



Kyselina 5-hydroxyindolactová (5- HIAA)



| | | |
|---|-----------|---|
| Kód 11010 | 40 testov | Kyselina 5- hydroxyindolactová Chromatografia - spektrofotometria |
| Skladovanie pri 2 - 30°C | | |
| Reagenty pre meranie koncentrácie kyseliny 5-hydroxyindolactovej Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku | | |

PRINCÍP METÓDY

Produkty tryptofanového metabolizmu vo vzorke sú zachytené neutrálnou živicou. Serotonín (5-HT) a 5- hydroxytryptofan (5-HTP) sú spoločne eluované v prvej fáze, potom nasleduje kyselina 5 – hydroxyindolactová. Tieto metabolity sa stanovujú kvantitatívne spektrofotometricky ako komplex, ktorý vznikol reakciou s 1–nitrozo-2-naftolom^{1,2}.

OBSAH A ZLOŽENIE

- 1. Reagent.** 1X500 ml. Kyselina chlorovodíková 0,1mol/l.
- 2. Reagent.** 1X200 ml. Amoniak 20 mmol/l.
- 3. Mikrokolóny.** 2X20. Obsahujú presne navážené množstvo pufovej neutrálnej živice.

A. Reagent . 1X100ml. Kyselina sírová 1mol/l.

Výstraha :

H315 – Dráždi kožu

H319 – Spôsobuje vážne podráždenie očí

Upozornenie :

P305 + P351+ P338 - Po zasiahnutí očí : Niekoľko minút ich opatrne oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P332 + P313 – Ak sa objaví podráždenie pokožky :

Vyhľadajte lekársku pomoc/ošetrovanie.

B. Reagent. 1X100ml. 1-nitrozo-2-naftol 6ml/l, etanol 99%.

Výstraha :

H225 – Veľmi horľavá kvapalina a pary

Upozornenie :

P420 – Skladujte oddelene od ostatných materiálov.

C. Reagent. 1X5ml. Dusitan sodný 0,7mol/l.

Výstraha :

H302 – Zdraviu škodlivý pri požití

H411 – Jedovatý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami

Upozornenie :

P330 – Vypláchnite ústa

P301 + P312 – Pri požití : Ak sa necítite dobre, volajte

Toxikologické informačné stredisko

P391 – Uniknutý produkt odstráňte

D.Reagent. 1X280ml. Dichlóretán.

Výstraha :

H225 – Veľmi horľavá kvapalina a pary

H302 – Zdraviu škodlivý pri požití

H315 – Dráždi kožu

H319 – Spôsobuje vážne podráždenie očí

H335 – Môže spôsobiť podráždenie dýchacích ciest

H350 - Môže vyvolať rakovinu

Upozornenie :

P210 - Chráňte pred teplom/iskrami/otvoreným palmeňom /horúcimi povrchmi. Zákaz fajčenia.

P261 – Zabráňte vdychovaniu prachu/dymu/plynu/hmly/pár/ aerosólov

P305 + P351+ P338 - Po zasiahnutí očí : Niekoľko minút ich opatrne oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

P308 +P313 – Pri expozícii alebo podozrení na ňu :

Vyhľadajte lekársku pomoc/ošetrovanie.

P420 – Skladujte oddelene od ostatných materiálov.

S.Štandard. 1X20ml. Serotonín 46,1mg/l ekvivalentný 50mg/l = 261 µmol/l 5-HIAA, kyselina chlorovodíková 0,1mol/l, stabilizátor. Vodný primárny štandard.
Ďalšie varovania a upozornenia – viď bezpečnostný list.

SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 30°C.

Reagenty a štandard sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu používania.

Príznačky zhoršenia kvality :

- Reagenty : Prítomnosť zrazeniny, zákalu , absorbancia blanku nad 0,060 pri 540nm (1cm kvjeta)
- Mikrokolóny : neprítomnosť pufru nad krycím diskom živice.

PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- Spektrofotometer alebo fotometer s filtrom 540nm (510 – 570)
- Stolná centrifúga

VZORKY

Moč. 24 hodinové vzorky odobrané štandardným spôsobom. Udržujte pri 2-8°C a použite do 24 hodín. Vzorky môžu byť skladované pri 2-8°C po dobu max. 15 dní, alebo pri -20°C po dobu 1 mesiaca pri pH upravenom na hodnotu 3 – 6 pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Pred testovaním vzorku odstredte alebo prefiltrujte.

POSTUP

Chromatografická separácia

1. Najprv odstráňte horný uzáver kolóny (3), potom uzáver v jej spodnej časti. Pomocou okrúhleho konca pipety zatlačte horný filter smerom dole k povrchu živice tak, aby ste ju príliš nestlačili. Všetku kvapalinu nechajte voľne vytečť von. (Poznámka1).
2. Do kolóny pridajte :

| | | |
|-------------------------|--------|---------------------------|
| Reagent (1) | 2,0 ml | nechajte voľne vytečť von |
| Vzorka | 2,0 ml | nechajte voľne vytečť von |
| Reagent (1) (Poznámka2) | 10 ml | nechajte voľne vytečť von |
| Reagent (2) | 1,0 ml | nechajte voľne vytečť von |

3. Kolónu umiestnite nad uzavierateľnú 10 ml skúmavku a pipetujte :

| | | |
|-------------|--------|----------------|
| Reagent (2) | 2,0 ml | Zachyťte eluát |
|-------------|--------|----------------|

4. Eluát dôkladne zamiešajte.



Kyselina 5-hydroxyindoloctová (5- HIAA)



| | | |
|---|-----------|---|
| Kód 11010 | 40 testov | Kyselina 5- hydroxyindoloctová Chromatografia - spektrofotometria |
| Skladovanie pri 2 - 30°C | | |
| Reagenty pre meranie koncentrácie kyseliny 5-hydroxyindoloctovej Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku | | |

Kolorimetria

5. Pipetujte do označenej 10 ml uzavierateľnej skúmavky :

| | blank | štandard | vzorka |
|--------------|----------|----------|----------|
| | | | eluát |
| Reagent (2) | 2,0 ml | 1,5 ml | - |
| Štandard (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 kvapka | 1 kvapka | 1 kvapka |

6. Poriadne premiešajte a nechajte v kľude 10 minút stáť pri izbovej teplote (15 – 30°C), potom pridajte :

| | | | |
|-------------|-------|-------|-------|
| Reagent (D) | 3,0ml | 3,0ml | 3,0ml |
|-------------|-------|-------|-------|

7. Uzatvorené skúmavky 10 sekúnd mixujte v mixéri a potom centrifugujte 2 minúty pri 3000 ot/min.

8. Odčítajte absorbancie (A) vrchnej fázy vzorky a štandardu oproti blanku pri 540nm. (Poznámka 3)

VÝPOČET

Koncentrácia 5- HIAA vo vzorke sa vypočíta :

$$\frac{A_{\text{vzorky}}}{A_{\text{štandardu}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{šic}}}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{R_{\text{EC}}} \times C_{\text{šic}} = C_{\text{vzorky}}$$

Objem vzorky (V_S) je 2ml, objem eluátu (V_E) je 2ml, objem eluátu pri kolorimetrii (V_{EC}) je 2 ml, objem štandardu pri kolorimetrii (V_{šic}) je 0,5ml, koncentrácia štandardu (C_{šic}) je 50mg/l alebo 261 μmol/l a priemerná výťažnosť (R_{EC}) je 0,87. Nasledujúci vzorec slúži pre výpočet koncentrácie :

| | |
|-------------|------------------------|
| A vzorky | x 14,4 = mg/l 5- HIAA |
| A štandardu | x 75,1 = μmol/l 5-HIAA |

Množstvo 5-HIAA v 24 hodinovej vzorke moči sa vypočíta :

| | | |
|--------|-------------------|------------|
| mg/l | x V moča/24 h (L) | mg/24 h |
| μmol/l | | μmol/ 24 h |

REFERENČNÉ HODNOTY

Moč³: 2 – 6 mg/24 h = 10,4 – 31,2 μmol/24 h . Tieto hodnoty³ sú iba orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoje vlastné, normálne rozmedzie.

KONTROLA KVALITY

Pre overenie správnosti merania sa odporúča použiť Kontrolný moč (kód 18036 a 18037). Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- detekčný limit : 0,9mg/l = 4,9 μmol/l
- linearita : 200mg/l = 1050 μmol/l ; pri vyšších hodnotách vzorku nariedte na 1/2 destilovanou vodou a meranie opakujte.
- opakovateľnosť (jednej vzorky) :

| Priemerná koncentrácia | CV | n |
|------------------------|------|----|
| 1,5mg/l = 8,1 μmol/l | 5,2% | 25 |
| 12,9mg/l = 67,9 μmol/l | 3,6% | 25 |

- reprodukovateľnosť (run to run) :

| Priemerná koncentrácia | CV | n |
|------------------------|------|----|
| 1,5mg/l = 8,1 μmol/l | 7,7% | 25 |
| 12,9mg/l = 67,9 μmol/l | 7,2% | 25 |

- citlivosť : 11,98 mA.L/mg = 2,29 mA.L/μmol

- správnosť : výsledky získané touto súpravou pri porovnaní s teoretickými hodnotami nevykazovali systematické rozdiely. Podrobnosti o porovnávacej skúške sú k dispozícii na vyžiadanie .

- interferencie : niektoré potraviny, ako sú banány, ananásy, avokáda, kiwi, slivky, paradajky, vlašské orechy a čokoláda zvyšujú vylučovanie 5- HIAA, preto by sa nemali jesť 3 – 4 dni pred odberom. Interferovať môžu aj niektoré lieky a ďalšie látky⁴.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Kyselina 5- hydroxyindoloctová je konečným produktom tryptofanového metabolizmu a vylučuje sa močom. Je výsledkom stálej oxidatívnej deaminácie serotonínu (5- hydroxytryptaminu). Serotonín, silný stimulant hladkého svalstva, je produkováný vo veľkom množstve karcinoidnými tumorami a preto sa vysoké hladiny 5-HIAA nachádzajú v moči pacientov, ktorí majú tieto tumory.^{3,5} Klinická diagnóza by



Kyselina 5-hydroxyindoloctová (5- HIAA)



| | | |
|---|-----------|---|
| Kód 11010 | 40 testov | Kyselina 5- hydroxyindoloctová Chromatografia - spektrofotometria |
| Skladovanie pri 2 - 30°C | | |
| Reagenty pre meranie koncentrácie kyseliny 5-hydroxyindoloctovej Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku | | |

nemala byť stanovená len na základe výsledku jediného testu, je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

POZNÁMKY

- Niekedy sa vo vrstve živice môžu objaviť tmavé častice. Ich výskyt výsledok stanovenia neovplyvní.
- Volitelné vymytie serotonínu (získaný výsledok bude iba orientačný) :
Po aplikácii vzorky pipetujte do kolóny :

| | | |
|-------------|-------|------------------------------|
| Reagent (1) | 4,0ml | Ponechajte voľne vytiecť von |
| Reagent (1) | 6,0ml | Zachyťte eluát |

Pre získanie 5-HIAA eluátu môže chromatografická separácia pokračovať pridaním Reagentu (2) . Eluát obsahujúci serotonín a 5-hydroxytryptofán pretrepte a napipetujte 2ml do 10ml centrifugačnej uzavierateľnej skúmavky a pokračujte kolorimetrickým stanovením tak, ako je to popísané pre stanovenie 5-HIAA. Koncentrácia serotonínu+ 5-hydroxytryptofanu sa vypočíta podľa vzorca :

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| A vzorky | x 45,4 = mg/l serotonínu |
| A štandardu | x 258 = μmol/l serotonínu |

- V prípade, že sa v hornej fáze eluátu objaví zákal, odstráňte túto časť, pridajte trochu bezvodého síranu sodného, pretrepte a odstredte.
- Poznámka distribútora : Dlhodobé skladovanie kolón vedie k utlačeniu živice, čím sa spomalí prietok kvapaliny cez túto živicu. Pre obnovu funkcie obráťte kolónu pred stanovením tak, aby sa živica presypala a ponechajte tak cca 10 minút. Potom kolónu umiestnite do pracovnej polohy a živicu nechajte usadiť.

LITERATÚRA

- 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, 4th ed. AACC Press, 2001.

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 25.7.2016.

Vzhľadom k možnej inovácii výrobku sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese www.biosystems-sa.com. Slovenský návod je k dispozícii na www.jktrading.cz

Výhradný distribútor:

ČR : JK-Trading spol.s.r.o., Křivaticová 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 prípade mimoriadnych udalostí:

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