

AAP

DETERMINAZIONE COLORIMETRICA DELL'AAP SU URINA

Solo per uso diagnostico in vitro

12 x 6 ml

REF CY01-72

PRINCIPIO

L'alanina aminopeptidasi (AAP) nell'urina è un marker precoce di danno della membrana (brush border) delle cellule del tubulo prossimale nelle tubulopatie renali e interstiziali, rigetto di rene trapiantato.

L'AAP catalizza l'idrolisi dell'alanina-p-nitroanilide ad alanina e p-nitroanilina. La p-nitroanilina liberata è proporzionale all'attività enzimatica e viene determinata colorimetricamente.

REAGENTI

Composizione del kit: **REF** CY01-72 **Quantità**

REAGENTE 1 (liofilizzato) **CY01-72R1** **12 flaconi**
L-alanina-p-nitroanilide 14.8 mmol/L
Tampone pH 7.1 80 mmol/L
Stabilizzanti e conservanti

STABILITÀ: a 2-8°C e ben chiusi si conservano inalterati fino alla data riportata sulla confezione.

PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO:

Ricostituire il contenuto di un flacone di Reagente 1 con 6.2 ml di acqua distillata. Agitare delicatamente fino a completa solubilizzazione.

STABILITÀ: 48 ore a 2-8°C al riparo dalla luce.

CAMPIONE

Urina.

STABILITÀ: 10 giorni a 2-8°C. Non congelare.

PROCEDIMENTO MANUALE

Lunghezza d'onda: spettrofotometro 405 nm (400-420 nm)
(Filtro Hg 405 nm)

Cammino ottico: 1 cm

Lettura: contro aria o acqua distillata

Temperatura: 37°C

Tempo di incubazione: 30 minuti (nella nota 6 è descritto il metodo di determinazione cinetico)

Linearità: fino a 50 U/L

Campione/reagente: 1/20

Pipettare in provette o cuvette contraddistinte:

	Campione	Bianco Reagente
Reagente di lavoro	1000 µl	1000 µl

Dopo averli portati a 37°C, aggiungere mescolando con cura:

Campione	50 µl	-
Soluzione fisiologica	-	50 µl

Misurare l'assorbanza del campione (Ac1) e del bianco reagente (Ar1). Dopo 30 minuti esatti dalla prima lettura misurare l'assorbanza del campione (Ac2) e del bianco reagente (Ar2).

Calcolare la differenza di assorbanza del campione $\Delta Ac = Ac2 - Ac1$ e del bianco reagente $\Delta Ar = Ar2 - Ar1$.

CALCOLO

Attività AAP in (U/L) = $(\Delta Ac - \Delta Ar) \times 71$

Per attività superiori a 50 U/L diluire un volume di campione con 9 volumi di soluzione fisiologica, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato per 10.

Attività per mg di creatinina (in mU/mg di creatinina) = $(U/L \times 100) / \text{mg di creatinina per } 100 \text{ ml}$.

Per valutare l'escrezione urinaria di AAP per minuto determinare l'attività su un campione di urina raccolto per un periodo di tempo definito (es. 240 minuti). Moltiplicando il valore dell'attività del campione espressa in U/L per il volume, in millilitri, dell'urina raccolta e dividendo per i minuti di raccolta si ottengono le mU di AAP escrete per minuto.

VALORI DI RIFERIMENTO

MEDIA \pm DS

Concentrazione: 10,8 \pm 3,8 U/L
8,1 \pm 2,5 mU/mg di creatinina

Velocità di escrezione:

maschi 8,4 \pm 2,0 mU/min
femmine 7,4 \pm 1,9 mU/min

OSSERVAZIONI

- Per eliminare eventuali torbidezze centrifugare il campione a 3000 x g per 5 minuti circa.
- Se le determinazioni non possono essere effettuate a 405 nm o con cuvette di 1 cm di cammino ottico deve essere costruita una curva di taratura con p-nitroanilina.
- È in genere sufficiente determinare un solo bianco reagente per ogni serie di prove; se i valori ottenuti risultano riproducibili la sua determinazione può venire effettuata saltuariamente.
- Sono stati descritti nelle urine inibitori a basso peso molecolare che possono venire allontanati per dialisi o per filtrazione su gel. Le condizioni impiegate nel saggio sono state ottimizzate per ridurre l'azione ed utilizzare urine non dializzate.
- Il pH dell'urina e la presenza di proteasi hanno una notevole influenza sulla stabilità degli enzimi urinari. L'AAP è più stabile da pH 5 a 8. Pertanto può risultare conveniente correggere il pH delle urine fortemente acide o alcaline.

6. Metodo cinetico:

Preriscaldare il Reagente 1 a 37°C prima dell'uso.

Pipettare in cuvetta o provetta contraddistinta:

	Campione	Bianco Reagente
Reagente 1	1000 µl	1000 µl
Campione	50 µl	-
Sol. fisiologica	-	50 µl

Mescolare accuratamente, incubare a 37°C e leggere l'assorbanza a 405 nm dopo circa 1 minuto. Ripetere la misura dopo 1, 2 e 3 minuti esatti dalla prima lettura. Calcolare il valore medio ΔA per minuto per il campione e per il bianco reagente ($\Delta Ac/min$ e $\Delta Ar/min$).

Per calcolare l'attività di AAP utilizzare la seguente formula:

Attività AAP in (U/L) = $(\Delta Ac - \Delta Ar) \times 2130$.

Per attività superiori a 170 U/L diluire un volume di campione con 4 volumi di soluzione fisiologica, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato per 5.

- È opportuno che ciascun laboratorio determini i propri valori normali.

BIBLIOGRAFIA

- Roger Gibey. et al. Clin. Chim. Acta 116 (1981) 25-34.
- R.G. Price. Toxicology. 23 (1982) 99-134.

SMALTIMENTO

Il prodotto deve essere utilizzato all'interno di analisi professionali.

Il prodotto va smaltito in conformità alla regolamentazione nazionale e o internazionale.

PRECAUZIONI

Il reagente può contenere componenti non reattivi e conservanti di varia natura. A scopo cautelativo è comunque opportuno evitare il contatto con la pelle e l'ingestione. Utilizzare le normali precauzioni previste per il comportamento in laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

- Roger Gibey. et al. Clin. Chim. Acta 116 (1981) 25-34.
- R.G. Price. Toxicology. 23 (1982) 99-134.

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

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