urine. Tra queste, l'albumina compare già in stadi molto precoci, prima ancora che si possa parlare di vera e propria malattia. Nel soggetto normale l'escrezione di albumina varia tra 1,5 e 20 µg al minuto. Nella microalbuminuria si registrano valori di eliminazione pari a 20-200 µg al minuto (30-300 mg/die). Livelli superiori indicano una condizione più grave, chiamata nefropatia conclamata. In condizioni normali, non dovrebbero esserci tracce di albumina nelle urine. In un soggetto in salute, infatti, i valori registrati di questa proteina dovrebbero attestarsi tra 1,5 e 20 µg al minuto.

Possiamo parlare di microalbuminuria quando il livello di escrezione urinaria di albumina varia da 20 a 200 µg al minuto. Superata questa soglia, invece, possiamo cominciare a parlare di albuminuria, sicuramente più grave, in quanto segnale di una nefropatia conclamata.

Una modestissima quota di albumina (meno di 30 mg nelle urine delle 24 ore) può essere rinvenuta nell'urina anche in assenza di danno ai glomeruli. La microalbuminuria può essere la conseguenza di diverse malattie renali, tutte che colpiscono i glomeruli. Queste condizioni possono essere primarie, quando non ci sono manifestazioni a carico di altri organi, e solo il rene ne è colpito (Glomerulonefrite a depositi di IgA; Glomerulonefrite membranosa primitiva; Glomerulonefrite membranosa-proliferativa primitiva; Glomerulopatia a lesioni minime; Glomerulosclerosi focale e segmentale) oppure secondarie, quando la malattia dei glomeruli si accompagna a manifestazioni di malattie sistemiche (Lupus eritematoso sistemico; Diabete mellito; Ipertensione arteriosa; Amiloidosi).

Altri fattori che possono causare microalbuminuria sono il fumo, la disidratazione, l'esercizio fisico (soprattutto se ripetuto, intenso e costante), le infezioni del tratto urinario, l'insufficienza cardiaca, la ipertrigliceridemia, l'obesità.

La microalbuminuria è più frequente coll'aumentare dei valori pressori, sia sistolici che diastolici. Di conseguenza, i farmaci antiipertensivi tendono a ridurla, seppur in maniera variabile.

Malnutrizione e FANS possono invece diminuire i livelli di albuminuria.

COMPOSIZIONE REAGENTI

R1 (Tamponi):

| | |
|----------------------|------------|
| Tampone TRIS, pH 7,5 | 100 mmol/L |
| Cloruro di Sodio | 150 mmol/L |

R2 (Antisiero):

| | |
|--|------------|
| Tampone TRIS, pH 7,5 | 100 mmol/L |
| Cloruro di Sodio | 150 mmol/L |
| Anticorpi anti Albumina umana (da capra) | |

R3 (Calibratore)

PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

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 Assorbanza (Abs) Bianco Reagente a 340 nm > 0,300 in cuvette da 1 cm contro acqua.

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: da raccolta delle 24h oppure da raccolta overnight 8-12 ore oppure da raccolta in 2 ore presso il laboratorio clinico oppure fresche del mattino (per dosaggio simultaneo della creatinina urinaria). Il campione deve essere refrigerato fino al suo processo per evitare crescite batteriche o fungine. Se si vedono torbidità o sospensioni di particelle, centrifugare prima dell'uso.

Stabilità: 1 giorno a 2-8° C, 2 settimane se si aggiunge un conservante tipo sodio azide allo 0,02%, 1 mese a -20° C (congelare e scongelare solo una volta).

CSF: Stabilità identica al campione urinario.

PROCEDURA

| | |
|-------------------|------------------|
| Lunghezza d'onda: | 340 nm |
| Temperatura: | +37°C |
| Bianco: | acqua distillata |

Pipettare come segue:

| | |
|--|--------|
| Reagente (R1) | 350 µL |
| Campione / Calibratore /H ₂ O | 20 µL |

Miscelare, dopo 30" leggere l'Assorbanza (Abs₁) e poi aggiungere:

| | |
|---------------|-------|
| Reagente (R2) | 35 µL |
|---------------|-------|

Miscelare, dopo altri 300" leggere di nuovo l'Assorbanza (Abs₂).

Calcolare il Δ Abs (Abs₂ – Abs₁) sia per campioni che per calibratori

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.

Diluire il calibratore (R3) in NaCl 9 gr/L come segue:

| Diluzione | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| CAL (µL) | -- | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 |
| NaCl 9 g/L (µL) | 100 | 90 | 75 | 50 | 25 | -- |
| Fattore | 0.0 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1.0 |

Moltiplicare la concentrazione del Calibratore per il corrispondente fattore per ottenere la concentrazione dell'analita corrispondente ad ogni diluizione.

Per evitare le diluizioni manuali del calibratore, è possibile utilizzare

REF TUC1055 MICROALBUMINA CALIBRATION SET - 5x1 mL

un set di calibrazione composto da flaconi di calibratori pre diluiti, con esatto valore indicato in etichetta.

CALCOLO

La seduta analitica non può essere validata se il Δ Abs (Abs2 – Abs1) del Bianco Reagente è $> 0,300$ a 340 nm in cuvetta da 1 cm di cammino ottico. Calcolare per ogni campione in esame e per ogni calibratore il Δ Abs (Abs2 – Abs1). Costruire una curva di calibrazione (Δ Abs contro concentrazioni dei singoli calibratori) e su di essa riportare i valori del Δ Abs (Abs2 – Abs1) dei campioni in esame per ricavarne le concentrazioni. Per calcoli automatici (previsti dagli analizzatori automatici), il metodo di elaborazione dati consigliato è la Curva SPLINE ma altri metodi possono essere utilizzati (Punto-Punto, Logit-Log 4P, etc.).

Fattore di Conversione: mg/dL x 10 = mg/L ; mg/Lx0,1 = mg/dL

CONTROLLO QUALITA'

Urine di controllo normali e patologiche a concentrazione nota, devono essere analizzate regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare i seguenti prodotti MTD Diagnostics:

REF TUC 1060 MICROALBUMIN CONTROL LIQUID– 2x1 mL

Il range dei valori dei controlli deve essere valutato come una linea guida potendo esso essere determinato dall'applicazione del metodo o dalla manualità dell'utente o da altri fattori. I valori ottenuti devono essere utilizzati ai fini della valutazione della Precisione del metodo (Ripetibilità). Per la valutazione della Accuratezza del metodo (Riproducibilità) è necessario aderire ad un programma di Valutazione Esterna Qualita' (VEQ) gestito da enti certificati.

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Urine con raccolta non nelle 24h

| | |
|------------------|-------------|
| Normale | < 20 mg/L |
| Microalbuminuria | 20-200 mg/L |
| Proteinuria | > 200 mg/L |

Urine con raccolta nelle 24h

| | |
|------------------|-------------|
| Normale | < 30 mg/L |
| Microalbuminuria | 30-300 mg/L |
| Proteinuria | > 300 mg/L |

CSF

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Bambini da 3 mesi a 4 anni | 0-400 mg/L |
| Bambini > 4 anni e Adulti | 100-300 mg/L |
| Rapporto Alb CSF/Alb siero | < 7x10 ⁻³ |

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 = 28,8; D.S. = 0,61; CV = 2,17%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 116; D.S. = 3,12; CV = 2,68%

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

$$y = 0,94x - 0,44 \quad \text{con } r = 0,99$$

SENSIBILITA': 5 mg/L

LINEARITA': 5 – 300 mg/L

INTERFERENZE E SPECIFICITA'

La Bilirubina fino a 25 mg/dL, l'Emoglobina fino a 250 mg/dL, l'Urea fino a 40 g/L non interferiscono.

Possono interferire: infezioni urinarie, tetracicline, salicilati > 5 g/L con effetto precipitante per proteine. Altre sostanze possono interferire.

PRECAUZIONI

R1 ed R2 contengono TRIS BUFFER 100 mmol/L – pH 7.5 - CAS 1185-53-1

H315: Provoca irritazione cutanea

H319: Provoca gravi irritazioni oculari

H335: Può irritare le vie respiratorie

I sieri umani presenti nel preparato sono stati testati con metodi marcati CE e approvati FDA e sono stati trovati negativi per presenza di HBsAg, HIV 1&2, HCV. Tuttavia, poiché non ci sono metodi capaci di assicurare la totale assenza di tali agenti infettanti, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente capace di trasmettere malattie infettive di ogni tipo, in accordo con le norme di Buona Pratica di Laboratorio.

L'anticorpo presente nel reagente è di origine animale e non è in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, poiché non ci sono metodi per garantire la totale assenza di tali agenti infettivi o di altri microbi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente in grado di trasmettere malattie infettive di qualsiasi tipo, in conformità con gli standard della Buona Pratica di Laboratorio.

Il prodotto non contiene altre 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 tenere allorché 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 |
| | Numero di catalogo | | Scadenza |
| | Numero di lotto | | Fabbricante |

BIBLIOGRAFIA

Narayanan S. *Clin.Chem* 128: 1528-1531 (1982)

Stevens, C.D. *Clinical immunology and serology: a laboratory perspective*. 3rd. Edition. FA Davis Company. (2010)

Dati F et al. *Eur J Clin.Chem. Clin. Biochem.* 34 : 517-520 (1996)