



ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΑΒΑΑ-31, έκδοση 1η

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Προσδιορισμός ουρίας σε πλάσμα, ορό ή ούρα με εργαστηριακή μέθοδο

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Η ουρία είναι οργανική ένωση που παράγεται από τον καταβολισμό των πρωτεϊνών ή από την αμμωνία στον κύκλο της ουρίας, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποβολή του αζώτου από τον οργανισμό. Η συγκέντρωση της ουρίας στον ορό (όπως και εκείνη της κρεατινίνης) αποτελεί δείκτη της νεφρικής λειτουργίας. Η ουρία εμφανίζει αυξημένη συγκέντρωση στον ορό και στα ούρα μετά από διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες. Επίσης, εμφανίζει αυξημένη συγκέντρωση στον ορό σε παθολογικές καταστάσεις που αφορούν τη νεφρική λειτουργία.

Η μέθοδος στην οποία βασίζεται η μέτρηση της ουρίας είναι κινητική, δηλαδή μετράμε τη μεταβολή της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε ορισμένο χρόνο. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, μετράμε την μείωση του NADH, η οποία οφείλεται σε δύο αντιδράσεις: την υδρόλυση της ουρίας προς αμμώνιο και διοξείδιο του άνθρακα με την καταλυτική δράση της ουρίασης και την επακόλουθη αντίδραση του αμμωνίου με α -κετογλουταρικό οξύ και NADH προς γλουταμικό οξύ και NAD⁺ με την καταλυτική δράση της αφυδρογονάσης του γλουταμικού οξέος. Η συγκέντρωση της ουρίας είναι ανάλογη της μείωσης της συγκέντρωσης του NADH, η οποία μετρείται φασματοφωτομετρικά στα 340 nm.

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΑ ΠΡΟΣΩΠΑ

Αναλυτής/-ρια

ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Πιπέτα	Των 10-100 μ L
2	Πιπέτα	Των 100-1000 μ L
3	Φασματοφωτόμετρο	Unico 4802 UV/VIS Double Beam
4	Κυκλομεικτης	Vortex-Genie 2
5	Γυάλινες ή πλαστικές κυψελίδες	Semi-micro
6	Στατώ για φιαλίδια erpendorf	
7	Στατώ για σωληνάρια RIA	
8	Γενικά εργαστηριακά σκεύη	Για την παρασκευή του διαλύματος εργασίας
9	Φόρμες καταγραφής αποτελεσμάτων	Έντυπες ή σε υπολογιστή

ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

A/α	Είδος	Λεπτομέρειες
1	Αποσταγμένο νερό	
2	Σωληνάρια RIA	Των 3 mL
3	Φιαλίδια erpendorf	Του 1,5 mL
4	Ρύγχη πιπέτας	Κίτρινα, των 10-200 μ L
5	Ρύγχη πιπέτας	Μπλε, των 100-1000 μ L
6	Γάντια	Εξεταστικά, μιας χρήσης (μέγεθος ανάλογα με τον/την χειριστή/-ρια)
7	Κιτ ουρίας	Sprinreact. Αποθήκευση στο ψυγείο (4 °C).
8	Ουρία	Πρότυπη ουσία
9	Δοχείο απόρριψης βιολογικών υλικών	

ΒΗΜΑΤΑ

Όλα τα βήματα πραγματοποιούνται από τον/την αναλυτή/-ρια.

A/α	Τίτλος	Ενέργειες
1	Προετοιμασία εξοπλισμού	Οργανώνει τον χώρο εργασίας και τοποθετεί αριθμημένα σωληνάρια RIA (δύο για κάθε δείγμα και δύο για το πρότυπο) σε στατώ.
2	Προετοιμασία ανάλυσης	Βγάζει τα δείγματα πλάσματος, ορού ή ούρων από τον καταψύκτη και το κιτ από το ψυγείο και τα αφήνει να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
3	Προετοιμασία φασματοφωτόμετρου	Ενεργοποιεί το φασματοφωτόμετρο πατώντας το κουπί ON, που βρίσκεται πίσω κάτω δεξιά. Αφήνει το όργανο να προθερμανθεί και, στο άκουσμα του ήχου ειδοποίησης, πατάει Yes για βαθμονόμηση.
4	Παρασκευή αντιδραστήριου εργασίας	Αναμειγνύει το αντιδραστήριο R2 του κιτ μέσα στο αντιδραστήριο R1, αποφεύγοντας να κάνει αφρό.
5	Παρασκευή πρότυπου διαλύματος ουρίας	Ζυγίζει με ακρίβεια στον αναλυτικό ζυγό περίπου 40 mg ουρίας και τα διαλύει σε 100 mL αποσταγμένου νερού για να παρασκευάσει πρότυπο διάλυμα (συγκέντρωσης περίπου 40 mg/dL).
6	Παρασκευή δειγμάτων προς μέτρηση	Για κάθε δείγμα πλάσματος ή ορού προς ανάλυση, τοποθετεί σε καθένα από 2 σωληνάρια RIA 1200 μ L R1 + R2 και 12 μ L δείγματος, με διαφορετικά ρύγχη και πολλαπλές αναρροφήσεις μέσα στο διάλυμα. Για κάθε δείγμα ούρων, αφού πραγματοποιήσει αρραίωση 1/50 (10 μ L ούρων + 490 μ L αποσταγμένου νερού), τοποθετεί σε καθένα από 2 σωληνάρια RIA 1200 μ L R1 + R2 και 12 μ L αραιωμένων ούρων με τον ίδιο όπως παραπάνω τρόπο.
7	Ανάδευση	Αναδεύει όλα τα σωληνάρια RIA στον κυκλομεικτή.
8	Ρύθμιση παραμέτρων φασματοφωτόμετρου	Στο φασματοφωτόμετρο επιλέγει 1 (Basic mode) και enter, στη συνέχεια set λ 340 nm και enter.
9	Τοποθέτηση δειγμάτων στο φασματοφωτόμετρο	Μεταφέρει διαδοχικά τα πρότυπα και τα δείγματα σε κυψελίδες, τις οποίες τοποθετεί κατά σειρά στο καρουζέλ του φασματοφωτόμετρου. Κλείνει καλά το καπάκι του διαμερίσματος δειγμάτων.
11	Μέτρηση δειγμάτων	Πιέζοντας τα πλήκτρα CELL, [αριθμός] και enter, φέρνει διαδοχικά τα δείγματα στη θέση ανάγνωσης και σημειώνει την απορρόφησή τους. Επαναλαμβάνει την ίδια διαδικασία 4 λεπτά αργότερα. Αν τα δείγματα είναι πολλά, αδειάζει τις κυψελίδες σε δοχείο απόρριψης βιολογικών υλικών και τις γεμίζει με νέα δείγματα.
12	Υπολογισμός συγκέντρωσης ουρίας	Υπολογίζει τη μεταβολή της απορρόφησης προτύπων και δειγμάτων και εξάγει τους μέσους όρους για το πρότυπο και τα δείγματα. Υπολογίζει τη συγκέντρωση ουρίας σε κάθε δείγμα πολλαπλασιάζοντας τον μέσο όρο της μεταβολής της απορρόφησης του με τη συγκέντρωση του προτύπου και διαιρώντας με τον μέσο όρο της μεταβολής της απορρόφησης του προτύπου. Για τα δείγματα ούρων πολλαπλασιάζει αυτό το αποτέλεσμα επί 50.
12	Συμμάζεμα	Μετά το τέλος της μέτρησης όλων των δειγμάτων, απορρίπτει όσα υλικά δεν χρειάζονται ή ήταν μιας χρήσης, πλένει τα σκεύη που χρησιμοποίησε και αποθηκεύει τα βιολογικά δείγματα στον καταψύκτη και το κιτ στο ψυγείο. Τέλος, τοποθετεί στη θέση του ό,τι μεταχειρίστηκε.

Δημιουργήθηκε από	Χριστίνα Καρπούζη, Ιωάννη Κοσμίδη
Ελέγχθηκε από	Βασίλη Μούγιο
Ημερομηνία	28 Ιουνίου 2021