

HYDROXYPROLINE NEW

Determinazione colorimetrica
su urina

10 x 3 determinazioni

REF CM08-30T

PRINCIPIO

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

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, etc.).

REAGENTI E MATERIALI

Contenuto del kit:	REF CM08-30T	Quantità
(*) REAGENT 1/2 REAGENT 1 (polvere predosata) Ossidante contenuto nel tappo dosatore	CM08-30TR1	10x150 mg
REAGENT 2 Tampone pH 6.0 contenuto nel flacone	CM08-30TR2	10x2.5 ml
(*) REAGENT 3 (polvere predosata) Cromogeno	CM08-30TR3	10x200 mg
(*) REAGENT 4 Alcalinizzante	CM08-30TR4	1x35 ml
(*) REAGENT 5 Miscela idro-alcolica	CM08-30TR5	1x70 ml
(*) REAGENT 6 Acido perclorico	CM08-30TR6	1x15 ml
STANDARD (Std) Idrossiprolina standard 250 mg/L	CM08-30TS	1x2 ml

STABILITÀ: a 4°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

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 (R1/2 + R5)

Togliere la capsula gialla. Premere il pistone in modo che la polvere contenuta nel tappo cada nel flacone. Togliere il tappo e pipettare nel flacone 2,5 ml di Reagent 5. Agitare fino a completa solubilizzazione della polvere.

STABILITÀ: utilizzarlo al massimo entro 15 minuti dalla preparazione.

REAGENTE B (R3 + R5 + R6)

In un flacone di Reagent 3 pipettare 4 ml di Reagent 5 e 1,2 ml di Reagent 6 e agitare fino a completa miscelazione.

STABILITÀ: utilizzarlo al massimo entro 2 ore dalla preparazione.

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

Il test di Nordin permette di 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.

Urine delle 24 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 conservarne un campione.

CALCOLO E VALORI DI RIFERIMENTO PER IL TEST DI NORDIN

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

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

Valori di riferimento:

8-20 mg idrossipr./g creatinina (5-17 mmol idrossipr./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: si consiglia di usare il kit HYDROXYPROLINE Extra fino a quando l'operatore non si sia impadronito della tecnica.

Pipettare in una provetta da idrolisi in vetro pirex contrassegnata:

	Campione
Campione	2.0 ml
HCl concentrato	2.0 ml

ATTENZIONE: serrare con forza il tappo a vite delle provette, per assicurare una tenuta perfetta 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 reagente; S/I: standard di idrossiprolina;

	C	B	S/I
Sovranatan.	0.2 ml	---	---
Reagent 4	1.0 ml	---	---
Acqua distillata	---	1.2 ml	1.2 ml
St. di idross.	---	---	20 µl
Reagente A	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
------------	--------	--------	--------

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

CALCOLO

$Idrossiprolina (mg/L) = (Ac/Asi) \times 50$

Per calcolare l'escrezione nelle 24 ore moltiplicare il valore ottenuto per il volume delle urine delle 24 ore espresso in litri.

VALORI DI RIFERIMENTO

Adulti: 10 - 40 mg di idrossiprolina / litri urina 24 h

Giovani e anziani:

valori in mg di idross./ litri urina 24 h / mq superf corp.

ETÀ	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 nomogrammi 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.

CONTROLLO DI QUALITÀ – CALIBRAZIONE

Si raccomanda un programma di controllo qualità a tutti i laboratori di chimica clinica.

PRESTAZIONI DEL METODO

Linearità:

Il test è tarato per poter dosare correttamente l'intervallo di concentrazione normalmente riscontrato.

Per concentrazioni notevolmente superiori diluire il campione e tenere conto della diluizione nel calcolo.

Precisione nella serie:

	Livello 1	Livello 2
Media (mg/24 ore)	18.5	101
DS	0.15	1.47
CV %	0.81	1.45

Precisione tra le serie:

	Livello 1	Livello 2
Media (mg/24 ore)	24	106
DS	0.35	3.98
CV %	1.45	3.75

Correlazione: il kit FAR per la determinazione della idrossiprolina presenta un coefficiente di correlazione pari a 0.98 rispetto ad un altro kit attualmente in commercio.

Interferenze: la presenza di cromogeni nel campione può causare interferenze nella misurazione della idrossiprolina. In tal caso seguire quanto indicato nella osservazione 3.

SMALTIMENTO

Il prodotto è per esclusivo uso professionale. Il prodotto va smaltito in conformità alla regolamentazione nazionale/internazionale.

PRECAUZIONI



REAGENT 1

Avvertenza: Pericolo

H302 Nocivo se ingerito.

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H334 Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.

REAGENT 2 e REAGENT 3: Non pericoloso.



REAGENTE 4

Avvertenza: Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.



REAGENT 5

Avvertenza: Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H225 Liquido e vapori facilmente infiammabili.

H319 Provoca grave irritazione oculare.

H336 Può provocare sonnolenza o vertigini.



REAGENTE 6

Avvertenza: Pericolo

Indicazioni di pericolo:

H271 Può provocare un incendio o un'esplosione; molto comburente

H314 Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

STANDARD: Non pericoloso.

OSSERVAZIONI

- (*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le informazioni contenute nelle Schede di Sicurezza.
- Se il colore che si sviluppa nella reazione risulta giallastro anziché rosa ciclamino, le cause sono o idrolisi insufficiente o reagente B scaduto. Contattare la FAR.
- 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 Reagent 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 e procedere nel modo descritto nel procedimento. Al termine il colore risulterà più vivo.

- I volumi di reazione possono essere variati rispettando le proporzioni.
- Smaltire i rifiuti secondo le leggi vigenti.

BIBLIOGRAFIA

- The determination of urinary hydroxyproline (Koevoet et Baars. Clin. Chim. Acta. 25: 39-43. 1969)
- Routine assay of total urinary hydroxyproline based on resin-catalyzed hydrolysis (Goverde et Veenkamp. Clin. Chim. Acta 41:29-40. 1972)

LEGENDA SIMBOLI

	dispositivo medico diagnostico in vitro
	numero di lotto
	numero di catalogo
	limite di temperatura
	usare entro la data
	attenzione
	consultare le istruzioni d'uso



Ed. 01 - 07/2022

PRODUTTORE



FAR

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

tel +39 045 6700870

sito web <http://www.farddiag.com>

e-mail: order@farddiag.com

e-mail: farddiag@farddiag.com