

5 – HIAA

Determinazione Cromatografico – Colorimetrica dell'Acido 5-Idrossi-3-Indolacetico (5-HIAA) e della Serotonina nelle Urine

20 test

REF KR07-20

USO PREVISTO

Kit per la determinazione quantitativa *in vitro* dell'Acido 5-Idrossi-3-Indolacetico e della Serotonina nelle urine.

PRINCIPIO DI REAZIONE

I prodotti finali del metabolismo del triptofano vengono adsorbiti su una resina neutra. Dopo lavaggio delle sostanze interferenti, vengono eluiti insieme la serotonina (5HT), il 5-idrossi-triptofano (5HTP) e l'acido 5-idrossi-3-indolacetico (5-HIAA). La concentrazione di questi metaboliti viene determinata per via fotometrica per mezzo dei prodotti formati nella reazione con 1-nitroso-2-naftolo.

REAGENTI E COLONNE

Composizione del kit:

REAGENT 1 Acido cloridrico	1 x 95 ml
*REAGENT 2 Ammonio idrato	1 x 40 ml
*REAGENT 3 Acido solforico diluito	1 x 25 ml
*REAGENT 4 1-nitroso-2-naftolo	1 x 25 ml
REAGENT 5 Sodio nitrito	1 x 2 ml
*REAGENT 6 1,2-dicloroetano	1 x 65 ml

ATTENZIONE: conservare ben chiuso

STANDARD di serotonina 20 mg/L 1 x 5 ml

COLUMN Colonne cromatografiche 20

(*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le Schede di sicurezza.

STABILITA': i reagenti e i materiali sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

STRUMENTAZIONE NECESSARIA E NON FORNITA

Spettrofotometro o fotometro a filtri (540 nm), centrifuga.

CAMPIONE

Urine delle 24 ore.

Raccogliere le urine delle 24 ore in un recipiente con 2-3 ml di acido cloridrico concentrato e controllare che il valore del pH sia inferiore a 6.

Mescolare le urine, misurarne il volume e conservarle a 2-8°C.

STABILITA': circa 5 giorni a 2-8°C e a pH < 6.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda	540 nm
Temperatura:	ambiente
Metodo:	colorimetrico endpoint
Linearità:	50 mg/L
Sensibilità:	0.1 mg/L
Recupero:	98±2 %
C.V. (intra-assay):	3 %
C.V. (inter-assay):	4 %

PREPARAZIONE DELLA COLONNA

Portare le colonne a temperatura ambiente prima di utilizzarle nel test. Agitare e capovolgere le colonne fino ad ottenere una completa risospensione della resina, quindi lasciarle per alcuni minuti in posizione verticale consentendo alla resina di sedimentare nuovamente. Togliere il tappo superiore e quindi spezzare la lancetta di chiusura inferiore. Lasciare defluire completamente il liquido.

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Portare i reagenti e i campioni a temperatura ambiente prima di utilizzarli nel test.

Pipettare delicatamente in una colonna:

Reagent 1	1.0 ml	scartare l'eluato
Urine	1.0 ml	scartare l'eluato

Pipettare delicatamente, riprendendo gli eventuali residui di urina depositati sulle pareti della colonna:

Reagent 1	1.0 ml	scartare l'eluato
-----------	--------	-------------------

Pipettare quindi:

Reagent 1	2.5 ml	raccogliere l'ELUATO 1
Reagent 2	0.5 ml	scartare l'eluato
Reagent 2	1.0 ml	raccogliere l'ELUATO 2

Mescolare con cura i due eluati raccolti mantenendoli separati.

REAZIONE COLORIMETRICA

Pipettare in provette da centrifuga:

	Campione		Standard	Bianco
	5HT+5HTP	5-HIAA		
ELUATO 1	1.0 ml	---	---	---
ELUATO 2	---	1.0 ml	---	---
Standard	---	---	0.250 ml	---
Reagent 2	---	---	0.750 ml	1.0 ml
Reagent 3	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reagent 4	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Reagent 5	1 goccia (25 µl)	1goccia (25µl)	1 goccia (25 µl)	1 goccia (25 µl)

Mescolare con molta cura. Attendere 10 minuti a temperatura ambiente, quindi pipettare:

Reagent 6	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
-----------	--------	--------	--------	--------

Agitare su vortex per 10 secondi e centrifugare per 2 minuti a 3000 rpm. Leggere l'assorbanza del supernatante dei campioni (Ac) e dello standard (Ast) a 540 nm (510-570 nm) azzerando contro il bianco.

UTILIZZARE CUVETTE DA 1 ML.

CALCOLO

5-HIAA

$$5\text{-HIAA (mg/L)} = (Ac / Ast) \times 5.5$$

5HT + 5HTP

$$\text{Serotonina (mg/L)} = (Ac / Ast) \times 12.5$$

Per calcolare l'escrezione nelle 24 ore moltiplicare i valori ottenuti per il volume delle urine espresso in litri.

VALORI DI RIFERIMENTO

5-HIAA: 2 - 10 mg/24 ore

5HT + 5HTP: 0 - 5 mg/24 ore

OSSERVAZIONI

- Farmaci come aspirina, fenacetina, acetanilide, clorpromazina danno interferenza positiva; così anche farmaci come la reserpina che provocano liberazione di serotonina. I derivati fenotiazinici inibiscono invece la reazione. Tali farmaci non devono essere somministrati nelle 72 ore precedenti il prelievo delle urine. Per lo stesso periodo di tempo occorre eliminare dalla dieta le banane che, per l'elevato contenuto in triptofano darebbero interferenza positiva, così pure le noci e i pomodori
- Se il supernatante non fosse completamente limpido dopo la centrifugazione, trasferirlo in un'altra provetta da centrifuga contenente una punta di spatola di sodio solfato anidro, agitare bene e centrifugare o lasciare sedimentare.
- Valori di 5-HIAA compresi tra 10 e 100 mg/24 ore si possono avere in caso di trombosi ed emorragia; sono invece superiori a 100 mg/24 ore (fino a 2000 mg) nell'argentaffinoma e nel carcinoma maligno. In pazienti con tumori non metastatizzati i valori possono essere normali. Sono invece lievemente aumentati in caso di carcinomi polmonari. Il test è molto utile in esami preliminari su casi sospetti: finora non sono note false positività.
- Si consiglia l'utilizzo di cuvette in vetro/quarzo da 1 ml.
- Si raccomanda di determinare ogni volta l'ELUATO 1 e l'ELUATO 2. Il 5-HIAA nella maggior parte dei casi aumenta notevolmente in pazienti con tumori metastatizzati, tuttavia talvolta può esservi notevole aumento di 5HTP e 5HT; in tali casi la risposta del test sarà sempre positiva e i valori saranno sempre più alti dei valori normali

BIBLIOGRAFIA

1. B.L. Goodwin, C.R.J. Ruthven, M.W. Weg and M. Sandler - Clin. Chim. Acta, 62 (1975) -439-442



Edizione 01 - Otrr 2021



Prodotto da: FAR srl

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

Tel. +39 045 6700870 - Fax +39 045 7157763

sito web: <http://www.farddiag.com> e-mail: farddiag@farddiag.com