

Kód 11010	40 testů
Skladování při 2 - 30°C	
Reagenty pro měření koncentrace kyseliny 5-hydroxyindolactové. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.	

Kyselina 5-hydroxyindol octová (5-HIAA)



Kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIAA) chromatografie

PRINCIP METODY

Produkty tryptofanového metabolismu ve vzorku jsou zachyceny neutrální pryskyřicí. Serotonin (5-HT) a 5-hydroxytryptofan (5-HTP) jsou eluovány společně v první fázi a poté 5-hydroxyindolactová kyselina (5-HIAA). Tyto metabolity jsou kvantitativně stanoveny spektrofotometricky jako komplex vzniklý reakcí s 1-nitroso-2-naftolem^{1,2}.

OBSAH A SLOŽENÍ

- Reagent.** 1 x 500 mL. Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/L.
- Reagent.** 1 x 200 mL. Amoniak 20 mmol/L.
- Mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují přesně navážené množství pufované neutrální pryskyřice.
- A. Reagent.** 1 x 100 mL. Kyselina sírová 1 mol/L.
Varování : **H315** – Dráždí kůži.**H319** – Způsobuje vážné podráždění očí.**P305 + P351 + P338** – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.**P332 + P313** – Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
- B. Reagent.** 1 x 100 mL. 1-Nitroso-2-naftol 6 mmol/L, etanol 99%.
Nebezpečí : **H225** – Vysoce hořlavá kapalina a páry.
P420 – Skladujte odděleně od ostatních materiálů.
- C. Reagent.** 1 x 5 mL. Dusitan sodný 0,7 mol/L.
Varování : **H302** – Zdraví škodlivý při požití.**H411** – Toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.**P330** – Vypláchněte ústa.**P301 + P312** – PŘI POŽITÍ: Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO
P391 – Uniklý produkt seberte.
- D. Reagent.** 1 x 280 mL. Dichlorethan.
Nebezpečí : **H225** – Vysoce hořlavá kapalina a páry.**H302** – Zdraví škodlivý při požití.**H315** – Dráždí kůži. **H319** – Způsobuje vážné podráždění očí.**H335** – Může způsobit podráždění dýchacích cest.**H350** – Může vyvolat rakovinu **P210** – Chraňte před teplem/jiskrami/otevřeným plamenem/horkými povrchy. – Zákaz kouření. **P261** – Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů.
P305 + P351 + P338 – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.**P308 + P313** – PŘI expozici nebo podezření na ni: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. **P420** – Skladujte odděleně od ostatních materiálů.
- S. Standard.** 1 x 20 mL. Serotonin 46,1 mg/L ekvivalentní 50 mg/L = 261 μmol/L 5-HIAA, Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/L, stabilizátor. Vodný primární standard.

Pro další varování a bezpečnostní opatření čtěte bezpečnostní list (SDS)

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 2-30°C. Reagenty a standard jsou stabilní do data expirace uvedeného na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Reagenty: Přítomnost sraženiny, zákalu, absorbance reagent blanku nad 0,060 při 540 nm (1 cm kyvetě).
- Mikrokolony: Nepřítomnost pufru nad krycím diskem pryskyřice.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 540 nm (510-570)
- Stolní centrifuga

VZORKY

Moč. 24 hodinový vzorek odebraný standardním postupem, který byl uchován při 2-8°C a stanoven do 24 h od odběru. Vzorek může být skladován maximálně 15 dní při 2-8°C, nebo 1 měsíc při -20°C, jestliže bylo upraveno pH na 3-6 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vzorek před testováním odstředte nebo zfiltrujte.

POSTUP

Chromatografická separace

- Odstraňte jako první horní uzávěr (3) a poté spodní uzávěr kolony. Pomocí okrouhlého konce pipety zatlačte horní filtr směrem dolů k povrchu pryskyřice tak, abyste ji příliš nestlačili. Ponechte kapalinu volně protékat kolonou ven. (Pozn.1)
- Přidejte do kolony:

Reagent (1)	2,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Vzorek	2,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Reagent(1)(Pozn.2)	10,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Reagent (2)	1,0 mL	Ponechte volně protékat ven

- Kolonu umístěte nad centrifugační šroubovací zkumavku (o objemu 10 ml) a pipetujte:

Reagent (2)	2,0 mL	Sbírejte eluát
-------------	--------	----------------

- Pořádně promíchejte.

Kolorimetrie

- Pipetujte do označené 10 mL šroubovací centrifugační zkumavky:

	Blank	Standard	Vzorek
	—	—	Eluát
Reagent (2)	2,0 mL	1,5 mL	—
Standard (S)	—	0,5 mL	—
Reagent (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reagent (B)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reagent (C)	1 kapka	1 kapka	1 kapka

- Pořádně promíchejte a ponechte 10 minut stát v klidu při pokojové teplotě (15-30°C), pak přidejte:

Reagent (D)	3,0 mL	3,0 mL	3,0 mL
-------------	--------	--------	--------

- Uzavřené zkumavky 10 sekund pořádně promíchej na mixeru a pak 2 minuty centrifugujte při 3000 ot./min.
- Odečtěte absorbance (A) vrchní fáze vzorku a standardu proti blanku při 540 nm.(Poznámka 3)

VÝPOČET

Koncentrace 17-OH ve vzorku se vypočítá:

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

Objem vzorku (V_S) je 2 mL, objem eluátu (V_E) je 2 mL, objem eluátu při kolorimetrii (V_{EC}) je 2 mL, objem Standardu při kolorimetrii (V_{SIC}) je 0,5 mL, koncentrace Standardu (C_{St}) je 50 mg/L nebo 261 μmol/L a průměrná výtěžnost (R_{EC}) je 0,87. Následující vzorec je pro výpočet koncentrace:

$\frac{A_{\text{vzorku}}}{A_{\text{standardu}}}$	x 14,4 = mg/L 5-HIAA
	x 75,1 = μmol/L 5-HIAA

Množství 5-HIAA ve 24 h vzorku moče se vypočítá:

mg/L	x V _{Moče/24 h} (L) =	mg/24 h
μmol/L		μmol/24 h

Kód 11010	40 testů
Skladování při 2 - 30°C	
Reagenty pro měření koncentrace kyseliny 5-hydroxyindolactové. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích.	

Kyselina 5-hydroxyindol octová (5-HIAA)



Kyselina 5-hydroxyindolactová (5-HIAA) chromatografie

REFERENČNÍ HODNOTY

Moč³: 2 - 6 mg/24-h = 10,4 – 31,2 μmol/24h

Tyto hodnoty³ jsou pouze orientační; Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní normální rozmezí.

KONTROLA KVALITY

Pro ověření správnosti měření se doporučuje použít Kontrolní moč (kód. 18036 a 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: 0,9 mg/L = 4,9 μmol/L.
- Linearita: 200 mg/L = 1050 μmol/L. Při vyšších hodnotách zředte vzorek 1/2 destilovanou vodou a opakujte měření.

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Průměrná koncentrace	CV	n
1,5 mg/L = 8,1 μmol/L	5,2 %	25
12,9 mg/L = 67,9 μmol/L	3,6 %	25

- Reprodukovatelnost (run to run):

Průměrná koncentrace	CV	n
1,5 mg/L = 8,1 μmol/L	7,7 %	25
12,9 mg/L = 67,9 μmol/L	7,2 %	25

- Citlivost: : 11,98 mA-L/mg = 2,29 mA-L/μmol.
- Správnost: Výsledky získané touto soupravou nevykazovaly systematické rozdíly při porovnání teoretickými hodnotami. Podrobnosti o porovnávací zkoušce jsou k dispozici na vyžádání.
- Interference: Některé potraviny, jako jsou banány, ananasy, avokáda, kiwi, švestky, rajčata, vlašské ořechy a čokoláda zvyšují vylučování 5-HIAA. Proto by se neměly jíst 3-4 dny před odběrem vzorku.. Léky a další látky mohou interferovat⁴.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

5-hydroxyindolactová kyselina (5-HIAA) je konečným produktem tryptofanového metabolismu a je vylučována močí. Je výsledkem stálé oxidativní deaminace serotoninu (5-hydroxytryptaminu). Serotonin, silný stimulant hladkého svalu je produkován ve velkém množství karcinoidními tumory a tak vysoké hladiny 5-HIAA se nacházejí v moči pacientů s těmito tumory^{3,5}. Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKY

- Někdy se ve vrtvě pryskyřice mohou objevit tmavé částice. Jejich výskyt neovlivňuje stanovení.
- Volitelné vymytí serotoninu:** (získaný výsledek bude pouze orientační).
Po aplikaci vzorku pipetujte do kolony:

Reagent (1)	4,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Reagent (1)	6,0 mL	Sbírejte eluát

Chromatografická separace může pokračovat přidáním reagentu 2 (pro získání 5-HIAA eluátu).

Protřepejte eluát (obsahující serotonin a 5-hydroxytryptofan), napipetujte 2 ml do 10 ml centrifugační zkumavky se šroubovacím víčkem a pokračujte kolorimetrií tak, jak je popsáno pro stanovení 5-HIAA.

Koncentrace Serotonin+ 5-hydroxytryptofanu se vypočítá podle vzorce:

A vzorku	x 45,4 = mg/L Serotoninu
A standardu	x 258 = μmol/L Serotoninu

- Jestliže se v horní fázi eluátu objeví zákal, odstraňte tuto část, přidejte kousek bezvodého síranu sodného, protřepejte a odstředte.
- Pozn. distributora: **Pozn. distributora:** Dlouhodobé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení průtoku kapaliny přes pryskyřici. Pro obnovu funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechejte usadit.

LITERATURA

- Udenfriend S, Titus E, Weissbach H. The identification of 5-hydroxy-3-indoleacetic acid in normal urine and a method for its assay. *J Biol Chem* 1955; 216:499-505.
- Contractor SF. A rapid quantitative method for the estimation of 5-hydroxyindoleacetic acid in human urine. *Biochem Pharm* 1966; 15:1701-1706.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, WB Saunders Co, 2005.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4rd ed. AACC Press, 2001.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 25.7.2016.

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme přezkontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí. Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: www.biosystems-sa.com.

Český návod je k dispozici na: www.jktrading.cz

Výhradní distributor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5, tel.: +420 257 220 760
SK : JK-Trading spol.s.r.o., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava, tel.: + 421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

ČR : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK, tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02
SK : Toxikologické informačné centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166