

Rutineopplegg for
aminolevulinsyrebestemmelse
(U-ALA) ved blyeksponeringskontroll

Nils Gundersen

HD 740/77

ARBEIDSFORSKNINGSINSTITUTTENE
BIBLIOTEKET
Gydas vei 8
Postboks 8149 Oslo Dep. Oslo 1

- I INNLEDNING
- II KONSENTRASJONSKORRIGERING, Urinprøver
- III KONTROLL U-ALA bestemmelse
- IV SAMMENHENG, B-Pb og U-ALA
- V KONKLUSJONER

INNLEDNING

For kontroll av blyeksponerte ved YHI inngår i tillegg til bestemmelse av bly i blod (B-Pb) bestemmelse av aminolevulin-syre i urin (U-ALA). I rutinekontroll bestemmes ALA i to urinprøver, henholdsvis en morgen og en ettermiddagsurin pr. person. Grunnen for at en vil ha verdiene for to uriner er at en ønsker å få et bedre mål for ALA utskillelsen i urin, da ALA-U urinverdiene er avhengig av hvor konsentrert eller tynn urinprøven er.

Grunnen til at vi tar to prøver er ikke at en vil ha et mål for forandringen over en arbeidsdag.

I årsberetningen fra 1957 fra arbeidstilsynet og arbeidstilsynsrådet står det (s. 141) om urinprøvetaking "Det er betydelige svingninger i utskillelsen i løpet av døgnet. Vi har derfor vært nødt til å gå over til å kreve at det sendes inn 2 prøver tatt til forskjellige tider av arbeidsdagen."

Dersom en kunne korrigere for de tilfeldige variasjoner i urinprøvenes sammensetning p.g.a. væskeinntak, kunne en anta at det skulle være tilstrekkelig med kun en urinprøve pr. person for å kontrollere ALA nivå i urin eller den mengde ALA som utskilles pr. døgn.

KONSENTRASJONS KORRIGERING URINPRØVER

For å korrigere for urinprøvers varierende styrke er det vanlig å benytte måling av (I) egenvekt, (II) osmomolalitet, eller (III) kreatinininnhold.

Den viktigste årsak til urinprøvenes varierende sammensetning skyldes kosten og spesielt væskeinntaket. Den normale utskilte urinmengde pr. døgn er omkring 1,5 liter. En liter urin inneholder ca. 10 gram NaCl og 1,8 gram kreatinin. Kreatinin er et avfallsprodukt fra kroppens naturlige metabolisme.

For en person er døgnutskillelsen av kreatinin relativt konstant. Kreatininutskillelsen er en funksjon av kroppsvekten, eller mer nøyaktig muskelmengden.

En vil derfor finne lavere kreatininverdier i snitt hos barn og kvinner enn hos voksne menn. Kreatininutskillelsen vil også avta hos eldre.

Vi har utført bestemmelse av kreatinininnholdet i de mot-
tatte urinprøver for ALA bestemmelse i løpet av det siste året.

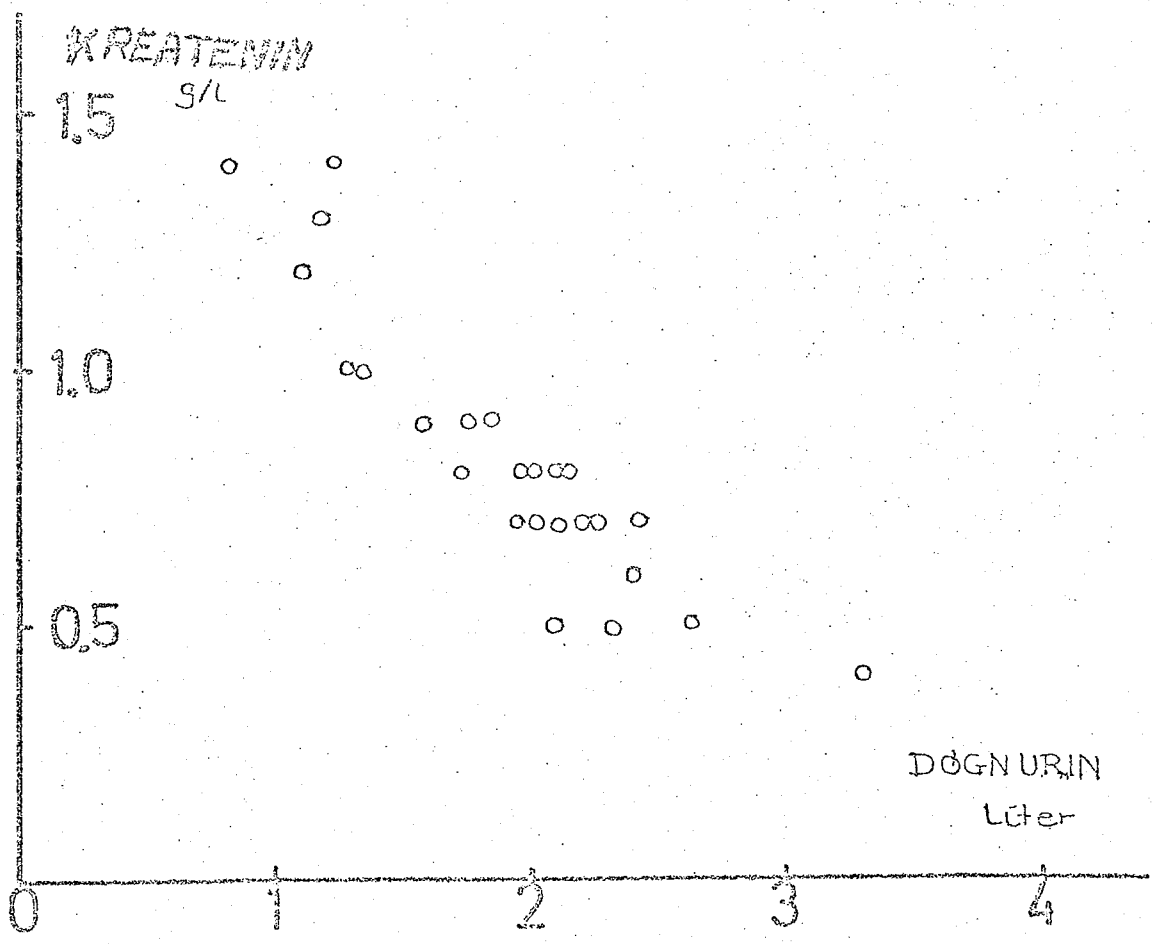
Kreatininbestemmelsen i urin bygger på måling av rødfarve
som dannes mellom kreatinin og pikrinsyre i basisk miljø
(NaOH). Denne kolorimetriske metode er hurtig og enkel å utføre.
For rutineanalyse benyttes 1 ml urin til bestemmelsen. Er
kreatininverdien lavere enn 0,5 eller større enn 2,5 g/l bør
en ta ny bestemmelse med henholdsvis 2 ml eller 0,5 ml urin.

For kontroll av vår benyttede metode for kreatinin-
bestemmelse ble det tatt omanalyse etter noen dagers henstand
av prøvene. Variasjonen mellom parallellene lå for mer enn 95%
av analysene innenfor 0,2 g kreatinin/l. Forskjell mellom
omanalysing av prøver samme dag lå på det samme nivå. En må
kunne si at den benyttede kreatininbestemmlsesmetode stort
sett har en absolutt spredning på ca. 0,1 g/l.

Døgnurinprøver er det selvfølgelig vanskelig å få tatt av
industriarbeidere.

Ved instituttet har vi utført kreatininbestemmelse på en
serie med døgnurinprøver fra en enkelt person. Disse prøvene er
tatt under et sykehusopphold.

Resultatene er vist i følgende figur.



En ser at en har et tilnærmet linjært sammenheng mellom liter døgnurin og gram kreatinin, men at kurven ser ut til å krumme av i begge ender. Dette er naturlig da det må en veldig stor urinmengde til for at kreatininverdien skal bli null og at det er grenser for hvor lite urin en normalt kan skille ut, dette minimum er ca. 0,4 liter/døgn.

Resultatene av denne undersøkelsen viser kreatininvariasjon fra 0,5 g til 1,5 g kreatinin/liter og tilsvarer en døgnutskillelse på ca. 1,6 gram.

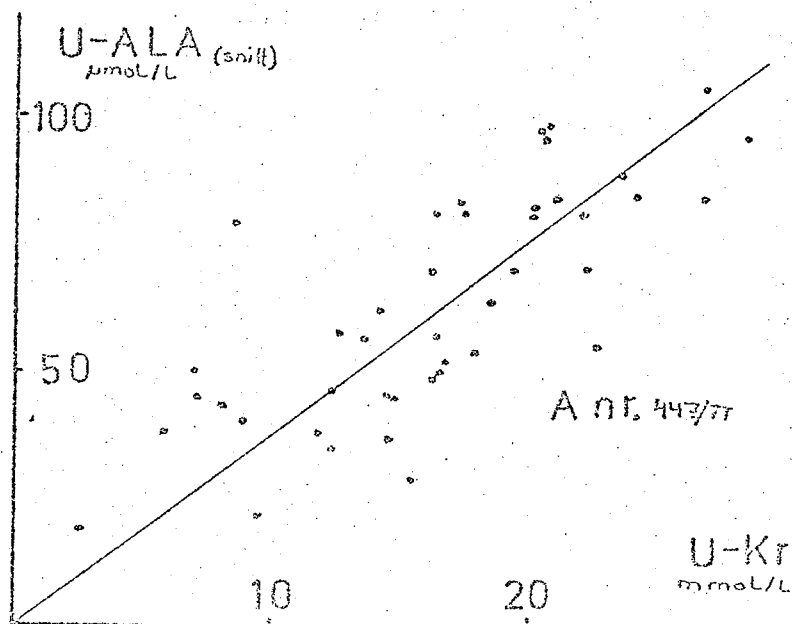
Målinger av kreatinin i tilfeldige urinprøver viser stor variasjon (ca. 10 ganger) fra 0,3 til 3-4 g/l.

I en artikkel om urinalyse og konsentrasjonsjustering "Concentration Adjustments in Urinalysis" av H.B. Elkins og medarbeidere i American Industrial Hygiene Association Journal 1974 s. 559-565 avslutter de med å si at de tror at kreatinin er den beste korrigering for svært konsentrerte og svært tynne prøver.

Kreatininutskillelsen pr. døgn for en person skulle som nevnt være relativt konstant. Den individuelle variasjon blir vesentlig mindre når en korrigerer ALA for kreatinin.

Da U-ALA bestemmelsen har et relativt Standard avvik (SD) på omkring 30% får en et bedre mål på ALA verdien ved å ta snittet av parallellbestemmelser. Kreatininverdien viser vesentlig mindre variasjon.

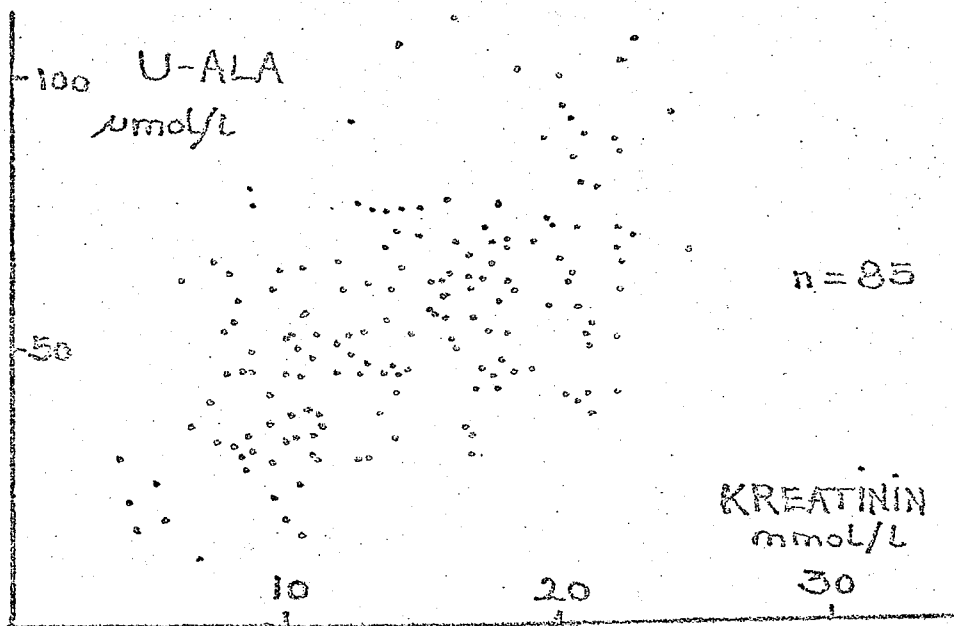
U-ALA verdiene for en større kontrollserie fra en blyakkumulatorfabrikk er fremstilt som funksjon av kreatininverdien (U-Kr). U-ALA verdiene er snitt av to bestemmelser gjort med et par ukers mellomrom. De U-ALA verdiene hvor en har høye B-Pb verdier er ikke tatt med da en her kan anta unormalt forhøyede ALA verdier.



Av fremstillingen ser en tydelig at det er en lineær sammenheng mellom U-ALA verdiene og U-Kr verdiene. Dette skulle vise at en også på gruppebasis får mindre spredning i ALA verdiene ved å korrigere for kreatinininnholdet i urinprøvene. Forholdet for denne serie er:

$$\frac{U-ALA}{U-Kr} = 3,8 \text{ } \mu\text{mol}/\text{mmol}$$

Tilsvarende grafisk plotting av U-ALA mot U-Kr er gjort for hovedmengden av de ALA verdiene som er bestemt i 1977 hvor B-Pb har vært mindre enn ca. 40 ug/100 ml (): 1,9 umol/l).



Resultatene viser en klar sammenheng, men verdiene sprer mere. Dette er å vente da gruppen inneholder personer av begge kjønn og vil ha større aldersfordeling enn gruppen av akkumulatorarbeidere. Snittverdien U-ALA/U-Kr er omtrent 4 umol/mmol.

Disse resultater er i overensstemmelse med et nylig publisert fransk arbeid av H. Housset et al i Arch. mal. prof. 1977, 38 pp 303-313. De har ut fra korrelasjonsstudier mellom forskjellige tester for kronisk blyforgiftning funnet at U-ALA gir god sammenheng med EDTA provosert blyutskillelse når resultatene angis pr. gram kreatinin.

Disse resultater er delvis i uoverensstemmelse med et eldre arbeid av K. Cramer og S. Selander "Control of Lead Workers by Determination of Urinary - Aminolaevulinic Acid", Brit. J. Med. 1966, 24, 283. De angir at referanse til kreatinin ikke har noen fordel fremfor kun å angi ALA i mg/100 ml urin. "This must be due to the fact that the influence of the metabolic activities of lead has a greater effect on the urinary concentration of ALA than has the concentration of urine in the kidneys".

Dette kan forklares ut fra at når en først har fått forhøyet ALA utskillelse p.g.a. blypåvirkning er konsentrasjonskorrigering av underordnet betydning. Derimot vil det være en fordel å korrigere for kreatinin for å få mindre spredning av normalområdet.

KONTROLL U-ALA BESTEMMELSE

Det er kjent at den U-ALA metoden som vi benytter er både usikker og til dels uspesifikk (Behandlet i rapport fra YHI, "Kontrollanalyse av bly i blod", Nils Gundersen.)

Den anbefalte utluftingsgrensen for U-ALA er nylig senket fra 2,5 mg/100 ml til 2,0 mg/100 ml er det nødvendig å se noe mer kritisk på analysemetoden.

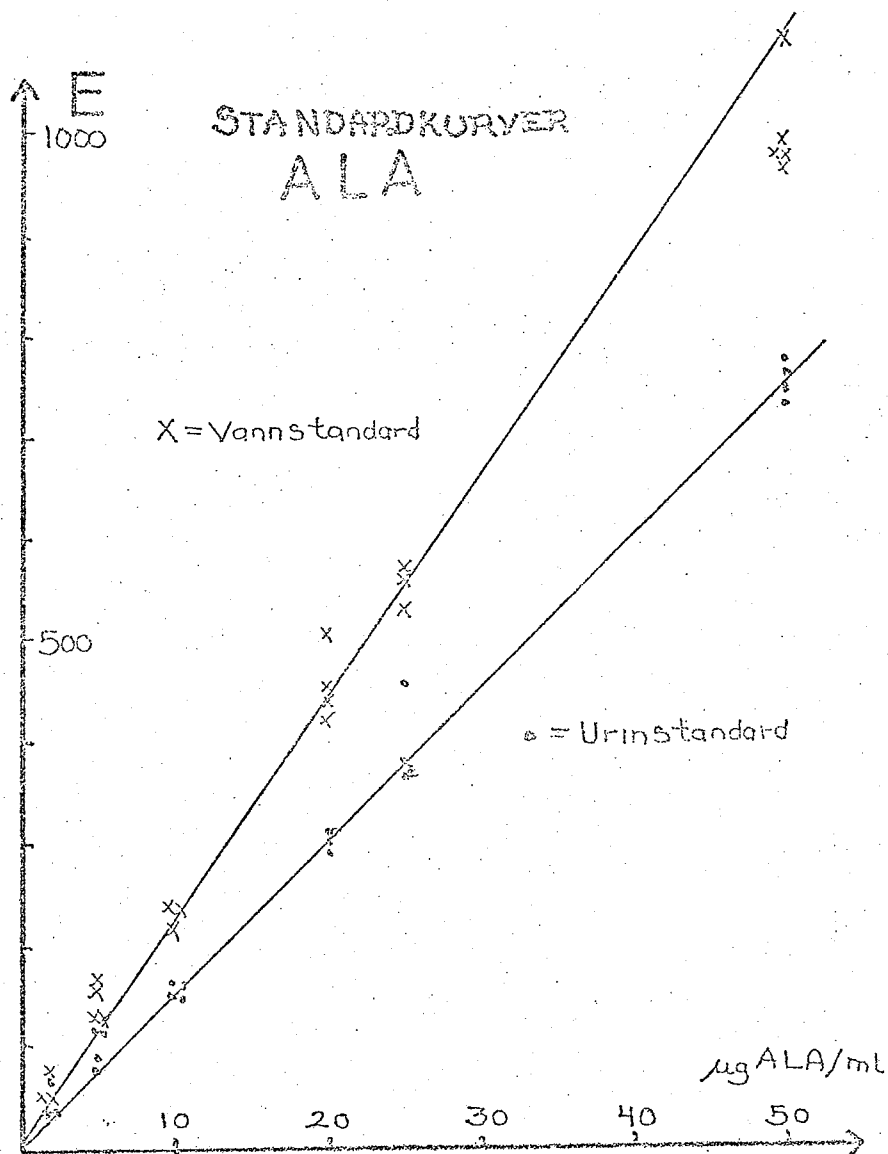
En har tatt en serie av urinprøver fra personer (n=22) som ikke skulle være yrkeshygienisk eksponert for bly og bestemt ALA verdien ved å benytte standard tilsetningsmetode. Den utregnede faktor ble: 10,74 (10% 9,6-11,8; 20% 8,6-12,8)

I det rutinemessige opplegg har vi benyttet en fast faktor lik 10. Urinprøver som har vist verdier over ca. 1,5 er blitt omanalysert med standard tilsetningsmetoden.

Et slikt opplegg er blitt publisert like etter at vi innførte det av Olof Vesterberg og Gøsta Lindstedt. "A modified method for determining aminolevulinic acid in urine eliminating some interferences" i Work-environm. health 11 (1974) 166-169. Det er tidligere påpekt av R. Lauwerys og medarbeidere i artikkelen:

"Automated analysis of DeltaAminolaevulinic acid in urine" i Clinica Chemica Acta 40 (1972) 443-447. De har for 100 forskjellige uriner for samme mengde tilsatt ALA funnet verdier som varierer fra 0,076 til 0,188 med middel på 0,136 og standard avvik på 0,027. Dette viser at referanse

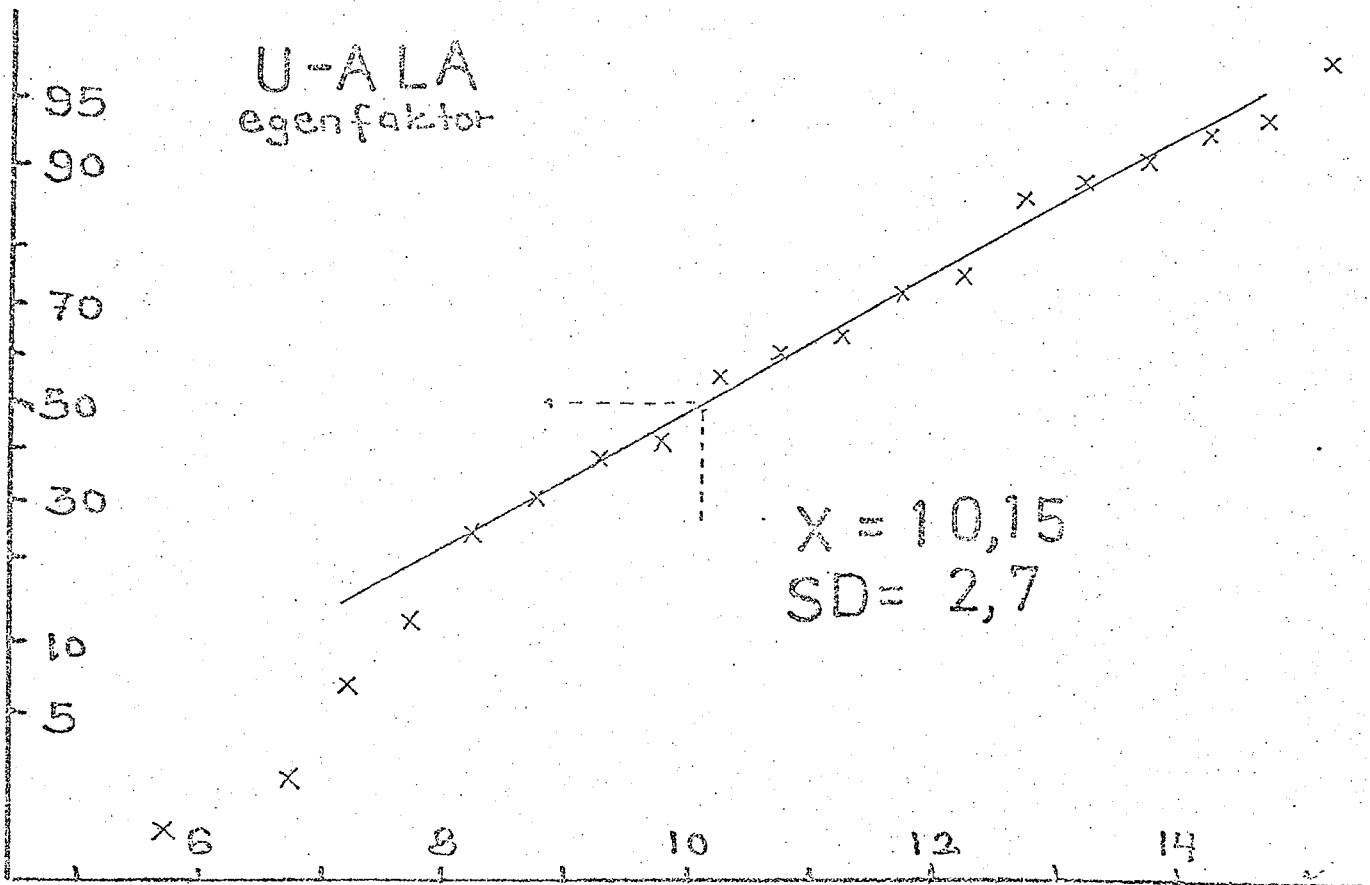
til en standard kurve av ALA i vann er galt. Dette forhold har vi også sett noe nærmere på. Det ble laget 5 paralleller av vannstandarder med varierende mengde ALA. Resultatene vist i figur. Det tilsvarende ble gjort for en samleurin med lav ALA verdi. Resultatene vist i figur.



Som en vil se av figuren fikk en i begge tilfelle rette standardkurver med relativ liten spredning i parallellene. Derimot var det som ventet stor forskjell i helningskoeffisienten for vann og urinstandard. 20 µg ALA/ml i vann ga 0,450 E og i urin 0,300 E

Videre har vi tatt enkelte urinprøver med høy ALA verdi og fortynnet i varierende forhold med vann. Disse fortynnete prøvene ble så analysert for ALA og en regnet seg så tilbake til opprinnelige ALA verdi. Resultatene viste som ventet at ALA verdien (korrigert for fortynning) økte med fortynning med vann.

For å se noe nærmere på fastsettelsen av en fast faktor har vi plottet verdien for 92 enkeltbestemmelser av indre faktor (egen faktor) på et sannsynlighetspapir.



Resultatet viser at de funnede egenfaktorer er normalt fordelt med en snittverdi på 10,15 og standard avvik på 2,7.

Dette skulle vise at vi fortsatt kan benytte 10 som fast faktor.

SAMMENHENG MELLOM B-Pb OG U-ALA

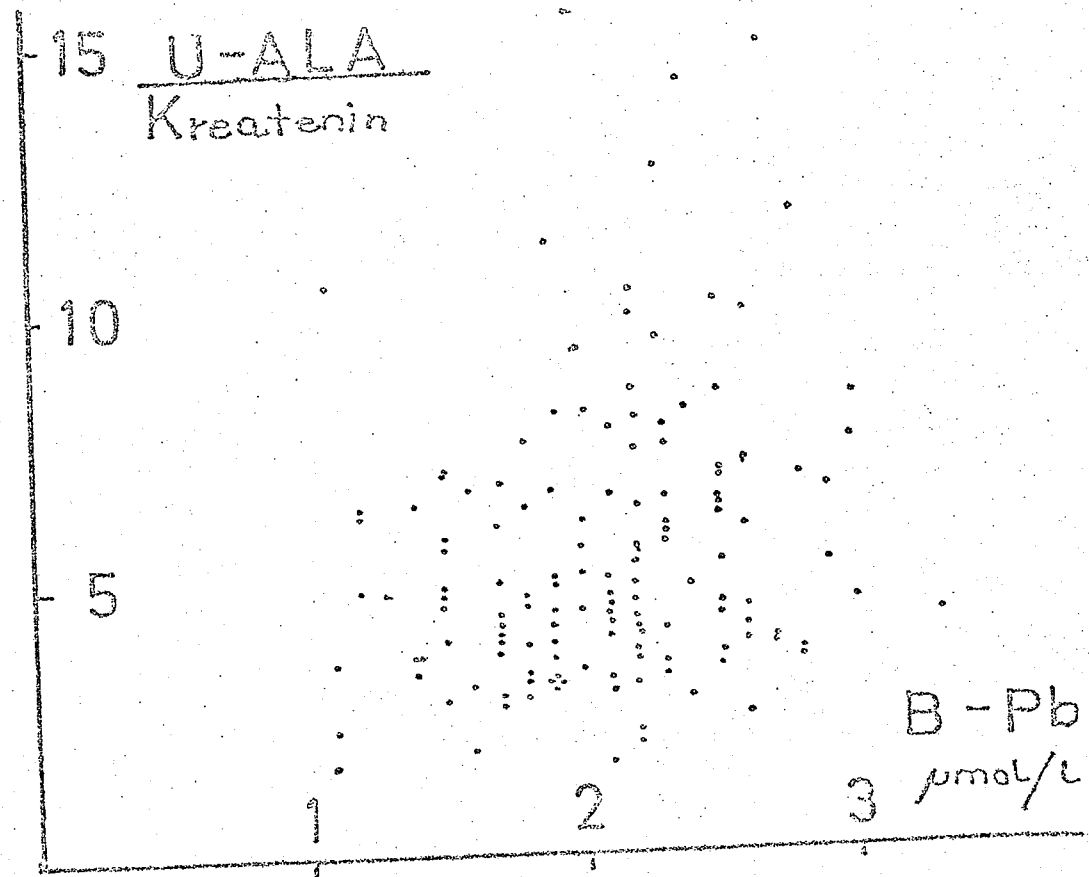
Resultater av undersøkelse over biologiske effekter av blyeksponering av H. Sakurai og medarbeidere i artikkelen:

"Biological Response and Subjective Symptoms in Low Level Lead Exposure" i Arch-Environ Health Vol 29, 1974, s. 157-163. viser en sterk økning i U-ALA verdiene når B-Pb overskrider omtrent 50 ug/100 ml blod. U-ALA verdiene ser ut til å stige eksponensielt for verdier over 50 ug Pb/100 ml og med stor variasjonsbredde på de enkelte B-Pb/100 ml og med stor variasjonsbredde på de enkelte B-Pb verdier omkring 100 ug/100 ml.

Lav U-ALA er ikke ensbetydende med lav B-Pb. Derimot viser høy U-ALA verdi god sammenheng med høy B-Pb verdi. Høy U-ALA verdier viser at blyeksponeringen har hatt en fysiologisk helseeffekt.

Det angis også i artikkelen at det er funnet at U-ALA verdier avtar med alderen.

Vi har fremstilt grafisk en del av våre U-ALA verdier angitt som ALA/g kreatinin som funksjon av B-Pb og en ser at en får de høye ALA verdiene ved høye B-Pb, men verdiene viser stor spredning.



I et arbeid av A. Schutz og S. Skjerfving "Effect of a short, heavy exposure to lead dust upon blood lead level, erythrocyte - aminolevulinic acid dehydratase activity and urinary excretion of lead, - aminolevulinic acid and coproporphyrin" i Scand. j. work environ & health 33 (1976) p. 176-184 er også forholdet mellom U-ALA og B-Pb blitt undersøkt. finner en klar økning i U-ALA ved B-Pb nivåer på 30 ug/100 ml som er lavere enn 40-50 ug/100 ml som er rapportert av andre forskningsgrupper.

I den Svenske meddelande 71:11 fra Kungliga Arbetarskyddsstyrelsen angående medisinsk kontroll av blyarbeidere.

Det er angitt at ved alle medisinske undersøkelser av blyeksponerte inngår bestemmelse av B-Pb og det er først når verdien er over 50 ug/100 ml at det også skal tas bestemmelse av ALA i en urinprøve.

I forbindelse med utarbeidelse av et Nordisk metodehefte for metallanalyser innen yrkeshygienikere er det nylig (vår 1977) foretatt besøk ved de yrkeshygieniske enhetene i Norden. Både ved KASS og de yrkesmedisinske klinikkene i Sverige og instituttene i Danmark og Finland ble ALA kun bestemt i en urinprøve pr. blykontroll, og antall U-ALA analyser utgjorde kun 10% av antall B-Pb analyser.

Jeg har ut fra våre analysedata fra blyakkumulatorarbeidere inntrykk av at stigningen av U-ALA mer avhenger av hvor sterkt økningen av B-Pb har vært og ikke bare det endelige B-Pb nivået.

I arbeidet til A. Schutz er det gitt en kraftig blyeksponering til personer som tidligere ikke er blyeksponerte, dette kan være årsak til at U-ALA stiger ved relativt lav B-Pb verdier.

Disse undersøkelsene skulle vise at det for rutinekontroll ikke skulle være nødvendig å bestemme U-ALA for B-Pb verdier under nivået 30-40 ug/Pb/100 ml.

KONKLUSJONER

For rutinekontroll av blyeksponerte inngår bestemmelse av aminolevulinsyre i urin (U-ALA). I vårt rutineopplegg benyttes to urinprøver for å kompensere for tilfeldige konsentrasjonsvariasjoner. I de øvrige Nordiske land benyttes kun en urinprøve og U-ALA bestemmes først ved høye B-Pb verdier.

Våre undersøkelser har vist at en får god konsentrasjonskorrigerings både individuelt og på gruppebasis ved å angi U-ALA verdien pr. gram kreatinin.

Det skulle derfor være tilstrekkelig å benytte kun en urinprøve pr. person, fortrinnsvis en morgenurin for kontroll av ALA utskillelsen ved blyeksponeringskontroll.

Ut fra våre analyseresultater og publiserte undersøkelser skulle det ved rutinekontroll ikke være nødvendig å utføre U-ALA bestemmelse når B-Pb verdien er under ca. 30-40 ug/100 ml (): 1,5 umol/l).