



kód 11022 40 testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 15-30°C
Reagenty pro měření koncentrace Metanefrinů Pouze pro laboratorní <i>in vitro</i> diagnostiku

METANEFRINY

Chromatografie-spektrofotometrie
Pisano

PRINCIP METODY

Metanefriny jsou zachyceny na katexu - pryskyřici a jsou eluovány ihned po odstranění interferujících částic. Metanefriny se stanovují spektrofotometricky jako vanilin po oxidaci jodistanem v alkalickém prostředí¹.

OBSAH A SLOŽENÍ

- Reagent 1.** 1 x 225 ml. Imidazolový pufr 0,4 mol/L, sodný EDTA 2,7 mmol/L, konzervant.
- Reagent 2.** 1 x 400 ml. Amoniak 4 mol/L.
Dráždivý (Xi): R36/37/38: Dráždivý pro oči, dýchací cesty a pokožku. S26: V případě kontaktu s očima, vypláchněte je neprodleně pod tekoucí vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. S36/37/39: Používejte ochranný oděv, rukavice, brýle nebo štít. S45: V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte lékařskou pomoc.
- Mikrokolony** 2 x 20 kusů. Obsahují navážené množství pufovaného katexu- pryskyřice.
- Reagent .** 2 pro 10 ml. m-Jodistan sodný prach 0,12 mol/L po rozpuštění.
Oxidující (O):R8 Při kontaktu s hořlavými materiály může způsobit požár.
- C. Reagent.** 2 pro 10 ml. Siřičitan sodný prach 0,67 mol/l – po rozpuštění.
Škodlivý (Xn):R 22: Škodlivý při požití - Nepipetujte ústy. R 31: Při kontaktu s kyselinami vyvíjí toxické plyny. R 41: Riziko vážného poškození očí. S 26: V případě zasažení očí nebo poříšněné pokožky, omyjte postižené místo pod tekoucí vodou a vyhledejte neprodleně lékařské ošetření. S 39: Používejte ochranné brýle nebo štít. S 46: V případě požití vyhledejte lékařské ošetření.
- S. Standard S.** 2 x 5 ml. Normetanefrin 100 mg/L = 550 μmol/L v kyselině HCl 0,1 mol/L. Vodný primární standard.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při teplotě 15-30°C. Reagenty a standard jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, pokud jsou těsně uzavřené a je zabráněno jejich kontaminaci během jejich použití.
Známky zhoršení kvality:
Reagencie: přítomnost částic, zákal, absorbance blanku větší jak 0,060 při 360 nm v 1 cm kvjetě.
Mikrokolony: ztráta (nepřítomnost) pufru nad pryskyřici.

PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

Koncentrovaná kyselina chlorovodíková HCl (kvalita p.a.).

PŘÍPRAVA REAGENTŮ

Reagenty B a C: Rozpusťte obsah lahvičky (suchý prach) v 10 ml destilované vody. Roztok je stabilní 5 měsíců při 2-8°C.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 360 nm (358-362)
- Termostabilní vodní lázeň

VZORKY

Moč sebraná ke stanovení za 24 h standardním způsobem (skladovaná při 2-8°C). Vzorek je stabilní maximálně 15 dní při 2-8°C, nebo až 1 měsíc při -20°C, jestliže je upraveno pH vzorku koncentrovanou HCl pod pH=3. Před testováním vzorek centrifugujte nebo přefiltrujte.

POSTUP

Příprava vzorku

- Pipetujte do zkumavky: 5 ml vzorku
- Upravte pH na 0,7- 0,9 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Před testováním vzorek centrifugujte nebo přefiltrujte.
- Inkubujte vzorek 20 min. ve vařící vodní lázni. Ochlaďte pod tekoucí vodou. Pak přidejte: reagent (1) v množství 5 ml (pozn 1):

Chromatografická separace (Poznámka 2):

- Nejdříve odstraňte horní uzávěr mikrokolony (3), poté uzávěr její spodní části. Zatlačte horní disk, který uzavírá pryskyřici tupým předmětem (skleněnou tyčinkou) těsně nad její povrch. Nestlačte pryskyřici! Kapalnu nad pryskyřici nechejte prokapat přes spodní uzávěr.
- Obsah zkumavky (vzorek) přelijte do kolony a prokapejte jej.
- Promyjte zkumavku 2-3 ml destilované vody a obsah přelijte do kolony. Prokapejte jej.
- Do kolony přidejte:

Destilovaná voda	10,0 mL	Ponechte volně odtékat ven
Reagent (2)	7,5 mL	zachytíte eluát

- Promíchejte eluát (Poznámka 2)

Kolorimetrie

- Pipetujte do označených zkumavek:

	Reagent Blank	Standard Blank	Standard	Vzorek Blank	Vzorek
Eluát	—	—	—	—	2 mL
Standard (S)	—	0,1 mL	0,1 mL	—	—
Reagent (2)	2 mL	1,9 mL	1,9 mL	—	—
Reagent (C)	—	0,05 mL	—	0,05 mL	—

- Promíchejte a přidejte:

Reagent (B)	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL	0,05 mL
-------------	---------	---------	---------	---------	---------

- Promíchejte, ponechte 2 minuty stát při pokojové teplotě (15-30°C). Pak přidejte:

Reagent (C)	0,05 mL	—	0,05 mL	—	0,05 mL
-------------	---------	---	---------	---	---------

- Promíchejte a odečtěte absorbanci (A) vzorku blanku, vzorku a standardu proti reagent blanku při 360 nm. Absorbance je stabilní nejméně po dobu 60 minut.

VÝPOČET

Koncentrace metanefrinů ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank vzorku}}}{A_{\text{standardu}} - A_{\text{blank standardu}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{SIC}}}{V_{\text{EC}}} \times C_{\text{St}} \times \frac{1}{R_{\text{EC}}} = C_{\text{vzorku}}$$

Objem vzorku (V_S) je 5 ml, objem eluátu (V_E) 7,5 ml, objem eluátu při kolorimetrickém stanovení (V_{EC}) je 2 ml, objem standardu při kolorimetrickém stanovení (V_{SIC}) je 0,1 ml, koncentrace standardu (C_{St}) je 100 mg/L nebo 550 μmol/L a průměrná výtěžnost (R_{EC}) = 0,98. Následující rovnice uvádí výpočet koncentrace:

$\frac{A_{\text{vzorku}} - A_{\text{blank vzorku}}}{A_{\text{standardu}} - A_{\text{blank standardu}}}$	$\times 7,65 = \text{mg/L metanefrinů}$
	$\times 42,1 = \text{μmol/L metanefrinů}$

Množství metanefrinů ve 24 h vzorku moči se vypočítá podle obecného vzorce:

mg/l metanefrinů	$\times V_{\text{moče/24h}} (\text{L}) = \text{mg metanefrinů/24h}$
μmol/l metanefrinů	$\times V_{\text{moče/24h}} (\text{L}) = \text{μmol metanefrinů/24h}$

NORMÁLNÍ HODNOTY

Moč²: do 1 mg/24 h = do 5,5 μmol/24 h. Tyto hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit své vlastní srovnávací hodnoty.

KONTROLA KVALITY:

Pro ověření správnosti měření se doporučuje použít močová kontrola (kat.č. 18036 nebo 18037). Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Detekční limit: 0,2 mg / l = 1,1 μmol/L
- Linearita: Do 30,9 mg/L = 170 μmol/L
- Opakovatelnost (jednoho vzorku)

Průměrná koncentrace	CV	n
0,3 mg / L = 1,5 μmol/l	9,8 %	25
3,8 mg / L = 21,2 μmol/l	5,6 %	25

- Reprodukovatelnost

Průměrná koncentrace	CV	n
0,3 mg / L = 1,5 μmol/l	14,8 %	25
3,8 mg / L = 21,2 μmol/l	10,0 %	25

- Citlivost: 63,8 mA . l/mg = 11,6 mA . l/μmol
- Správnost: Výsledky získané těmito reagenty neukazují systematické rozdíly srovnatelné s teoretickými koncentracemi. Studie jsou na vyžádání k dispozici.
- Interference: Některé potravinové doplňky, substance a léky mohou interferovat⁴.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Metanefriny a normetanfriny označované jako metanefriny jsou močovým metabolickým produktem z katecholaminového katabolického děje. Zvýšené hodnoty metanefrinů jsou způsobeny vylučováním katecholaminů z tumorových chromafinových buněk, jako jsou: pheochromocytomy, paragangliomy a neuroblastomy^{4,5,6}. Klinická diagnóza by však neměla být uzavřena jen na základě tohoto výsledku, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní výsledky.

POZNÁMKY

- Poznámka 1. V případě koncentrovaných extrémně kyselých vzorků moče je nezbytné adjustovat pH na 5,7-7,0 hydroxidem sodným 1mol/l.
- Poznámka 2. Dlouhé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení jejich průtoku. Pro obnovu této funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut, aby se pryskyřice přespala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a nechejte jí usadit.
- Poznámka 3. Pracujte neprodleně s kolorimetrií, protože metanefriny nejsou stabilní při pH eluátu.

LITERATURA

- Pisano J. A simple analysis for normetanephrine and metanephrine in urine. *Clin. Chim. Acta* 1960; 5: 406-414.
- Pesce J.A. and Kaplan L.A. Methods in Clinical Chemistry. C.V. Mosby Co, 1987.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical lab. tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.
- Witteles et al. Sensitivity of Diagnostic and Localization Tests for Pheochromocytoma in Clinical Practice. *Arch. Intern. Med.* 2000; 160:2521-2524.
- Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 2.1.2011

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem. Více informací naleznete na internetové adrese: www.biosystems-sa.com nebo na adrese výhradního distributora pro ČR: www.iktrading.cz