

**PROTOPORFIRINA IX libera eritrocitaria e ZincoPROTOPORFIRINA
su SANGUE INTERO in FLUORESCENZA - FAST – Codice Z39110**

INTRODUZIONE

La determinazione della ZincoProtoporfirina Eritrocitaria (ZPP-WB) viene usata come test diagnostico per la diagnosi di intossicazione da Piombo.

L'assorbimento di piombo inibisce l'attività dell'enzima eme-sintetasi e questo incrementa la concentrazione di Protoporfirina (PP) nel sangue. La Protoporfirina si lega allo Zinco (Zn^{+2}) formando la Zincoprotoporfirina.

La Zincoprotoporfirina si forma quindi come metabolita in presenza di concentrazioni elevate di Piombo poiché quest'ultimo interferisce con il ruolo della ferrochelatasi nel legame tra Ferro e PP. La concentrazione di ZPP aumenta per intossicazioni da Piombo di durata superiore ai 3 - 4 mesi. Molti ricercatori riportano una correlazione positiva tra la concentrazione di Pb-WB e ZPP-WB quando i lavoratori sono esposti ad alte concentrazioni di Piombo. Per contro, esposizioni a basse concentrazioni di piombo, anche di lunga durata, non sembrano avere effetti sulla concentrazione della ZPP-WB.

Molti sono i metodi in uso per la determinazione della ZPP-WB; il presente metodo permette la determinazione della ZPP-WB con una semplice procedura di estrazione in fase omogenea, senza perciò l'uso di solventi organici immiscibili con l'acqua, e contemporaneamente isola la ZPP-WB da altre porfirine potenzialmente interferenti.

La Protoporfirina IX è un importante precursore di gruppi protesici biologicamente essenziali come l'eme, il citocromo C e le clorofille. Come risultato, un certo numero di organismi sono in grado di sintetizzare questo tetrapirrolo da precursori di base come la glicina e il succinil-CoA, o glutammato. Nonostante la vasta gamma di organismi che sintetizzano la Protoporfirina IX, il processo è in gran parte conservato dai batteri ai mammiferi, con alcune distinte eccezioni nelle piante superiori.

Le porfirie sono un gruppo di disturbi ereditari derivanti da difetti enzimatici nel percorso biosintetico dell'eme. A seconda dell'enzima specifico coinvolto, varie porfirine e i loro precursori si accumulano in diversi tipi di campioni. I modelli di accumulo di porfirina negli eritrociti e nel plasma e l'escrezione dei precursori dell'eme nelle urine e nelle feci permettono di individuare e differenziare le porfirine.

L'analisi della PPIX va eseguita nei pazienti che hanno un sospetto clinico di protoporfiria eritropoietica (EPP) o di protoporfiria dominante X-linked (XLDPP). La presentazione clinica di EPP e XLDPP è identica all'insorgenza di sintomi tipicamente infantili.

La fotosensibilità cutanea nelle aree della pelle esposte al sole peggiora generalmente nei mesi primaverili ed estivi. I sintomi comuni possono includere prurito, edema, eritema, sensazione di bruciore o bruciore, e occasionalmente cicatrici della pelle nelle aree esposte al sole. Anche se di natura genetica, i fattori ambientali aggravano i sintomi, incidendo in modo significativo sulla gravità e sul decorso della malattia.



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com



CE

N° 005		06/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del metodo :

Il presente metodo determina le concentrazioni di **PROTOPORFIRINA IX e ZincoPROTOPORFIRINA su Sangue Intero (WB)**. A 100 µl di WB viene aggiunto lo Standard Interno (50 µl) e un Reagente di precipitazione (600 µl); dopo agitazione al vortex (20 sec.) e 5 minuti in microcentrifuga a 10.000 rpm, si preleva il surnatante. Dopo agitazione al vortex, 20 µl vengono iniettati nell'HPLC

Recupero del Metodo :

circa 98 - 102 %

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

0,2 µg/dl

Minima Concentrazione analizzabile (LLOQ):

0,5 µg/dl

Linearità del Metodo:

0,5 – 10.000 µg/dl

Accuratezza intra serie (errore relativo %) PPIX :

C1	C2
2,5 µg/dl	50 µg/dl
4,79%	1,92%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) PPIX :

Ci	Cs
2,5 µg/dl	50 µg/dl
6,44%	1,94%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) PPIX :

C LLOQ	Cm	Cs
0,5 µg/dl	10 µg/dl	25 µg/dl
3,13%	0,74%	2,51%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) PPIX :

C LLOQ	Cm	Cs
0,5 µg/dl	10 µg/dl	25 µg/dl
5,98%	8,03%	2,13%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. Std

PPIX 0,9990 ± 0,0003

Accuratezza intra serie (errore relativo %) ZnPP :

C1	C2
2,5 µg/dl	50 µg/dl
2,29%	1,66%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) ZnPP :

Ci	Cs
2,5 µg/dl	50 µg/dl
2,68%	4,48%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) ZnPP :

C LLOQ	Cm	Cs
0,5 µg/dl	10 µg/dl	25 µg/dl
2,17%	2,34%	2,85%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) ZnPP :

C LLOQ	Cm	Cs
0,5 µg/dl	10 µg/dl	25 µg/dl
2,90%	4,58%	2,70%

Coefficiente di correlazione R2 + Dev. Std

Znpp 0,9954 ± 0,0039

Range di normalità in soggetti non esposti:

5 - 40 µg/dl ZnPP
8 - 34 µmol ZnPP/mol EME
6 - 15 µg/dl Proto IX

Riferimento:

-Pediatric reference ranges for zinc protoporphyrin *ClinBiochem* 2003 February; 36(1):21-25

-Establishment of normal values in adults for zinc protoporphyrin (ZPP) using hematofluorometer: correlation with normal blood lead values R.S.Suga, A.J. Fischinger & F.W.Knoch Page 637-642

NOTA: ogni laboratorio deve calcolare i propri range sperimentali, relativi a quelli di riferimento

Contenuto della Confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2 – 8 °C.

Reagente A - Soluzione Deproteinizzante, **1 x 70 ml**

Reagente B - Soluzione Standard Interno, **1 x 5 ml**

Reagente L - Soluzione Test ZincoProtoporfirina, **1 x 5 ml**

Reagente N - Soluzione Test Protoporfirina IX, **1 x 5 ml**

Calibratore Liofilo

Codice Z39016 (confezionato separatamente – vedi scheda tecnica)

Reagente M - Fase Mobile, **3 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 20 µl
Detector Fluorimetrico

Per enfatizzare la ZnPP: $\lambda_{ex} = 417 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 635 \text{ nm}$

Per enfatizzare la Proto IX: $\lambda_{ex} = 387 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 633 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore
Computer gestionale

Modalità di prelievo ematico :

Provetta con anticoagulante EDTA o EPARINA

Conservazione del Campione:

Stabile per circa 4 settimane a 2 – 8 °C o 4 mesi a – 20 °C.

PROCEDURA PREANALITICA

In una vial standard, pipettare:

- 900 µl di **Reagente A** – Sol. Deproteinizzante
- 50 µl di **Reagente L** - Sol. Test ZincoProtoporfirina
- 50 µl di **Reagente N** - Sol. Test Protoporfirina IX
- 50 µl di **Reagente B** – Sol. Standard Interno

INIEZIONE :

- Iniettare 20 µl della soluzione nel cromatografo HPLC.

Importante : Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei campioni.

Dispensare in provetta di plastica da 1,5 ml, tipo Eppendorf:

	Calibratore ricostituito secondo scheda tecnica	Controllo L1 ricostituito secondo scheda tecnica	Controllo L2 ricostituito secondo scheda tecnica	Campione
Calibratore ricostituito secondo scheda tecnica	100 µl			
Controllo L1 ricostituito secondo scheda tecnica		100 µl		
Controllo L2 ricostituito secondo scheda tecnica			100 µl	
Campione				100 µl
Reagente B - Standard Interno	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Reagente A - Sol. Deproteinizzante	600 µl	600 µl	600 µl	600 µl

Al vortex per 20 secondi

FASE 2 : Centrifugare a 10.000 rpm per 5 minuti

FASE 3 : Prelevare 400 µl del sovranatante

FASE 4 : Aggiungere 200 µl di H₂O per HPLC

Al vortex per 10 secondi

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

INIEZIONE :

- Iniettare 20 µl nel cromatografo HPLC.

PROTOPORFIRINA IX e ZincoPROTOPORFIRINA su SANGUE INTERO - Avvertenze

REAGENTE L : SOLUZIONE TEST ZincoPROTOPORFIRINA

ZincoPROTOPORFIRINA	Circa 162,4 µg/dl
----------------------------	-------------------

REAGENTE N : SOLUZIONE TEST PROTOPORFIRINA IX

PROTOPORFIRINA IX	Circa 100,0 µg/dl
--------------------------	-------------------

PARAMETRI DEL DETECTOR

λ DI ECCITAZIONE ZnPP	417 nm
λ DI EMISSIONE ZnPP	635 nm
λ DI ECCITAZIONE PROTO IX	387 nm
λ DI EMISSIONE PROTO IX	633 nm
SENSIBILITA' STRUMENTALE	1 - HIGH
TEMPO DI INTEGRAZIONE	4

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase POROSHELL 120 C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µm), è tassativo l'uso dei Prefiltri Javelin (1 x 10 pz.) cod. S90199511.
--

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica <u>nuova</u> Reverse Phase POROSHELL 120 C18 (50 x 4,6 mm, 2,7 µm). Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile o Metanolo (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile o Metanolo (80 : 20 v/v) al flusso di 1,0 ml/minuto. Non riciclare i liquidi di lavaggio. Condizionare la colonna con la fase mobile al flusso di 1,4 ml/minuto per 15 minuti. Al termine, iniettare il Test chimico e verificare la congruità della separazione. 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

Si consiglia di disconnettere il detector. Flussare 15 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) al flusso di 1,4 ml/minuto e scaricare. La colonna va stoccata in una soluzione di H₂O : Acetonitrile (20 : 80 v/v) . Si raccomanda di eseguire il lavaggio della colonna alla fine di ogni seduta analitica.
--

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Flussare 15 ml di una soluzione di H₂O : Acetonitrile (80 : 20 v/v) al flusso di 1,4 ml/minuto.

PARAMETRI HPLC

LOOP	20 µl
Flusso di lavoro consigliato	1,4 ml / minuto
Pressione corrispondente	Circa 70 bar

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z39016	Calibratore per Ptoporfirina IX e Zincoptoporfirina	1 x 2 x 0,5 ml/ 4 x 1 ml
Z39019	Controllo per Ptoporfirina IX e Zincoptoporfirina - Livelli 1 e 2	1 x 3 x 0,5 ml/ 10 x 1 ml
Z39111	Fase Mobile	4 x 500 ml
Z699975902	Colonna Analitica Poroshell 120 C18 (50 x 4,6mm -2,7 µm)	1 PZ
S90199511	Prefiltri Javelin	1 x 10 PZ
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 PZ



PROTOPORFIRINA IX E ZincoPROTOPORFIRINA IN FLUORESCENZA (Cromatogrammi di Riferimento)

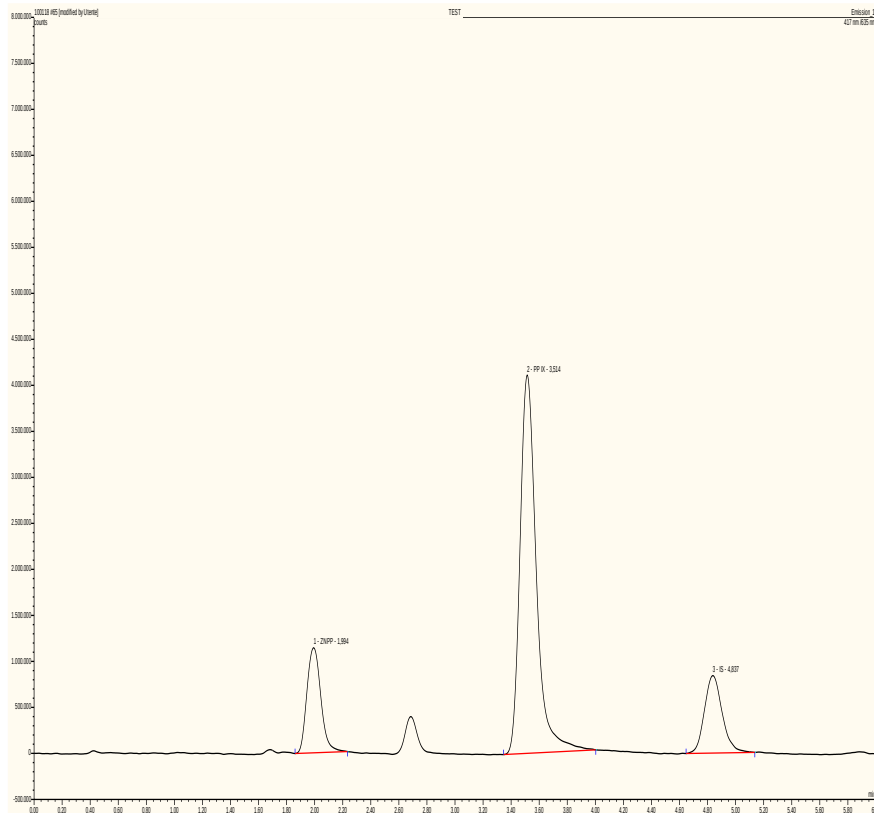


Fig. 1 :	Soluzione Test		
	R.T. 1.99	ZnPP	
	R.T. 3.51	Proto IX	
	R.T. 4.83	Standard interno	

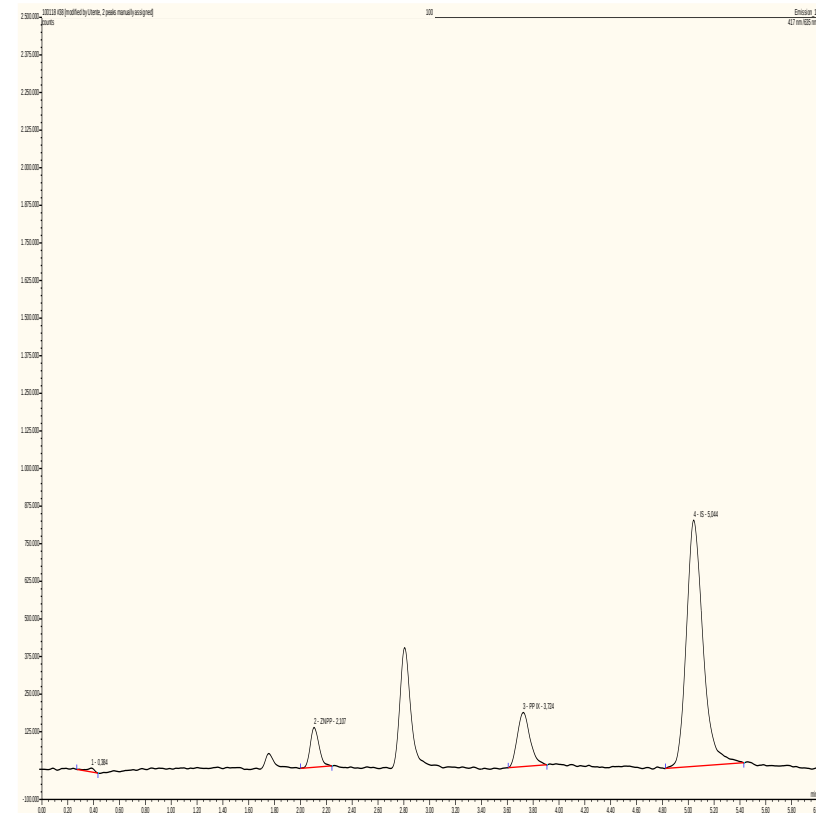


Fig. 2 :	Calibratore su sangue intero		
	R.T. 2.10	ZnPP	100,00 µg/dl
	R.T. 3.72	Proto IX	100,00 µg/dl
	R.T. 5.04	Standard interno	

PROTOPORFIRINA IX E ZincoPROTOPORFIRINA IN FLUORESCENZA (Cromatogrammi di Riferimento)

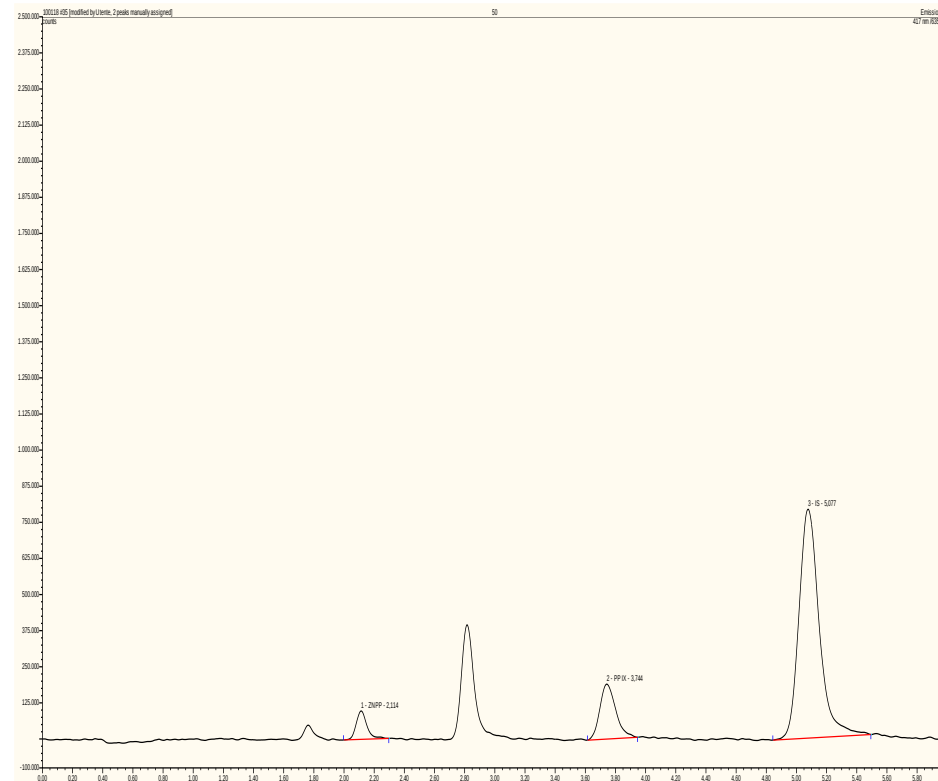


Fig. 3 :	Campione su sangue intero		
	R.T. 2.11	ZnPP	5,00 µg/dl
	R.T. 3.74	PP IX	5,00 µg/dl
	R.T. 5.07	Standard Interno	