



NÁVOD K POUŽITÍ

CELKOVÁ BÍLKOVINA

600 M

KATALOGOVÉ ČÍSLO 106





SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

POUŽITÍ

Souprava Celková bílkovina 600 M se používá ke kvantitativnímu stanovení koncentrace celkové bílkoviny v moči a mozkomíšním moku na automatických analyzátořech.

SOUHRN

Poškození glomerulárního filtru má za následek průnik většího množství bílkovin do primární moči. Tento stav označujeme jako glomerulární proteinurii. Při mírném poškození najdeme v moči bílkoviny s menší molekulovou hmotností, především albumin a transferin. Tento typ označujeme jako glomerulární proteinurii selektivní, která má při léčbě dobrou prognózu. Pokud je poškození glomerulární membrány většího stupně najdeme v moči kromě albuminu i bílkoviny o větší molekulové hmotnosti, např. i imunoglobuliny. Tento typ označujeme jako glomerulární neselektivní proteinurii. Naděje na úspěšnou léčbu tohoto onemocnění je malá. Při onemocnění tubulárních buněk nemohou být dostatečně vstřebávány mikroproteiny, které prošly zdravým glomerulem. Tuto poruchu označujeme jako tubulární proteinurii, při které v moči nalézáme bílkoviny o menší molekulové hmotnosti, než má albumin. Proteinurie při normální renální funkci může vzniknout při fyziologicky zvýšeném vylučování nebo při tvorbě velkého množství bílkovin o nízké molekulové hmotnosti. Ke zvýšenému vylučování bílkovin dochází v těhotenství a po namáhavém cvičení¹.

PRINCIP METODY

Při vazbě komplexu pyrogallolové červeně s molybdenanem sodným na makromolekuly bílkovin v prostředí jantarového pufru o pH 2,5 dojde k posunu absorpčního maxima z vlnové délky 460 nm – činidlo na vlnovou délku 600 nm – komplex činidla s bílkovinou. Absorbance komplexu činidla s bílkovinou je lineárně závislá na koncentraci bílkoviny v analyzovaném vzorku².



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

SLOŽENÍ SOUPRAVY

1 PUFR	3 x 100 ml:	Kyselina jantarová	100 mmol/l
		Benzoan sodný	6,94 mmol/l
		Molybdenan sodný	0,12 mmol/l
		Šťavelan sodný	2,09 mmol/l
		Detergenty, stabilizátory	
2 CHROMOGEN	3 x 100 ml:	Pyrogallolová červeň	0,14 mmol/l
		Stabilizátory	

PŘÍPRAVA ČINIDEL

1 ČINIDLO a 2 ČINIDLO jsou připraveny k přímému použití.

STABILITA SOUPRAVY

1 ČINIDLO a 2 ČINIDLO jsou při teplotě 2 – 25 °C stabilní až do doby expirace.

POUŽITÝ MATERIÁL

Ke stanovení se obvykle používá sbíraná moč za 24 h bez přídavku konzervačních látek, ale během sběru se uchovává při 4 – 8 °C. Mozkomíšní mok je třeba centrifugovat do jedné hodiny po odběru. Stabilita pro moč: 20 – 25 °C 1 den, 4 – 8 °C 2 dny, -20 °C 1 rok. Mozkomíšní mok: 20 – 25 °C 1 den, 4 – 8 °C 1 týden, -20 °C 1 rok³.

POSTUP ANALÝZY

	VZOREK [μl]	STANDARD [μl]	KONTR. VZOREK [μl]
MOČ, MOK	8	–	–
STANDARD	–	8	–
1. PUFR	150	150	150
2. CHROMOGEN	150	150	150



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

Promíchá se a za 5 minut se změří absorbance standardu A_{St} a vzorku A_{Vz} . Měření se provádí při 600 nm (eventuálně 580 - 620 nm) v 10 mm plastových kyvetách. V případě bichromatického měření se vedlejší vlnová délka nastaví na hodnotu 700 nm.

VÝPOČET

U – celk. bílkovina (g/l) = $c_{St} \times A_T / A_{St}$

c_{St} – konc. celk. bílkoviny ve standardu (g/l)

A_T – absorbance testu

A_{St} – absorbance standardu

KALIBRACE A KONTROLA

Ke kalibraci použijeme komerčně dodávané standardy pro stanovení celkové bílkoviny v moči. Kontrolu provádíme pomocí kontrolních močí dodávaných řadou firem.

REFERENČNÍ INTERVAL

Moč⁴ odpad 0,024 – 0,141 g/d

Moč⁵ 0,200 – 0,500 g/l, hodnoty jsou pouze orientační a nepředstavují referenční interval v pravém slova smyslu.

ZNAKY ANALYTICKÉ METODY

NEPŘESNOST

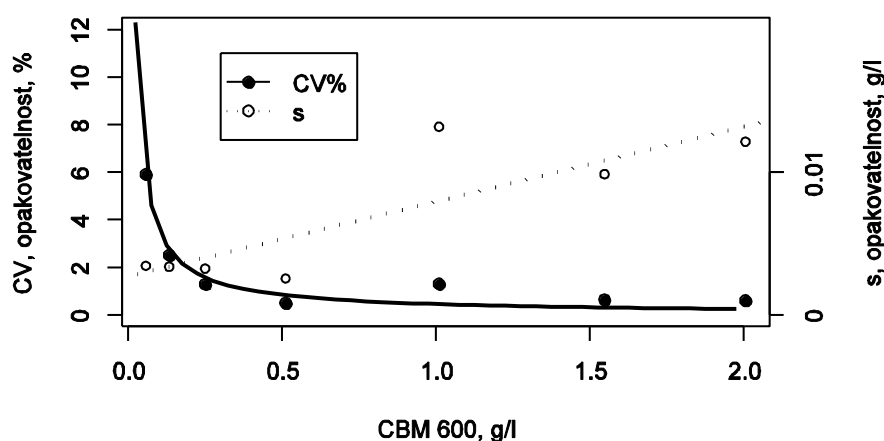
Odhady nepřesnosti v sérii a celkové nepřesnosti byly získány měřením na základě protokolu EP5-A NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)⁶. Celkový počet pozorování byl N=80 u každého vzorku moči. Výsledky v tabulce jsou platné pro měření na analyzátoru Hitachi 911.



Vzorek	Průměr g/l	Směrodatná odchylka				Celková CV%	N
		g/l					
		uvnitř série	mezi sériemi	mezi dny	celková		
Nízký moč. pool	0,099	0,0085	0,0022	0,0019	0,0090	9,0	80
Vysoký moč. pool	0,492	0,0098	0,0068	0,0131	0,0177	3,6	80

PROFIL PŘESNOSTI

Profil přesnosti byl sestaven na základě opakovaného měření vzorků moči patnácti pacientů s koncentrací celkové bílkoviny v rozmezí 0,06 – 2,00 g/l. Zatímco směrodatná odchylka opakovaných stanovení se zvyšuje s rostoucí koncentrací jen velmi mírně (tečkovaná čára), opakovatelnost vyjádřená jako variační koeficient (plná čára) je prakticky konstantní v oblasti 0,1 – 2,0 g/l, strmě narůstá u koncentrací nižších než 0,1 g/l. Výsledky dobře korespondují s odhadnutou mezí stanovitelnosti (0,05 g/l) a přesností zjištěnou v experimentu EP5-A.

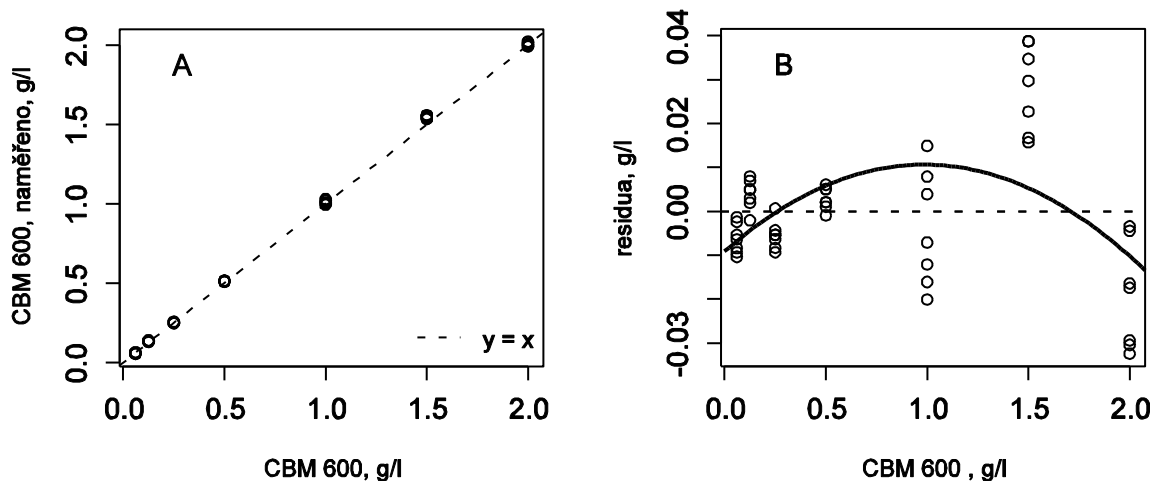


LINEARITA

Linearita stanovení proteinů v moči byla testována ve fyziologicky důležitém rozpětí koncentrací 0,06 – 2,0 g/l. V tomto intervalu korelační koeficient dosahuje hodnoty 0,9998, přímka prochází počátkem. To svědčí o uspokojivém proložení přímky měřenými body⁷.



Odchylky od linearity nejsou ani při hodnocení linearity F-testem rozptýlů na základě vážené lineární regrese ($F_{(5,42)} = 3,47$, $p = 0,08$).



Linearita stanovení proteinu metodou s pyrogallovou červení.

A. Regresní přímka $y = 1,010x - 0,003$, $r = 0,9998$, $s_{y/x} = 0,016$ g/l, $n = 49$.

B. Graf residuí.

F-test rozptýlů na základě vážené lineární regrese nevykazuje odchylky od linearity ($F_{(5,42)} = 3,47$, $p = 0,08$), program⁸. Vážená regrese a odpovídající residua nejsou zobrazeny.

MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny na základě analýzy slepého vzorku (mez detekce = $0 + 3,3 \cdot S_{\text{blanku}}$, mez stanovitelnosti $0 + 10 \cdot S_{\text{blanku}}$, $n = 28$). Mez detekce je 0,02 g/l, mez stanovitelnosti 0,05 g/l.

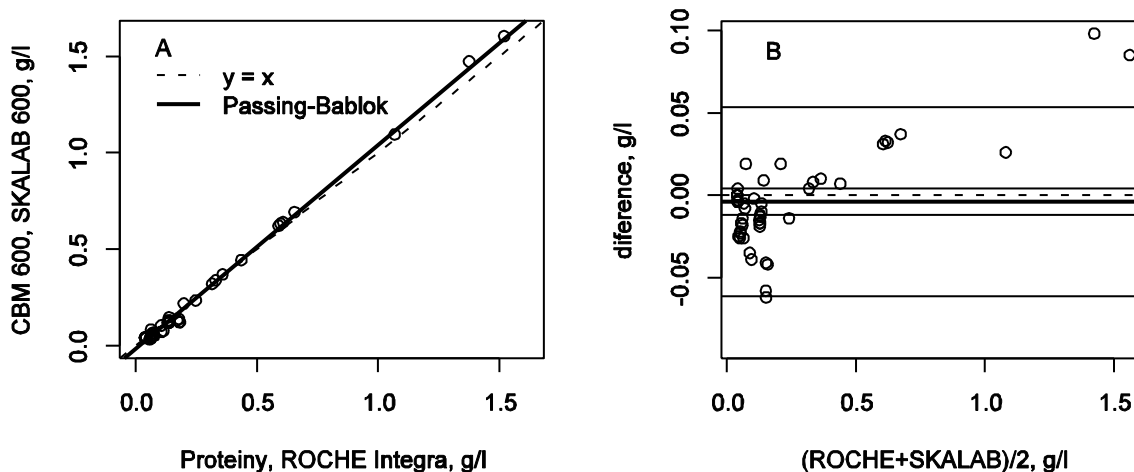
INTERFERENCE

Níže uvedené látky přítomné v moči neinterferují při stanovení celkové bílkoviny až do uvedených koncentrací: kreatinin 26 mmol/l, kyselina močová 18 mmol/l, kyselina citronová 10 mmol/l. Hemoglobin nad 0,25 g/l vykazuje pozitivní interferenci. Seznam látek, které mohou při stanovení celkové bílkoviny v moči interferovat publikoval Young DS⁹.



SROVNÁNÍ S COBAS INTEGROU 400 PLUS

Bylo analyzováno 50 vybraných močí pacientů na analyzátoru firmy *ROCHE Cobas Integra 400 Plus* s použitím diagnostické soupravy *Total Protein Urine/CFS Gen. 3* od stejné firmy. Shodné vzorky byly analyzovány soupravou SKALAB CBM 600 na analyzátoru HITACHI 911. Výsledky srovnání byly statisticky vyhodnoceny neparametrickou metodou podle Passinga-Babloka⁷ a diferenčním grafem. K výpočtu byl použitý program⁸.



Srovnání metody CBM 600 s metodou stanovení celkové bílkoviny ROCHE na INTEGRA 400.

A. Regrese podle Passinga-Babloka. Výsledky výpočtu v následující tabulce.

B. Diferenční graf.

95% interval spolehlivosti směrnice nezahrnuje hodnotu 1,00, rovněž úsek na ose y (-0,016 g/l) je na dané hladině významnosti signifikantní. Při srovnání s metodou Roche je přítomna malá proporcionální, a malá konstantní systematická chyba. Tyto chyby se kompenzují v oblasti koncentrace okolo 0,25 g/l. Výsledky měření potvrzují skutečnost, že jednotlivé frakce bílkovin t.j. albuminy, globuliny a transferin mají různou afinitu při reakci s pyrogallolovou červení, výsledná koncentrace je tedy závislá na složení vzorku. Souprava Roche pracuje na principu denaturace bílkovin u které je příspěvek jednotlivých bílkovin na reakci velmi podobný¹⁰.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

Srovnání metody CBM 600 s metodou stanovení celkové bílkoviny v moči na analyzátoru INTEGRA 400, Roche.

Passingova-Bablokova regrese	n	Směrnice (95% CI)	Intercept (95% CI)	r *
	50	1,056	-0,015	0,959
		(1,015 až - 1,077)	(-0,021 až -0,007)	

* pořadový korelační koeficient

LITERATURA

- Racek J. et al.: *Klinická biochemie*, Galen, Praha, 1999, s. 54-55. ISBN 80-7262-023-1.
- Watanabe N., Kamel S., Ohkubo A., et. al.: Urinary Protein as Measured with a Pyrogallol Red-Molybdate Complex, Manually and in a Hitachi 726 Automated Analyzer. *Clin. Chem.* 1986;32:1551-1554.
- Jabor A., Zámečník M.: *Preanalytická fáze 2005, Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. ČLS JEP a SEKK, Praha 2005, s. 113. ISBN 80-239-5198-X.
- Thomas L. (ed.): *Clinical laboratory diagnostics: use and assesment of clinical laboratory results*. (English). TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main, 1998, s.386, ISBN 3-9805215-4-0.
- Cit. 4, s. 1312
- National Comitée for Clinical Chemistry Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Device; Aprovede Guidline. NCCLS document EP5-A, 1997.
- Passing H., Bablok W.: *A New Biometrical Procedures for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods*. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 1983;21:709-720.
- *A Program for Statistical Analysis in Clinical Biochemistry*. Version 4.2.0. Kristian Linnet, Vibevej 3, DK-8240 Risskov, Denmark, 1997-2001.
- Young DS: *Effect of Drug on Clinical Laboratory Tests*. Third Edition 1990, 3:296-300.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

- Luxton R.W., Patel P., Keir G., Thompson E.J: *A Micro-Method for Measuring total Protein in Cerebrospinal Fluid by Using Benzethonium Chloride in Microtiter Plate Wells.* Clin.Chem. 1989;35:1731-1734.

Datum poslední revize: 14. 4. 2015

Výrobce:



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
Tel.: +420 461 531 163
Mobil: +420 777 176 107, +420 777 324 399
Fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

