

## Uso previsto

Determinazione quantitativa delle proteine totali nell'urina. **Solo su prescrizione.**

## Interesse clinico

La presenza di proteine nell'urina è un indicatore molto significativo di disturbi renali. L'aumento delle proteine può manifestarsi in quattro forme: aumento della permeabilità glomerulare; riassorbimento tubulare difettoso; aumento della concentrazione plasmatica di una proteina anomala a basso peso molecolare; secrezione anomala di proteine nelle vie urinarie.<sup>1</sup> L'albuminuria, ovvero l'aumento della quantità di albumina nelle urine, è stata riconosciuta come indicatore precoce di un danno renale nel diabete che è possibile risolvere se individuato e trattato tempestivamente.<sup>2</sup>

## Storia del metodo diagnostico

Sono stati descritti diversi metodi per la determinazione delle concentrazioni di proteine nei fluidi biologici. Questi metodi si basano su procedure colorimetriche, turbidimetriche, elettroforetiche o immunologiche.<sup>3,4</sup> I metodi di legame dei coloranti sono caratterizzati da buoni livelli di precisione e sensibilità. Il metodo al blu di Coomassie<sup>5</sup> è molto sensibile, ma i reagenti macchiano vetreria e plastica. Il metodo qui descritto si basa sulla procedura sviluppata da Fujita<sup>6</sup> e Watanabe.<sup>7</sup> Si tratta di un metodo colorimetrico sensibile che utilizza il rosso pirogallolo. Il metodo macchia raramente cuvette o tubi di plastica e può essere automatizzato.

## Principio

Il rosso di pirogallolo si combina con l'acido molibdico a un pH basso. Quando il complesso si combina con le proteine, si forma un colore blu-viola. L'aumento dell'assorbanza a 600 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteine nel campione.

## Reagenti

1. REAGENTE PER MICROPROTEINE: contiene tampone, rosso di pirogallolo 0,067 mmol/L, stabilizzatore di molibdato di sodio 0,153 mmol/L, tensioattivi e conservanti.
2. SOLUZIONE PROTEICA STANDARD: contiene albumina 50 mg/dl in soluzione salina con sodio azide allo 0,05% come conservante.

## Preparazione dei reagenti

Il reagente per microproteine e la soluzione proteica standard vengono forniti pronti per l'uso.

## Conservazione dei reagenti

Conservare il reagente per microproteine e la soluzione proteica standard in frigorifero (2-8°C). Reagenti e standard restano stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

## Precauzioni

1. Il reagente per microproteine è destinato esclusivamente a fini diagnostici *in vitro*.
2. Adottare le normali precauzioni per la manipolazione dei reagenti in laboratorio.
3. Lo standard proteico contiene sodio azide. Non ingerire. Il sodio azide può reagire con il piombo e il rame delle tubature di scarico e formare un complesso metallo-azide altamente esplosivo. Pertanto, per smaltire i residui del reagente occorre diluirli con abbondante acqua per evitare che l'azide si depositi.

## Deterioramento dei reagenti/standard

Reagenti e standard devono essere limpidi. Non utilizzare se torbidi. Il mancato raggiungimento dei valori del controllo può indicare il deterioramento del reagente o dello standard. Non utilizzare se l'assorbanza del reagente a 600nm è inferiore a 0,100.

## Raccolta e conservazione dei campioni

La raccolta dei campioni deve essere effettuata secondo le indicazioni del documento M29-T2 del NCCLS. I campioni contenenti particolato visibile devono essere purificati mediante centrifugazione prima di poter essere analizzati.

URINA: analizzare i campioni raccolti in 24 ore. Non raccogliere l'urina in periodi di intenso esercizio fisico poiché questo altera la concentrazione dell'albumina. Le proteine vanno analizzate in campioni freschi. Se non è possibile eseguire il test con urine fresche, i campioni possono essere conservati a -20°C per un anno.<sup>8</sup> NOTA: l'emoglobina può far aumentare i valori delle proteine totali: **NON UTILIZZARE** campioni contenenti sangue.

## Interferenze

Si raccomanda di non utilizzare campioni di urina con conservanti aggiunti, poiché è stato dimostrato che alcuni conservanti, come l'HCL e l'acido benzoico, interferiscono con il dosaggio delle proteine, fornendo risultati falsamente bassi.<sup>7</sup> È stato osservato che la bilirubina fino a un livello di 20 mg/dl e l'acido ascorbico fino a un livello di 3,0 mg/dl non interferiscono con il dosaggio. (Meno del 3,0% di deviazione per i campioni nell'intervallo 130,0-132,0 mg/dl e meno del 17% per i campioni nell'intervallo 9,2-12,5 mg/dl). Poiché l'emoglobina è una proteina, la sua presenza farà aumentare i valori delle proteine totali rilevate. È stato osservato che la variazione del pH non ha effetti sulla misurazione delle proteine totali. Non sono stati valutati gli effetti della variazione del peso specifico. Alcune sostanze e farmaci possono interferire sulle misurazioni, si veda Fujita.<sup>6</sup>

## Materiali in dotazione

1. Reagente per microproteine
2. Soluzione proteica standard

## Materiali necessari non in dotazione

1. Dispositivi per pipettaggio di precisione.
2. Provette/rack.
3. Bagnomaria da laboratorio e blocco termico (37°).
4. Timer.
5. Spettrofotometro in grado di leggere a 600nm.

## Procedura (automatica)

Sono disponibili procedure applicative per diversi strumenti automatici. Contattare il servizio di assistenza tecnica.

## Procedura (manuale)

1. Etichettare le provette da analizzare: "Bianco", "Standard", "Controllo", "Campione", ecc.
2. Pipettare 1,0 ml di reagente per microproteine in ogni provetta.
3. Lasciare riscaldare le provette a 37°C.
4. Pipettare 0,02 ml (20ul) di acqua deionizzata, standard, controlli e campioni nelle provette opportunamente etichettate.
5. Lasciare incubare le provette a 37°C per 5 minuti.
6. Dopo 5 minuti, impostare lo spettrofotometro a 600 nm e azzerare lo strumento con la provetta BIANCO.
7. Leggere e registrare l'assorbanza (Abs) dello standard, dei controlli e dei campioni.
8. Per determinare la concentrazione di microproteine nei campioni, consultare la sezione "Calcoli".

## Calibrazione

Utilizzare uno standard proteico acquoso (con tracciabilità NIST SRM 927c)

## Controllo qualità

Applicare la prassi standard per il controllo di qualità. Utilizzare controlli per urina disponibili in commercio (2 livelli) per monitorare l'accettabilità delle variazioni giornaliere. Si ottiene un livello soddisfacente di risultati se i valori degli analiti rientrano nell'intervallo di accettabilità definito dal laboratorio.

## Calcoli

I valori delle proteine sono espressi in mg/dl.

$$\text{Proteine (mg/dl)} = \frac{\text{abs camp.}}{\text{abs std.}} \times \text{conc. std.}$$

con:

abs camp. = assorbanza del campione da analizzare

abs std. = assorbanza dello standard

conc. std. = concentrazione dello standard (50 mg/dl)

Esempio:

Abs. camp. = 0,085

Abs. std. = 0,195

conc. std. = 50 mg/dl

$$\text{Proteine (mg/dl)} = \frac{0,085}{0,195} \times 50 = 21,8 \text{ mg/dl}$$

# Kit reagenti per microproteine Pointe

Per determinare le proteine dell'urina di 24 ore, misurare il volume totale dell'urina in ml (TV) e dosare il contenuto proteico (mg/dl). Calcolare le proteine con la seguente formula:

$$\text{Proteine (mg/g)} = \text{Proteine (mg/dl)} \times \frac{\text{TV}}{100}$$

con: TV = volume totale in ml dell'urina di 24 h  
100 = fattore di conversione da ml/g a dl/giorno

## Unità S.I.

Per convertire i valori trovati in unità del SI, moltiplicare i risultati (espressi in mg/dl) per 0,0100. Ad esempio, concentrazione di microproteine = 21,8 mg/dl x 0,0100 = 0,218 g/L.

## Valori attesi 6, 7

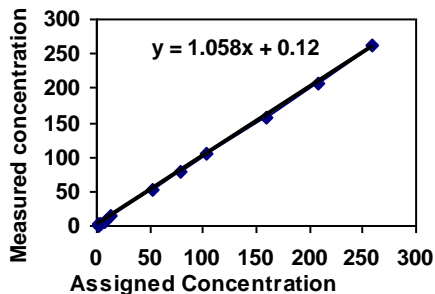
Proteine urina di 24 h 28 - 141 mg/g  
Urina random < 10 mg/dl

NOTA: ciascun laboratorio deve confermare la validità degli intervalli indicati per la popolazione a cui si rivolge.

## Prestazioni

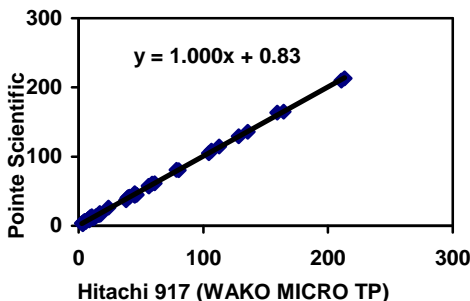
- Intervallo di analisi: la procedura per le microproteine ha un intervallo di dosaggio di 2,0 - 250 mg/dl. I campioni con valori superiori a 250 mg/dl vanno diluiti con pari volume di soluzione fisiologica isotonica e nuovamente analizzati. Moltiplicare i risultati per 2 per compensare la diluizione.
- La linearità è stata ottenuta utilizzando undici concentrazioni note comprese tra 1,23 e 259,43 mg/dl. Lo studio è stato eseguito su un analizzatore Roche Hitachi 917. Segue la rappresentazione grafica.

Grafico della linearità



- Sensibilità: con una risoluzione di assorbanza dello 0,001, questa procedura ha una sensibilità di 0,250 mg/dl. Il limite di rilevabilità è risultato pari a 2,0 mg/dl leggendo l'assorbanza bicromaticamente a 600/700 nm (analizzatore chimico Hitachi 917).
- Comparazione: gli studi che comparano l'utilizzo del presente metodo e di un metodo simile (Wako Autokit Micro TP eseguito su Hitachi 917) hanno evidenziato un coefficiente di correlazione di 0,9997 e l'equazione di regressione  $y=1,000x+0,83$ . Nello studio sono stati utilizzati 55 campioni con un range di 2,5 - 213,3 mg/dl. Segue la rappresentazione grafica.

Grafico della correlazione



- Precisione: lo studio è stato eseguito su un analizzatore Roche Hitachi 917. La precisione di analisi è stata valutata applicando una modifica del protocollo EPT-T2 del NCCLS. I dati sulla precisione intra-saggio sono stati ottenuti analizzando tre campioni in repliche di 20 nello stesso giorno. I dati inter-saggio sono stati ottenuti analizzando tre campioni in repliche di cinque in un periodo di tre giorni.

### Urina intra-saggio (n=20)

Media	D.S.	C.V.%
8,7	0,7	8,6
121,8	2,1	1,7
240,3	1,7	0,7

### Urina inter-saggio (n=20)

Media	D.S.	C.V.%
10,2	0,9	8,6
127,0	1,6	1,2
242,5	2,4	1,0

## Riferimenti bibliografici

- Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders, Philadelphia p. 608, 1986.
- Viberti, G.C., Pickup, J.C., Jarrett, R.J., Keon, H., N Engl J Med. 300:638-41 1979.
- Grant, G.H., Kachmer, J.F.: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W. Tietz, Editor, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 358-374, 1976.
- Cannon, D.C., Olitzky, I., Inkpen, J.A.: Clinical Chemistry — Principles and Technics, 2<sup>nd</sup> Ed., R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W., Winkelman, Editors, Harper & Row, New York, pp. 442-431, 1974.
- Pesce, M.A., Strande, C.S., Clin Chem 19:1265-1267, 1973.
- Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. Bunseki Kagaku 32: E379-E386, 1983.
- Watanabe, N., Kamel, S., Ohkubo, A., Yamakna, M., Clin Chem 32:1551-1554, 1986.
- Tietz, N.W.; Clinical Guide to Laboratory Tests, W.B. Saunders, Phil. P.470, 1990.

## Legenda

Utilizzare entro (aaaa-mm-gg)	<b>LOT</b> Codice lotto e gruppo
<b>REF</b> N. catalogo	Fabbricante
<b>IVD</b> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i>	Limiti di temperatura
Consultare il manuale utente	<b>Rx Only:</b> utilizzare solo su prescrizione
<b>CE</b> Marchio CE	<b>EC REP</b> Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea

<b>REF</b> P7582	Prodotto da HORIBA Instruments Incorporated 5449 Research Drive Canton, MI 48188	2°C - 8°C	<b>IVD</b>
------------------	---	-----------	------------

Prodotto per HORIBA Instruments Incorporated: Marchio Pointe  
5449 Research Drive, Canton, MI 48188

Rappresentante autorizzato per l'Europa:  
Obelis s.a.  
Boulevard Général Wahis 53  
1030 Bruxelles, BELGIO  
tel: (32)2.732.59.54 fax:(32)2.732.60.03 email: mail@obelis.net



## Reagenti certificati

I reagenti Pointe sono certificati per essere stati prodotti conformemente ai parametri specificati. Se entro la data di scadenza un reagente Pointe dovesse risultare non conforme alle specifiche, sarà prontamente sostituito senza alcun addebito.