



kód 11017 40 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 15-30°C
Reagenty pro měření koncentrace 5-aminolevulové kyseliny a porfobilinogenu Pouze pro laboratorní <i>in vitro</i> diagnostiku

5-AMINOLEVULOVÁ KYSELINA (ALA)/ PORFOBILINOGEN (PBG)

Chromatografie - spektrofotometrie

PRINCIP METODY

Vzorek prochází postupně dvěma chromatografickými kolonami. První z nich obsahuje anex, který zachytí porfobilinogen (PBG), druhá kolonka obsahující katex zachytí 5-aminolevulovou kyselinu (ALA). Po následujícím promytí se odstraní interferující částice, oba analyty jsou eluovány a spektrofotometricky kvantifikovány při 555 nm prostřednictvím Ehrlichovy reakce^{1,2}.

OBSAH A SLOŽENÍ

- Reagent.** 2 x 350 mL. Octan sodný 1 mol/L.
- Reagent.** 1 x 175 mL. Kyselina octová 1 mol/L.
- PBG mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují navážené množství pufovaného anexu-pryskyřice.
- ALA mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují navážené množství pufovaného kanexu-pryskyřice.
- Reagent.** 1 x 17 mL. Acetylaceton.
Škodlivý (Xn): R10: Hořlavý. R22: Škodlivý při požití. S21: Při práci nekuřte. S23.2: Nevdechujte výpary. S24/25: Nevdechujte výpary.
- B1. Reagent.** 2 pror 50 mL. 4-Dimetylamino-benzaldehyd 6 mmol/L, po rekonstituci.
Škodlivý (Xn): R22: Škodlivý při požití. R36/37/38: Dráždí oči, dýchací cesty a pokožku. S26: V případě zasažení očí nebo potřísnění pokožky, omyjte postižené místo pod tekoucí vodou a vyhledejte neprodleně lékařské ošetření. S36/37/39: Používejte ochranný oděv, rukavice, brýle nebo štít.
- B2. Reagent.** 2 x 100 mL. Kyselina octová 18 mol/L.
Korosivní (C): R10: Hořlavý. R35: Způsobuje různé popáleniny. S23.2: Nevdechujte výpary. S26: V případě zasažení očí nebo potřísnění pokožky, omyjte postižené místo pod tekoucí vodou a vyhledejte neprodleně lékařské ošetření. S45: V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.
- ALA Standard.** 2 pro 5 mL. Koncentrace po rozpuštění standardu je uvedena na štítku lahvičky.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při teplotě 15-30°C. Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku pokud jsou těsně uzavřené a je zabráněno jejich kontaminaci během jejich použití.

Známky zhoršení kvality:

Reagencie: přítomnost částic, zákal, absorbance blanku větší jak 0,060 (ALA) a 0,025 (PBG) při 555 nm v 1 cm kyvetě.

Mikrokolony (3 a 4): ztráta (nepřítomnost) pufru nad pryskyřici.

PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

– Kyselina perchlorová 70 % (analytická třída).

PŘÍPRAVA REAGENTŮ

Reagent B: Přeneste obsah lahvičky B2 do B1 a třepejte do úplného rozpuštění. Roztok je stabilní 6 měsíců při 2-8°C.

Standard (S): Rozpusťte obsah lahvičky v 5 ml destilované vody. Roztok je stabilní 12 měsíců při 2-8°C.

Ehrlichovo činidlo: Přidejte 1,9 mL perchlorové kyseliny (70%) do 10 mL reagentu B. Protřepejte do zhomogenizování roztoku. Stabilita je 7 hodin při pokojové teplotě (15-30°C). Větší množství připravíte v adekvátním poměru.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo
- 1 cm fotometr s filtrem 555 nm (520-570)
- Varná vodní lázeň kyveta

VZORKY

Moč sebraná ke stanovení za 24 h standardním způsobem. Upravte 24 h vzorek moče na pH 6 koncentrovanou HCl. Chraňte vzorek před světlem. ALA je stabilní 1 měsíc a PBG maximálně 24 h při 2-8°C. PBG je stabilní 1 měsíc při -20°C. Před testováním vzorek centrifugujte nebo přefiltrujte.

POSTUP

Chromatografická separace (Poznámka 1)

- Odstraňte horní uzávěr PBG mikrokolony (3) a ALA mikrokolony (4). Pak otevřete uzávěr její spodní části. Zatláčte horní disk, který uzavírá pryskyřici tupým předmětem (skleněnou tyčinkou) těsně nad její povrch. Nestlačujte pryskyřici! Kapaliny nad pryskyřici nechejte prokapat přes spodní uzávěr.
- Umístěte PBG kolonu nad ALA kolonu.
- Pipetujte do horní kolony (PBG):

Destilovaná voda	10,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Vzorek	1,0 mL	Ponechte volně protékat ven
Destilovaná voda	20,0 mL	Ponechte volně protékat ven

- Horní kolonu (PBG) umístěte do tmy pro pozdější kvantitativní stanovení PBG.

ALA stanovení

- Pod ALA kolonku umístěte zkumavku (16 x 160 mm) a pipetujte:

Reagent (1)	10,0 mL	Zachyťte eluát
-------------	---------	----------------

- Eluát promíchejte a pipetujte:

	Blank	Standard	Vzorek
ALA Standard (S)	—	—	Eluát
Reagent (1)	10,0 mL	0,1 mL	—
Reagent (A)	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL

- Promíchejte a inkubujte 10 minut ve vařící vodě.
 - Zkumavky ochlaďte pod tekoucí vodou, promíchejte a pipetujte:
- | | | | |
|--------------------|--------|--------|--------|
| Inkubovaná směs | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |
| Ehrlichovo činidlo | 1,0 mL | 1,0 mL | 1,0 mL |
- Pořádně promíchejte, počkejte 15 minut (15-30°C), odečtěte absorbanci (A) vzorku a standardu při 555 nm proti blanku. Zbarvení je stabilní 15 minut.

PBG stanovení (výsledek testu je pouze orientační)

- Pod ALA kolonku umístěte zkumavku (16 x 160 mm) a pipetujte:

Reagent (2)	4,0 mL	Zachyťte eluát
-------------	--------	----------------

- Promíchejte a pipetujte do označených zkumavek:

	Blank	Vzorek
Eluát	—	1,0 mL
Destilovaná voda	1,0 mL	—
Ehrlichovo činidlo	1,0 mL	1,0 mL

- Pořádně promíchejte, počkejte 10 minut (15-30°C), odečtěte absorbanci (A) vzorku a standardu při 555 nm proti blanku. Zbarvení je stabilní 30 minut.

VÝPOČET

Koncentrace ALA se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_{\text{Vzorku}}}{A_{\text{Standardu}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{STC}}}{V_{\text{EC}}} \times C_{\text{ST}} \times \frac{1}{\text{Rec}} = C_{\text{Vzorku}}$$

Objem vzorku (V_S) je 1 ml, objem eluátu (V_E) 10 ml, objem eluátu při kolorimetrickém stanovení (V_{EC}) je 10 ml, objem standardu při kolorimetrickém stanovení (V_{STC}) je 0,1 ml, koncentrace standardu (C_{ST}) je 20,0 mg/dl nebo 1526 $\mu\text{mol/L}$ (také uvedeno na lahvičce) a průměrná výtěžnost (Rec) = 0,81. Následující rovnice uvádí výpočet koncentrace:

$\frac{A_{\text{Vzorku}}}{A_{\text{Standardu}}}$	X 2,46 = mg/dL ALA
	X 188 = $\mu\text{mol/L}$ ALA

Množství ALA za 24 h se vypočítá podle následujícího vzorce:

mg/dL	$\times 10 \times V_{\text{Moče/24 h}} (L) =$	mg/24 h
$\mu\text{mol/L}$	$\times V_{\text{Moče/24 h}} (L) =$	$\mu\text{mol/24 h}$

Koncentrace PBG se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_{\text{Vzorku}}}{\epsilon \times l} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_T}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{\text{Rec}} = C_{\text{Vzorku}}$$

Molární absorpance (ϵ) Ehrlichova produktu z reakce při 555 nm je 0,062 L $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, v kyvetě (l) = 1 cm, objem vzorku (V_S) je 1 mL, objem eluátu (V_E) je 4 mL, celkový reakční objem (V_T) je 2 mL, objem eluátu při kolorimetrii (V_{EC}) je 1 mL a průměrná výtěžnost (Rec) je 0,66. 1 μmol PBG odpovídá 0,226 mg PBG a 1 L = 10 dL. Následující rovnice uvádí výpočet koncentrace:

A_{Vzorku}	x 4,42 = mg/dL PBG
	x 196 = $\mu\text{mol/L}$ PBG

Množství PBG za 24 h se vypočítá podle následujícího vzorce:

mg/dL	$\times 10 \times V_{\text{Moče/24 h}} (L) =$	mg/24 h
$\mu\text{mol/L}$	$\times V_{\text{Moče/24 h}} (L) =$	$\mu\text{mol/24 h}$

NORMÁLNÍ HODNOTY

Moč³: ALA: 1,5 – 7,5 mg/24h = 11,4 – 57,2 $\mu\text{mol/24h}$.

Moč⁴: PBG: 0 – 3,4 mg/24h = 0 – 15 $\mu\text{mol/24 h}$.

Tyto hodnoty jsou pouze orientační. Každá laboratoř by si měla stanovit své vlastní srovnávací hodnoty.

KONTROLA KVALITY:

Pro ověření správnosti měření se doporučuje použít močová kontrola (kat.č. 18036 nebo 18037).

Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

ALA stanovení

- Detekční limit: 0,03 mg/dL = 2,5 $\mu\text{mol/L}$.
- Linearita: nejméně do 6,03 mg/dL = 460 $\mu\text{mol/L}$.
- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Průměrná koncentrace	CV	n
0,41 mg/dL = 31 $\mu\text{mol/L}$	4,2 %	25
2,65 mg/dL = 202 $\mu\text{mol/L}$	2,2 %	25

- Reprodukovatelnost (run to run):

Průměrná koncentrace	CV	n
0,41 mg/dL = 31 $\mu\text{mol/L}$	5,9 %	25
2,65 mg/dL = 202 $\mu\text{mol/L}$	3,7 %	25

- Citlivost: 0,04 mA·dL/mg = 2,7 mA·L/ μmol .

- Správnost: Výsledky získané těmito reagenty neukazují systematické rozdíly ve srovnání s teoretickými koncentracemi. Podrobnosti o těchto srovnávacích studiích jsou na vyžádání k dispozici.
- Interference: Některé potravinové doplňky, léky a další látky mohou interferovat⁵.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

PBG stanovení

- Detekční limit: 0,02 mg/dL = 0,7 $\mu\text{mol/L}$.
- Linearita: nejméně do 4,64 mg/dL = 205 $\mu\text{mol/L}$.
- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Průměrná koncentrace	CV	n
0,09 mg/dL = 3,9 $\mu\text{mol/L}$	7,5 %	25
1,99 mg/dL = 88 $\mu\text{mol/L}$	4,2 %	25

- Reprodukovatelnost (run to run):

Průměrná koncentrace	CV	n
0,09 mg/dL = 3,9 $\mu\text{mol/L}$	12,4 %	25
1,99 mg/dL = 88 $\mu\text{mol/L}$	4,7 %	25

- Správnost: Výsledky získané těmito reagenty neukazují systematické rozdíly ve srovnání s teoretickými koncentracemi. Podrobnosti o těchto srovnávacích studiích jsou na vyžádání k dispozici.
- Interference: Některé potravinové doplňky, léky a další látky mohou interferovat⁵.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Porfyriny jsou genetické abnormality regulace hemo syntézy a jejich největší množství je v jejich hemo prekurzorech jako jsou: 5-aminolevulová kyselina (ALA) a porfobilinogen (PBG) které jsou detekovány v moči.

Při otravě se koncentrace ALA zvyšuje v moči, protože je zablokována ALA metabolická cesta.

Závažnost otravy a způsob určení porfyrinů může být diferenciální měření jak ALA, tak PBG^{4,6}.

Klinická diagnóza by však neměla být uzavřena jen na základě tohoto výsledku, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní výsledky.

POZNÁMKY

1. Dlouhé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení jejich průtoku. Pro obnovu jejich funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechte usadit.

LITERATURA

1. Davis JR, Andelman SL. Urinary Delta-Aminolevulinic Acid (ALA) Levels in Lead Poisoning. *Arch Environ Health* 1967; 15:53-59.
2. Mauzerall, D., and Granick, S.: The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine, *J. Biol. Chem.* 1956, 219: 435-446.
3. Jacques W, Clinical Interpretation of the laboratory tests, 4th ed. Masson 2002.
4. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.

UPOZORNĚNÍ

Překlad pořízen k datu: 26.7.2010

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem. Více informací naleznete na internetové adrese: www.biosystems-sa.com nebo na adrese výhradního distributora pro ČR: www.jktrading.cz

VÝROBCE

BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona (Spain)
ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001
ISO 9001 - TÜV CERT - Reg.: 01 100 6696