



ŽLUČOVÉ KYSELINY

(Katalogové číslo 450-A)

Použití:

Reagencie firmy Trinity Biotech Žlučové kyseliny jsou určeny ke kvantitativnímu enzymatickému stanovení žlučových kyselin v séru při 530 nm.

Shrnutí:

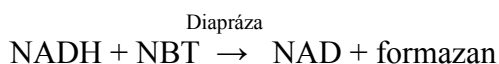
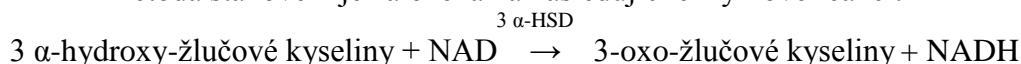
Žlučové kyseliny jsou přítomny v mnoha tělních tekutinách, nejvyšší koncentrace se nacházejí ve žluči¹. Hlavní žlučovou kyselinou je kyselina cholová, chenodeoxycholová kyselina, deoxycholová kyselina a lithocholová kyselina². Žlučové kyseliny, po konjugaci s glycinem nebo taurinem, někdy s glukuronidem nebo estery sulfátu, jsou vylučovány do žluče a prochází enterohepatální cirkulací. Sérové žlučové kyseliny pocházejí ze střevní absorpce žlučových kyselin.

Nárůst koncentrace žlučových kyselin v séru na lačno nebo po jídle se považuje za specifický ukazatel poruchy jater³. Klesající hladina indikuje malabsorpci žlučové kyseliny, způsobenou pravděpodobně dysfunkcí ilea⁴.

Koncentraci žlučových kyselin lze stanovit chromatografií⁵, spektrofotometricky⁶⁻⁸, nebo flourometricky⁹. Mohou být stanoveny také radioimunologicky nebo konkurenční vazebnou technikou, stejně tak jako bioluminiscenčními detekčními metodami². Reagencie Žlučové kyseliny od firmy Trinity Biotech měří sérové žlučové kyseliny enzymaticky. Metodika je založena v podstatě na postupu podle Mashige a kol⁷.

Princip:

Metoda stanovení je založena na následující enzymové reakci:



Žlučové kyseliny jsou nejdříve oxidovány na 3-oxo-žlučové kyseliny v reakci katalyzované hydroxysteroid dehydrogenázou (3 α -HSD). V průběhu této oxidační reakce je redukováno ekvimolární množství nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD) na NADH. NADH je následně oxidován na NAD s průvodní redukcí NBT (nitro blue tetrazoliová sůl) na formazan za katalytického působení diaprázy. Formazan má absorbační maximum při 530 nm. Intenzita vzniklého zbarvení je přímo úměrná koncentraci žlučových kyselin ve vzorku.

Reagencie:

Reagencie Žlučové kyseliny, po rozpuštění podle návodu, obsahují přibližně následující koncentrace aktivních složek:

Žlučové kyseliny reagencie A: (katalogové číslo 450-1,16 x 10 ml)

NAD	2,5 mmol/l
NBT	0,61 mmol/l
Diapráza	625 U/L
Pufr	pH 7,0 ± 0,1
Nereaktivní přísady a stabilizátory	

Žlučové kyseliny Reagencie B: (katalogové číslo 450-2, 4 x 5ml)

3 α -HSD	1250 U/L
Nereaktivní přísady a stabilizátory	

Bezpečnostní opatření:

Určeno pro *in vitro* diagnostické použití. Dodržujte běžná bezpečnostní opatření při práci v laboratoři. Odpad likvidujte v souladu platnými předpisy.

Varování: Zabraňte kontaktu a vdechnutí Žlučové kyseliny Reagencie A a B.

Bezpečnostní informace a rizika jsou popsána v bezpečnostním listu.

Následující instrukce musí být dodržovány při otevírání červeného těsnícího víčka, protože má po otevření ostré hrany:

Otevření těsnícího víčka z lavičky by mělo být provedeno např. pomocí pinzety, špičatých kleští, špachtlí atp. Sloupněte těsnění víčko z lahvičky. Při otevírání se ujistěte, že je prováděno směrem ven, pryč od těla.

Latexové rukavice by měly být také použity pro ochranu uživatele.

Příprava:

Rozpusťte Žlučové kyseliny Reagencii A a B v objemu deionizované vody, který je uveden na štítku na lahvičce. Lahvičku uzavřete a opatrně promíchejte převrácením. Netřepat.

Připravte testovací roztok a roztok blanku ze stejného množství Reagencie A. Testovací roztok se připraví smísením 4 ml Reagencie A s 1 ml Reagencie B. Roztok blanku se připraví smísením 4 ml Reagencie A s 1 ml deionizované vody. Pokud jsou reagencie používány na automatických analyzátoch, dodržujte příslušné aplikace pro přípravu reagiencí.

Skladování a stabilita:

Reagencie skladujte v suchu a chladnu (2-8°C). Reagencie jsou stabilní do data expirace uvedeného na štítcích.

Rozpuštěná Reagencie A je stabilní 1 den při teplotě 18-26°C a 1 týden při teplotě 2-8°C.

Rozpuštěná Reagencie B je stabilní 1 den při teplotě 18-26°C a 1 týden při teplotě 2-8°C.

Testovací roztok a roztok blanku jsou stabilní 24 hodin při teplotě 18-26°C nebo 3 dny při teplotě 2-8°C.

Zhoršení kvality:

Rozpuštěné reagencie se nesmí používat, pokud je počáteční absorbance měřená v 1 cm kyvetě proti vodě při 530 nm vyšší než 0,3.

Lahvičky vyhod'te pokud suchá Reagencie A nebo B tvoří koláč z důvodu možné vlhkosti, nejsou úplně rozpuštěny nebo jsou kalné.

Aplikace na analyzátořy:

Aplikace reagentů pro stanovení Źlučových kyselin od firmy Trinity Biotech jsou dostupné pro různé automatické analyzátořy. Prosím kontaktujte servisní středisko firmy Trinity Biotech.

Odběr a příprava vzorků:

Doporučuje se odběr vzorků v souladu s NCCLS dokumentem M29-T2. Nejsou známy metody, které mohou s jistotou zaručit, že vzorek lidské krve nepřenáší infekci. Se všemi krevními deriváty by mělo být zacházeno jako s potenciálně infekčním materiálem.

Pacient musí být přes noc na lačno. Krev odeberte do zkumavek bez antikoagulantů. Vzorky centrifugujte okamžitě po vytvoření sraženiny, abyste získali čisté sérum. Vzorky skladujte při 2-8°C nebo zamrazte na -20°C, pokud se stanovení nebude provádět ten den.

Interferující látky:

Extremně lipemické a ikterické sérum může dávat nesmyslné výsledky. V těchto případech se doporučuje zředit vzorky před analýzou.

Pracovní postup:

Dodaný materiál:

Źlučové kyseliny Reagencie A

Źlučové kyseliny Reagencie B

Dále potřebujete:

Spektrofotometr s temperovaným kyvetovým prostorem, schopný měřit při 530 nm

Kyvety s vhodnými optickými vlastnostmi určené pro měření při 530 nm

Pipetovací zařízení pro přesné dávkování objemů potřebných při stanovení

Źlučové kyseliny - kalibrátor, katalogové číslo 450-100

Źlučové kyseliny – zastavovací reagentie, katalogové číslo 450-3

Postup:

1. Připravte reagentie podle návodu.
2. Nastavte na spektrofotometru vlnovou délku 530 nm a nastavte nulu proti destilované vodě.
3. Zahřejte testovací roztok a roztok blanku na teplotu 37°C.
4. Připravte si sadu označených zkumavek pro kalibrátor, kalibrátorový blank, kontrolu, kontrolní blank, vzorek a vzorkový blank.
5. Napipetujte 0,2 ml kalibrátoru, kontroly nebo vzorku do příslušné zkumavky.
6. V časových intervalech přidejte 0,5 ml testovacího roztoku a roztoku blanku do příslušných zkumavek.
7. Ihned zamíchejte a inkubujte při 37°C, 5 minut.
8. Změřte absorbance všech zkumavek při 530 nm, ve stejných časových intervalech jako v kroku 6.

Poznámka: Nebo zastavte enzymovou reakci přidáním 0,1 ml Źlučové kyseliny Zastavovací roztok (katalogové číslo: 450-3), ve stejných časových intervalech jako v kroku 6. Zbarvení, po zastavení reakce, je stabilní 1 hodinu.

9. Odečtete absorbanci blanku od odpovídajících absorbancí testovacích roztoků. Tím se získá změna absorbance pro Źlučové kyseliny v kalibrátoru, kontrole a vzorku.

10. Stanovení koncentrace žlučových kyselin ($\mu\text{mol/l}$) ve vzorku nebo kontrole je popsáno v kapitole „Výpočty“.

Kalibrace:

Koncentrace žlučových kyselin ve vzorcích může být vypočítána použitím kalibrátoru, katalogové číslo 450-100, nebo odečtením z kalibrační křivky sestavené pomocí sady kalibrátorů, katalogové číslo 450-11. Stanovení žlučových kyselin od firmy Trinity Biotech je lineární do $200 \mu\text{mol/l}$.

Kontroly kvality:

Spolehlivost stanovení by měla být kontrolována pomocí rutinních kontrolních sér s definovanou koncentrací žlučových kyselin, např. Trinity Biotech Žlučové kyseliny Kontrolní set, katalogové číslo 450-22. Stanovené hodnoty koncentrace touto metodou by měly ležet v daném rozmezí kontrol.

Výpočty:

Koncentrace žlučových kyselin ve vzorku se určuje následovně:

$$\text{Koncentrace v séru } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\text{AST} - \text{ASB}}{\text{ACT} - \text{ACB}} \times \text{koncentrace kalibrátoru}$$

Kde:

AST = absorbance vzorku s testovací reagentií

ASB = absorbance vzorku s blankovou reagentií

ACT = absorbance kalibrátoru s testovací reagentií

ACB = absorbance kalibrátoru s blankovou reagentií

Například:

Při stanovení sérového vzorku touto metodou byly naměřeny následující hodnoty:

AST = 0,317

ASB = 0,075

ACT = 0,475

ACB = 0,072

$$\text{Koncentrace v séru } (\mu\text{mol/l}) = \frac{0,317 - 0,075}{0,475 - 0,072} \times 100^* = 60,0$$

*koncentrace kalibrátoru pro žlučové kyseliny ($\mu\text{mol/l}$)

Omezení:

Pomocí této metody lze stanovit množství žlučových kyselin ve vzorku do $200 \mu\text{mol/l}$. Pokud koncentrace překročí lineární rozsah, nutno vzorek naředit v poměru 1:1 fyziologickým roztokem a znovu stanovit. Výsledek se pak musí vynásobit 2.

Očekávané hodnoty:

Očekávané rozmezí bylo stanoveno na $0 - 8,1 \mu\text{mol/l}$. Pro toto stanovení byly použity vzorky od 45 zjevně zdravých dospělých mužů a žen, kteří byli lační přes noc.

Doporučujeme, aby si každá laboratoř stanovila svoje očekávané rozpětí pro její lokální populaci.

Znaky metody:

Porovnání:

Celkem 44 vzorků sér s obsahem žlučových kyselin 1,9 – 125 $\mu\text{mol/l}$ bylo stanoveno touto a podobnou komerčně dostupnou metodou. Porovnáním získaných hodnot koncentrací žlučových kyselin oběma metodami jsme získali korelační koeficient 0,99 a regresní rovnici: $y = 1,02x - 2,5$.

Citlivost:

Změna absorbance o 0,004 odpovídá koncentraci žlučových kyselin 1 $\mu\text{mol/l}$, pokud spektrofotometr běžně používaný v klinické laboratoři měří za správných podmínek.

Přesnost:

Přesnost byla měřena v rámci stanovení a mezi stanoveními:

V rámci stanovení

	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3
Střední hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	7,8	36,2	140,6
SD ($\mu\text{mol/l}$)	0,6	1,3	1,7
CV (%)	7,7	3,7	1,2
Počet stanovení	20	20	20

Mezi stanoveními

	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3
Střední hodnota ($\mu\text{mol/l}$)	6,5	38,3	120,7
SD ($\mu\text{mol/l}$)	0,5	1,4	2,3
CV (%)	8,3	3,5	1,9
Počet stanovení	20	20	20

Firma Trinity Biotech zaručuje, že její výrobky jsou v souladu s informacemi, které jsou obsaženy v tomto dokumentu i s jinými publikacemi firmy Trinity Biotech. Zákazník musí sám rozhodnout o tom zda tento výrobek je vhodný pro jeho konkrétní použití.

Odkazy:

1. Demers LM: Bile Acids. IN Methods of Hormone Radioimmunoassay, 2nd ed. BM Jaffe, HR Behrman, Editors, Academic Press, New York, 1979, p. 595
2. Roda A, Kricka LA, DeLuca M, Hofmann AF: Bioluminescence measurement of primary bile acids using immobilized 7 α -hydroxy-steroid dehydrogenase: Application to serum bile acids. J Lipid Res 23:1354, 1982
3. Gilmore IT, Hofmann AF: Altered drug metabolism and elevated serum bile acids in liver disease: A unified pharmacokinetic explanation. Gastroenterology 78:177, 1980

4. Heubi JE, Balistreri WF, Partin GP, Schubert WK, Suchy FJ: Enterohepatic circulation of bile acids in infants and children with ileal resection. J Lab Clin Med 95:231, 1980
5. VanBerge Henegouwen GP, Ruben A, Brandt KH: Quantitative analysis of bile acids in serum and bile using gas-liquid chromatography. Clin Chim Acta 54:249, 1974
6. Talalay P: Enzymatic Analysis of Steroid Hormones. IN Methods of Biochemical Analysis, Vol 8, D Glick, Editor, Inter-Science, New York, 1960, p. 119
7. Mashige F, Tanaka N, Maki A, Kamei S, Yamanaka M: Direct spectrophotometry of total bile acids in serum, Clin Chem 27:1352, 1981
8. Nicolas JC, Chaintreuil J, Descomps B, Crastes de Paulet A: Enzymatic micros assay of serum bile acids: Increased sensitivity with an enzyme amplification technique. Anal Biochem 103:170, 1980
9. Mashige F, Osuga T, Tanaka N, Yamanaka M: Continuous-flow determination of bile acids in serum and its clinical application. Clin Chem 24:1150, 1978
10. Miller P, Weiss S, Cornell M, Dockery J: Specific 125 I radioimmunos assay of conjugated cholyglycine, a bile acid in serum. Clin Chem 27:1698, 1981

Reagencie, pro stanovení žlučových kyselin:

Souprava:

Katalog. číslo	Název	Množství
450-1	Žlučové kyseliny Reagent A	16 x 10 ml
450-2	Žlučové kyseliny Reagent B	4 x 5 ml

Další nutné reagencie:

Katalog. číslo	Název	Množství
450-100	Žlučové kyseliny Kalibrátor, 100 µmol/l	5 ml
450-3	Žlučové kyseliny Zastavovací roztok	50 ml

Doporučené reagencie:

Katalog. číslo	Název	Množství
450-1-50	Žlučové kyseliny Reagent A	50 ml
450-2-25	Žlučové kyseliny Reagent B	25 ml
450-11	Žlučové kyseliny Kalibrační set (obsahuje 5 hladin kalibrátorů o koncentracích 5, 25, 50, 100 a 200 µmol/l)	5 x 5 ml
450-22	Žlučové kyseliny Kontrolní set (obsahuje 3 x 5 ml normální a vysoké hladiny)	6 x 5 ml

Katalog. Číslo: 450
046-137
Revize: 2003-02

VÝZNAM SYMBOLŮ/ KEY GUIDE TO SYMBOLS/ SIGNIFICATION DES SYMBOLES/ ERLÄUTERUNG DER SYMBOLE/ INTERPRETACIÓN DE LOS SÍMBOLOS/ GUIDA AI SIMBOLI



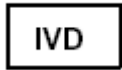
Spotřebujte do
Use by
A utiliser avant le
Verw. bis:
Utilizar antes de
Usar entro.



Šarže
Lot
Lot
Ch.-B.:
Lote
Lotto.



Katalogové číslo
Catalogue number



No. dans le catalogue

Katalognummer

No de catálogo

No. di catalogo.

Výrobce

Manufacturer

Fabricant

Hersteller

Fabricante

Fabbricante

Pro in vitro diagnostiku

For in vitro diagnostic use

Pour usage diagnostique in vitro

in vitro diagnostikum

Para uso diagnóstico in vitro

Per uso diagnostico in vitro

Skladujte při 2-8°C,

Store at 2-8°C,

Conserver à 2-8°C,

Lagern bei 2-8°C,

Conservar a 2-8°C,

Conservare a 2-8°C.

Nahlédněte do přiložených dokumentů

Consult accompanying documents,

Voir documents cijoins,

Siehe beigefügte, Dokumente,

Véanse los documentos djuntos,

vedi documenti allegati.

Výrobce:

**Trinity Biotech plc,
IDA Business Park,
Bray,
Co. Wicklow,
Irsko.**

Tel: (353) 1 276 9800,

Fax: (353) 1 276 9888,

Web: www.trinitybiotech.com

Dotazy v USA:

**Trinity Biotech USA,
1930 Innerbelt Business Center Drive,
St. Louis,
MO 63114,
USA.**

Tel: (001) 800 325 3424