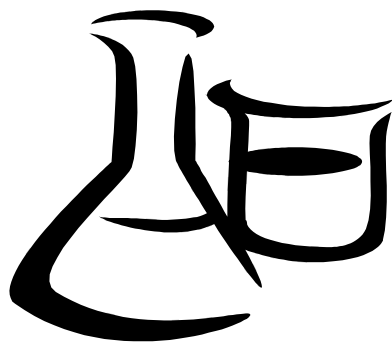


Vybraná vyšetření u pacientů s diabetes mellitus

Praktické cvičení z lékařské biochemie
Všeobecné lékařství

Martin Vejražka



2018/19

Obsah

1. STANOVENÍ GLYKEMIE A OGTT 3
2. STANOVENÍ GLYKOVANÝCH PROTEINŮ (FRUKTOSAMINU) 4
3. KVALITATIVNÍ A SEMIKVANTITATIVNÍ PRŮKAZ GLUKÓZY V MOČI 5
4. KVALITATIVNÍ PRŮKAZ KETOLÁTEK V MOČI 6
5. STANOVENÍ GLUKÓZY A KETOLÁTEK V NEZNÁMÉM VZORKU MOČI 6
6. STANOVENÍ GLYKEMIE OSOBNÍM GLUKOMETREM 6

1. Stanovení glykemie a oGTT

Reagencie:

K analýze je použita komerční souprava Bio-La-Test Glukosa Liquid 500 S firmy PLIVA-Lachema, a.s.

- | | | |
|---|--|--------------------------------|
| 1. pracovní roztok | | |
| glukózaoxidáza | | ≥ 166,0 μkat · l ⁻¹ |
| peroxidáza | | ≥ 16,0 μkat · l ⁻¹ |
| 3-metylfenol | | 10,0 mmol · l ⁻¹ |
| 4-aminoantipyrin | | 1,0 mmol · l ⁻¹ |
| fosforečnanový pufr, pH 8 | | 140,0 mmol · l ⁻¹ |
| 2. standardní roztok glukózy | | 10,0 mmol · l ⁻¹ |
| 3. sérum 1 – vzorek odebrán nalačno | | |
| sérum 2 – vzorek odebrán 60 minut po zátěži glukózou | | |
| sérum 3 – vzorek odebrán 120 minut po zátěži glukózou | | |

Pracovní postup:

K dispozici jsou tři vzorky séra téhož pacienta odebírané v rámci orálního glukózového tolerančního testu (oGTT) v časech 0, 60 a 120 minut (označené jako vzorek séra 1, 2 a 3).

Připravte a označte pět zkumavek a odměřte do nich reakční směsi dle tabulky:

Odměřit v ml:	Čas 0 (zkumavka 1)	Čas 60' (zkumavka 2)	Čas 120' (zkumavka 3)	Standard (zkumavka 4)	Slepý vzorek (zkumavka 5)
Pracovní roztok	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Sérum 1 (čas 0)	0,01	-	-	-	-
Sérum 2 (čas 60')	-	0,01	-	-	-
Sérum 3 (čas 120')	-	-	0,01	-	-
Standard (10 mmol·l ⁻¹)	-	-	-	0,01	-
Destilovaná voda	-	-	-	-	0,01

Obsah zkumavek promíchejte a inkubujte 30 minut při laboratorní teplotě v temnu.
Změřte absorbanci při 500 nm proti slepému vzorku do 30 minut po skončení inkubace.

Úkoly:

Vypočítejte koncentraci glukózy v jednotlivých vzorcích séra podle vzorce

$$S\text{-Glc} = \frac{A_{\text{vzorek}}}{A_{\text{standard}}} \cdot c_{\text{standard}} \quad (\text{koncentrace standardu: } 10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1})$$

Vyhodnoťte oGTT.

2. Stanovení glykovaných proteinů (fruktosaminu)

Reagencie:

- Činidlo \blacklozenge
 - uhličitanový pufr, pH 10,3–10,4
 - Na_2CO_3 75,0 mmol · l⁻¹
 - NaHCO_3 25,0 mmol · l⁻¹
 - nitrotetrazoliová modř (NTB) 0,48 mmol · l⁻¹
- standardní roztok glykovaných proteinů 250,0 μmol · l⁻¹
- bovinní sérum
- glukóza 0,2 mmol · l⁻¹ v uhličitanovém pufru 100 mmol · l⁻¹, pH 10,3–10,4
- vzorek glykovaných proteinů: 0,5 ml séra se smísí s 1 ml roztoku glukózy, nechá se stát alespoň 5 dní při pokojové teplotě

Pracovní postup:

Porovnáme koncentraci glykovaných proteinů ve vzorku séra čerstvě smíšeného s glukózou a ve stejně připravené směsi séra a glukózy, která byla inkubována několik dní při pokojové teplotě.

- Připravíme směs séra s glukózou: smísíme 100 μl roztoku glukózy a 50 μl séra.
- Fotometrické kyvety předehřejeme na 37 °C. Přímo v kyvetách pak smísíme

Odměřit v ml:	Krátká glykace (zkumavka 1)	Dlouhá glykace (zkumavka 2)	Standard 250 μmol · l ⁻¹
Sérum čerstvě smíšené s glukózou	0,1	–	–
Sérum glykované několik dní	–	0,1	–
Standard	–	–	0,1
Činidlo	1,0	1,0	1,0
Promícháme a inkubujeme 10 minut (přesně) při 37 °C. Změříme absorbance A ₁ při 530 nm proti destilované vodě.			
Inkubujeme 10 minut (přesně) při 37 °C. Změříme absorbance A ₂ při 530 nm proti destilované vodě.			

Koncentraci glykovaných proteinů stanovíme podle vzorce

$$\text{Glyk. prot.} = \frac{A_{2 \text{ vzorku}} - A_{1 \text{ vzorku}}}{A_{2 \text{ standardu}} - A_{1 \text{ standardu}}} \cdot c_{\text{standardu}}$$

(koncentrace standardu glykovaných proteinů: 250 μmol · l⁻¹)

3. Kvalitativní a semikvantitativní průkaz glukózy v moči

Reagencie:

1. Fehlingův roztok I – pentahydrát síranu měďnatého $70 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ⚠ ⚡
2. Fehlingův roztok II – hydroxid sodný 250 g a tetrahydrát vínanu draselno-sodného 350 g v 1 l destilované vody ⚡
3. Kyselina sulfosalicylová dihydrát $200 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ⚡
4. diagnostické proužky glukóPHAN nebo některý polyfunkční diagnostický proužek
5. vzorky moči: moč s glukózou
moč s glukózou a kyselinou askorbovou
moč s fruktózou
fyziologická moč

Fehlingova zkouška

Pracovní postup:

Moč nesmí obsahovat bílkoviny, je proto vhodné nejprve provést zkoušku kyselinou sulfosalicylovou. V pozitivním případě odstraníme bílkoviny srážením a filtrací (asi ke 2 ml moči přidáme přibližně $0,2 \text{ ml}$ acetátového pufru o pH 4,7, promícháme, povaříme asi 1 minutu a sraženinu odstraníme filtrací).

Čerstvý pracovní roztok Fehlingova činidla připravíme smícháním Fehlingova roztoku I a II v poměru přibližně 1:1. Samotné činidlo nesmí při povaření měnit barvu. Asi k 1 ml moči přidáme stejný díl Fehlingova činidla a povaříme. V přítomnosti glukózy vznikne zelenožlutá, žlutá až cihlově červená sraženina. Barva sraženiny závisí na koncentraci redukujícího cukru v moči (zelená sraženina – cca $25 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy, hnědočervená sraženina – cca 100 mmol/l glukózy, červená sraženina – nad cca $150 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glukózy).

Stanovení glukózy diagnostickými proužky

Pracovní postup:

Proužek ponoříme na $1\text{--}2 \text{ s}$ do vyšetřované moči tak, aby se reagenční zóna smočila. Poté odstraníme přebytečnou moč otřením o okraj nádoby. Proužek ponecháme ve vodorovné poloze. Po 60 sekundách srovnáme zbarvení reagenční zóny proužku s barevnou stupnicí na obalu tuby. V přítomnosti vysokých koncentrací kyseliny askorbové je vývin zbarvení zpomalený.

4. Kvalitativní průkaz ketolátek v moči

Reagencie:

1. roztok nitroprusidu sodného (před použitím rozpustíme asi 10 mg – na špičku nože nitroprusidu v asi 3 ml destilované vody) ⚠
2. hydroxid sodný 100 g/l ↔
3. kyselina octová koncentrovaná ↔
4. Lestradetovo činidlo – síran amonný 20 g, uhličitan sodný bezvodý 20 g, dihydrát nitroprusidu sodného 0,2–1,0 g ⚠
5. ketoPHAN nebo některý z polyfunkčních diagnostických proužků
6. vzorky moči

Legalova zkouška

Pracovní postup:

Asi ke 2 ml moči přidáme 2–3 kapky nitroprusidu sodného a zalkalizujeme 3 kapkami NaOH. Vznikne červené zbarvení způsobené reakcí kreatininu. Červeně zbarvený roztok rozdělíme do dvou zkumavek a do jedné přidáme několik kapek koncentrované kyseliny octové. Pokud jsou přítomné ketolátky, zbarvení se změní do červeno-fialova, pokud se roztok odbarví, bylo červené zbarvení způsobeno pouze kreatininem (fyziologická součást moči).

Lestradetova zkouška

Pracovní postup:

Navlhčíme filtrační papír, nasypane na něj malé množství práškového Lestradetova činidla a přidáme 1–2 kapky moči. Asi do 1 minuty se v případě přítomnosti ketolátek vytvoří fialové zbarvení.

Stanovení ketolátek diagnostickými proužky

Pracovní postup:

Proužek ponoříme na 1–2 s do vyšetřované moči tak, aby se reagenční zóna smočila. Poté odstraníme přebytečnou moč otřením o okraj nádoby. Proužek ponecháme ve vodorovné poloze. Po 60 sekundách srovnáme zbarvení reagenční zóny proužku s barevnou stupnicí na obalu tuby. Pozitivní reakce se projeví změnou indikační zóny z krémově bílé do fialové. Srovnávací stupnice je kalibrována na koncentraci kyseliny acetoctové.

5. Stanovení glukózy a ketolátek v neznámém vzorku moči

Úkol

Proveďte kvalitativní zkoušky na glukózu a ketolátky ve vzorku moči.

6. Stanovení glykémie osobním glukometrem

Stanovení glykémie osobním glukometrem bude demonstrováno vyučujícím.