

ACIDO trans,trans MUCONICO LIBERO URINARIO in UV – Codice Z23010

BIOCHIMICA

Il dosaggio dell'acido trans,trans-Muconico (t,t-MA) viene da tempo proposto come un marker biologico affidabile e sensibile per il monitoraggio dei lavoratori esposti al benzene.

Il benzene è una sostanza chimica frequentemente presente per es. negli oli minerali e si forma facilmente a seguito di processi di combustione. Esiste pertanto un rischio di inquinamento ambientale molto esteso. I suoi livelli nell'aria possono aumentare facilmente a causa delle emissioni da combustione di carbone e petrolio, da stoccaggio e perdita di benzene, dagli scarichi degli autoveicoli, per evaporazione dai distributori di benzina e inoltre dal momento che il tabacco contiene livelli elevati di benzene, il fumo di sigaretta è un'altra sorgente di benzene nell'aria.

L'esposizione acuta al benzene è causa di sonnolenza, vertigini, senso di stordimento, tachicardia, tremori, stato confusionale e di incoscienza e morte.

Le persone sottoposte a inalazioni di benzene per lunghi periodi (esposizione cronica) possono presentare effetti nocivi di vario genere. E' stato Infatti dimostrato che il benzene ha effetti tossici sul processo di eritropoiesi ed è stato identificato anche come cancerogeno, può portare all'anemia, sanguinamento ed ha effetti dannosi sul sistema immunitario e sugli apparati riproduttivi.

Per quanto riguarda l'effetto cancerogeno, secondo l'Istituto Superiore di Sanità Americano (DHHS) il benzene è conosciuto come un cancerogeno umano. Esposizioni di lungo periodo a relativamente alti livelli di benzene nell'aria causano leucemia e pertanto è importante sottoporre le persone esposte a monitoraggio e controllo periodico del benzene.

Il benzene viene primariamente metabolizzato dal citocromo P-450 a composti fenolici. Il range di conversione metabolica del benzene all'Acido trans-trans-Muconico va dal 2 al 25% e dipende dai livelli di esposizione al benzene. Una volta ossidati, i metaboliti del benzene giocano un ruolo sostanziale nel determinare la tossicità del benzene inducendo o alcalinizzazione del DNA o stress ossidativi i quali determinano i disordini sistemici sopracitati.

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

L' Acido *trans,trans* Muconico viene diluito con un opportuno reagente e, dopo purificazione in colonna clean-up, viene analizzato in HPLC.

Recupero del Metodo : > 97 %

Sensibilità del Metodo : < 20 µg/l

CV% : 5,3%

Indice Biologico di Esposizione – I.B.E. Acido *trans-trans* Muconico (t,t-MA) 500 µg/l
Corrispondenti al valore Medio di Esposizione di 4 ppm di Benzene nell'aria.

Valori accettabili in soggetti non esposti: < 0,3 mg/g creatinina (non fumatori)

Riferimento: G Ital Med Lav Erg 2002;24:3 Suppl

Interferenze metaboliche : Acido Sorbico: circa lo 0,12% dell'acido Sorbico ingerito con il cibo viene trasformato in t,t,-MA.

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a Temperatura Ambiente (≤ 20 °C). Il Calibratore è stabile 36 mesi a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione Diluente, **1 x 100 ml**

Reagente B – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 50 ml**

Reagente C – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 50 ml**

Reagente D – Soluzione di Condizionamento 3, **1 x 50 ml**

Reagente E – Soluzione di Lavaggio 1, **1 x 200 ml**

Reagente F – Soluzione di Lavaggio 2, **1 x 100 ml**

Reagente G – Soluzione Eluente, **1 x 100 ml**

Reagente H – Soluzione Test, **1 x 10 ml** **Stoccare a 2-8 °C**

Reagente I – Soluzione Standard Interno, **1 x 10 ml** **Stoccare a 2-8 °C**

Reagente U – Calibratore liofilo, **1 x 5 ml** **Vedi Avvertenze**

Reagente M – Fase Mobile, **6 x 500 ml**

Colonne clean-up, 100 Pz

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 100 µl
Detector Spettrofotometro UV/VIS $\lambda = 264 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore.
Computer gestionale

Modalità di raccolta delle urine :

Urine di fine turno. Congelare il campione a –20 °C se l'analisi deve essere differita. Si mantiene stabile per oltre 4 settimane.

PROCEDURA PREANALITICA

Preparazione della Soluzione Test a 560 µg/l

In una provetta pipettare :

- 900 µl di Acqua grado HPLC
- 100 µl di **Reagente H** – Sol. Test
- 10 µl di **Reagente I** – Sol. Standard Interno

INIEZIONE :

- Iniettare 100 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia tempi di ritenzione simili a quelli riportati in fig. 1. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico. **Importante :** Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei Campioni, del Calibratore e dei Controlli

Controllare che il pH dei campioni urinari sia maggiore di 5.

Dispensare in provetta :

	Bianco	Campione	Calibratore
Acqua di grado HPLC	200 µl		
Campione		200 µl	
Reagente U – Calibratore			200 µl
Reagente A – Sol. diluente	1000 µl	1000 µl	1000 µl
Reagente I – Sol. Standard Interno	100 µl	100 µl	100 µl

Agitare al vortex per 10 secondi

FASE 2 : Condizionamento delle colonne Clean-up.

Preparare un numero di colonne Clean-up pari al numero dei campioni da analizzare più lo Standard di Calibrazione e gli eventuali Controlli.

- Versare in colonna 0,5 ml di **Reagente B** – Sol. di condizionamento 1 *Non portare a secco !*
- Versare in colonna 0,5 ml di **Reagente C** – Sol. di condizionamento 2 *Non portare a secco !*
- Versare in colonna 0,5 ml di **Reagente D** – Sol. di condizionamento 3 *Non portare a secco !*

Scartare l'eluato

FASE 3 : Caricamento del Campione

- Versare 1,0 ml di campione precedentemente preparato nelle colonne Clean-up e lasciar percolare tutto il liquido di ogni colonna Clean-up, anche con l'ausilio di un vuoto moderato, alla velocità di circa 1 ml/minuto (goccia a goccia).

FASE 4 : Lavaggio

- Lavare con 2 ml di **Reagente E** – Sol. di lavaggio 1 *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato* *Scartare l'eluato*
- Lavare con 1 ml di **Reagente F** – Sol. di lavaggio 2 *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato* *Scartare l'eluato*

FASE 5 : Eluizione

- Eluire con 1,0 ml di **Reagente G** – Sol. eluente *Portare a secco anche con l'ausilio di un vuoto moderato*

Al vortex per 10 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 3 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 100 µl della soluzione nel Cromatografo e attendere la stampa del cromatogramma.

ACIDO trans,trans MUCONICO URINARIO – Avvertenze

REAGENTE H : SOLUZIONE TEST

Ac. trans,trans MUCONICO	5.600 µg/l
--------------------------	------------

REAGENTE U : CALIBRATORE URINARIO LIOFILO- Lot. 005

AC. trans,trans MUCONICO	560,0 µg/l
Modalità d'uso e Ricostituzione: i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 5 ml di H ₂ O grado HPLC e agitare delicatamente per 15 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.	
Conservazione e stabilità : i Calibratori liofilati sono stabili 36 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2–8 °C. Almeno 24 ore a T Ambiente, 7 giorni se conservati a 2–8 °C e 3 mesi a –20 °C una volta ricostituiti. Non usarli dopo la data di scadenza.	
Agitare sempre prima dell'uso.	
Confezionamento : 1 x 5 ml	
Precauzioni : questo calibratore in matrice umana deve essere trattato con cura e considerato come potenzialmente infettivo.	

PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO

λ	264 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	10 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 µ, è tassativo l'uso del Metasaver Precolumn Filter 0.5 µm (1 x 10 pz.) cod. ZA6005.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Reverse Phase GENESIS 4,6 x 150 mm, 4 µ. Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di H ₂ O per HPLC, al flusso di 1,2 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,2 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche a ricircolo di fase. NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase. Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.
--

PULIZIA DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare H ₂ O per 60 minuti e scaricare. Flussare una soluzione di H ₂ O : Metanolo (20 : 80 v/v) per 30 minuti scaricandola. Quando la colonna verrà usata di nuovo far passare 30 ml di H ₂ O prima di condizionarla con la Fase Mobile.

LAVAGGIO AGO INIEZIONE

Lavare con una soluzione di Acqua / Etanolo (80 : 20 v/v).
--

PARAMETRI HPLC

LOOP	100 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 120 bar

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

ATTENUAZIONE	8
--------------	---

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z23016	Calibratore per Acido t,t-Muconico urinario	4 x 5 ml
Z38017	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici-Livello 1	5 x 10 ml
Z38018	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici-Livello 2	5 x 10 ml
Z38019	Controllo multiparametrico per metaboliti di composti tossici organici-Livelli 1 e 2	2 x 5 x 10 ml
ZFM15960E	Colonna Analitica Genesis C 18 (150 x 4,6mm -4 um)	1 PZ
ZA6005	Metasaver Precolumn Filter 0.5 um	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ



ACIDO t,t-MUCONICO

(Cromatogrammi di riferimento)

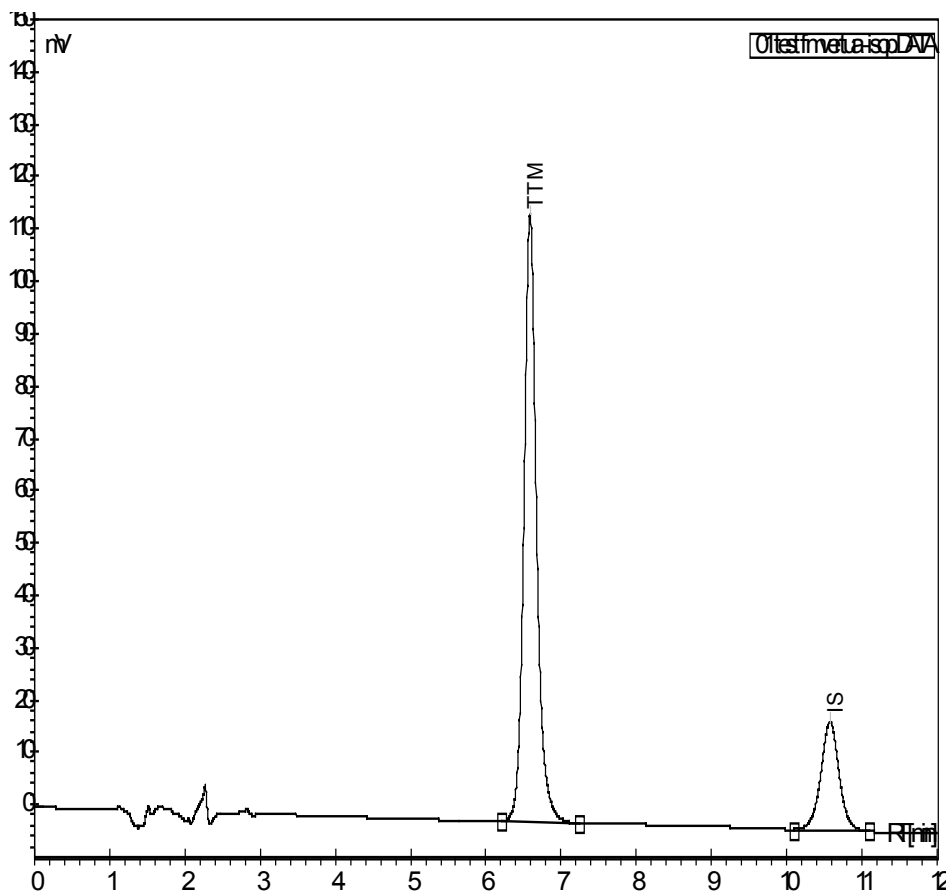


Fig. 1	Soluzione Test
	R.T. 6.80 Ac. t,t-Muconico
	R.T. 10.73 Standard Interno

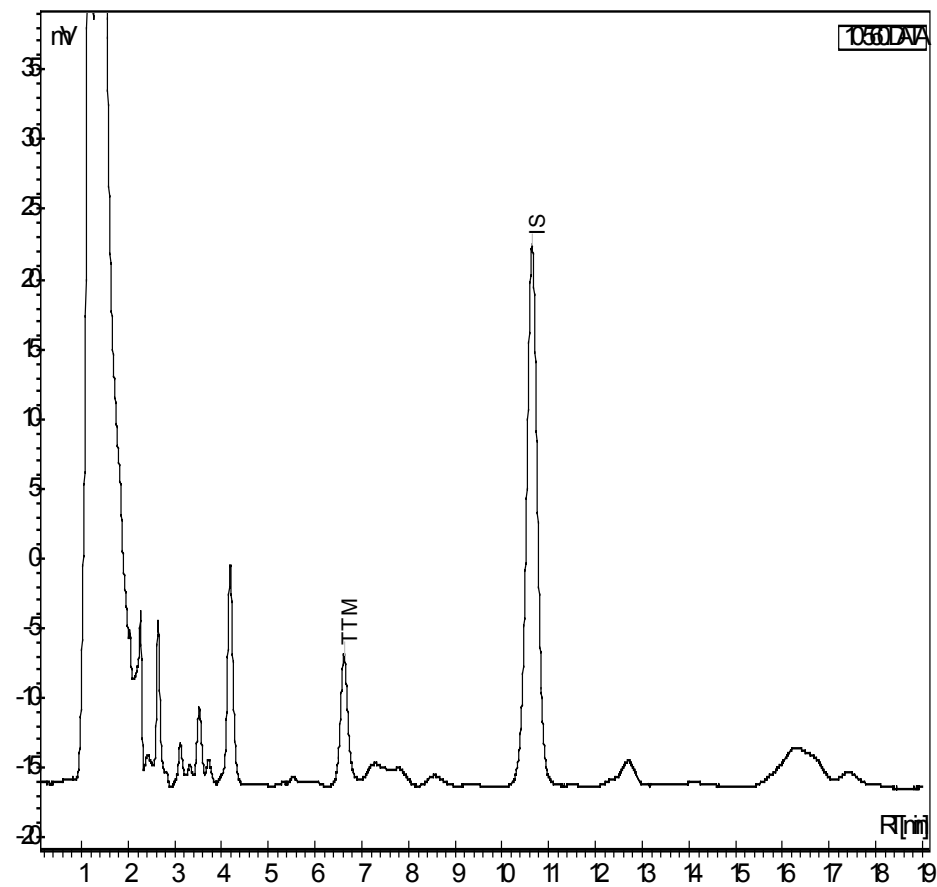


Fig. 2	Calibratore liofilo urinario
	R.T. 6.88 Ac. t,t-Muconico 560 µg/l
	R.T. 10.69 Standard Interno

ACIDO t,t-MUCONICO (Cromatogrammi di riferimento)

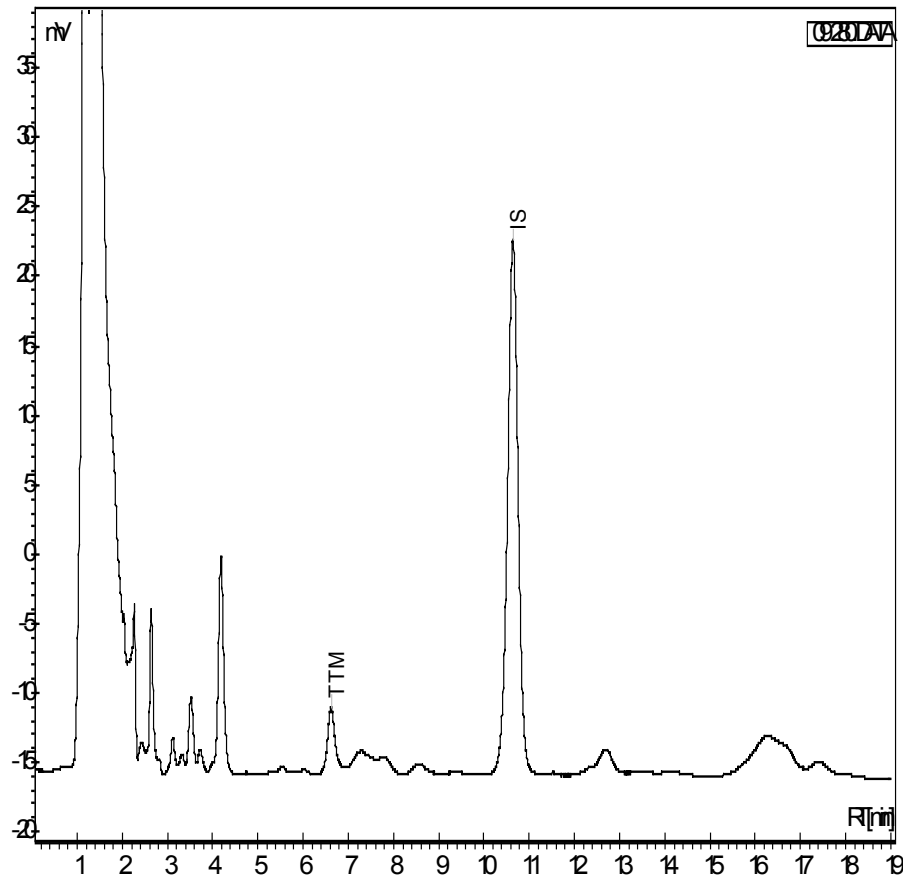


Fig. 3	Controllo liofilo urinario livello 1
	R.T. 6.60 Ac. t,t-Muconico 280 µg/l
	R.T. 10.70 Standard Interno

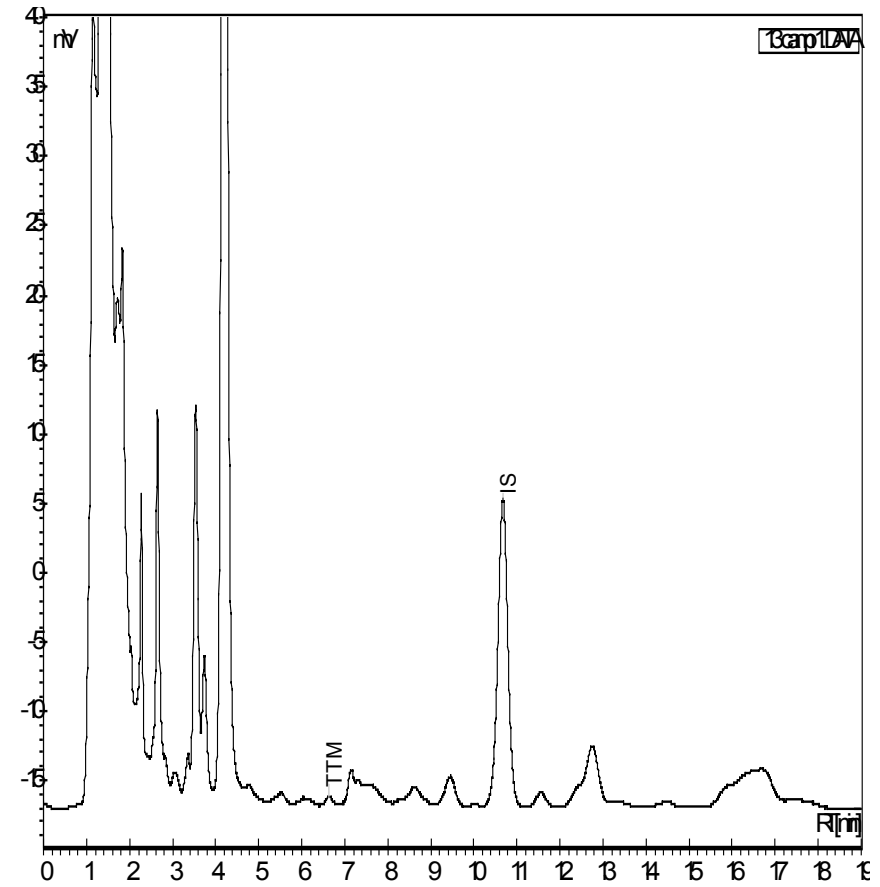


Fig. 4	Campione urinario non patologico
	R.T. 6.70 Ac. t,t-Muconico 24,18 µg/l
	R.T. 10.86 Standard Interno