



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

Kód 11017	40 testů	<b>KYSELINA 5-AMINOLEVULOVÁ (ALA)/ PORFOBILINOGEN (PBG)</b>  Chromatografie - spektrofotometrie
Skladovat při 2 - 30°C		
Reagencie pro stanovení koncentrace kyseliny aminolevulové a porfobilinogenu. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích		

## 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<sup>1,2</sup>.

## OBSAH A SLOŽENÍ

- Reagencie.** 2 x 350 mL. Octan sodný 1 mol/L.
- Reagencie.** 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 katexu - pryskyřice.
- Reagencie.** 1 x 17 mL. Acetylaceton.  
NEBEZPEČNÝ: H226: Hořlavá kapalina a výpary. H302: Škodlivý při požití. H311 Toxický při kontaktu s kůží. H331 Toxický při inhalaci. P280: Noste ochranné brýle/ ochranný plášť, ochranný štít na obličej. P331: Po požití nevyvolávejte zvracení. P420: Skladujte odděleně od ostatních materiálů.
- Reagencie.** 2 x 50 mL. 4-Dimethylaminobenzaldehyd 6 mmol/L, po rekonstituci.
- Reagencie.** 2 x 50 mL. Kyselina octová 18 mol/L.  
NEBEZPEČNÝ: H226: Hořlavá kapalina a výpary. H314: Způsobuje těžké popáleniny kůže a poškození očí. P303+P361+P353: V případě zasažení kůže (nebo vlasů) odstraňte neprodleně kontaminovaný oděv. Omyjte postižené místo vodou /sprchou. P420: Skladujte odděleně od ostatních materiálů.
- ALA Standard.** 2 ml x 5 mL. ALA 20,0 mg/dL (1526µmol/L) po rekonstituci. Primární standard.

Pro další varování a bezpečnostní opatření čtěte bezpečnostní list (SDS)

## SKLADOVÁNÍ

Skladujte při teplotě 2-30°C. (Poznámka1).  
Reagencie 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 0,120 (ALA) a 0,080 (PBG) při 555 nm v 1 cm kvetě. Mikrokolony (3 a 4) : ztráta (nepřítomnost) pufru nad pryskyřici.

## VAROVÁNÍ A OPATŘENÍ

Při manipulaci se všemi laboratorními činidly dodržujte obvyklá preventivní opatření. Bezpečnostní list je k dispozici pro profesionální uživatele na vyžádání. Likvidace veškerého odpadu by měla být v souladu s místními směrnici. Jakákoli vážná událost, která by mohla nastat v souvislosti s produktem musí být hlášena BioSystems S.A.

## PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

- Kyselina perchlorová 70 % (analytická třída).

## PŘÍPRAVA REAGENTŮ

**Reagencie B:** Přeneste obsah lahvičky B2 do B1 a třepejte do úplného rozpuštění. Roztok je stabilní 6 měsíců při 2-8°C. (Poznámka1).

**Standard (S):** Rozpusťte obsah lahvičky v 5 ml destilované vody. Roztok je stabilní 12 měsíců při 2-8°C. Pro delší skladování zamraďte zředěné v alikvotních podílech.

**Ehrlichovo činidlo:** Přidejte 1,9 mL perchlorové kyseliny (70%) do 10 mL reagencie 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 fotometr s 555 nm filtrem (520-570)
- Kvyeta 1cm
- Varná vodní lázeň

## 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 v případě, že se vzorek skladuje při -20°C. Před testováním vzorek centrifugujte nebo přefiltrujte.

## POSTUP

### Chromatografická separace

- Odstraňte horní uzávěr PBG mikrokolony (3) a ALA mikrokolony (4). Pak otevřete uzávěr její spodní části. Zatlačte horní disk, který uzavírá pryskyřici tupým předmětem (skleněnou tyčinkou) těsně nad její povrch. Nestlačujte pryskyřici! Kapalinu nad pryskyřici nechte prokapat z kolony ven 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 a pipetujte:

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

- Eluát promíchejte a pipetujte:

	Blank	Standard	Vzorek
ALA Standard (S)	-	-	Eluát
Reagencie (1)	10,0 mL	0,1 mL	-
Reagencie (A)	0,2 mL	9,9 mL	-
		0,2 mL	0,2 mL

- Promíchejte a inkubujte 10 minut ve vařící vodě.
- Zkumavky ochlaďte pod tekoucí vodou, promíchejte a pipetujte do označených zkumavek:

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 30 minut.

### PBG stanovení (výsledek testu je pouze orientační)

- Pod PBG kolonku umístěte zkumavku a pipetujte:

Reagencie (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



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

Kód 11017	40 testů	<b>KYSELINA 5-AMINOLEVULOVÁ (ALA)/ PORFOBILINOGEN (PBG)</b>  Chromatografie - spektrofotometrie
Skladovat při 2 - 30°C		
Reagencie pro stanovení koncentrace kyseliny aminolevulové a porfobilinogenu. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích		

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

### VÝPOČET

Koncentrace ALA se vypočítá podle vzorce:

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

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

Koncentrace PBG se vypočítá podle vzorce:

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

Molární absorbance ( $\epsilon$ ) produktu z Ehrlichovy z reakce při 555 nm je 0,062  $L \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , v květetě ( $l$ ) = 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  $\mu\text{mol}$  PBG odpovídá 0,226 mg PBG a 1 L = 10 dL. Následující rovnice uvádí výpočet koncentrace:

$A_{\text{Vzorku}}$	x 5,76 = mg/dL PBG x 255 = $\mu\text{mol/L}$ PBG
---------------------	---

Množství PBG za 24 h se vypočítá podle následujícího vzorce:

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

### REFERENČNÍ HODNOTY

Moč<sup>3</sup>: ALA: 1,5 – 7,5 mg/24h = 11,4 – 57,2  $\mu\text{mol/24h}$ .

Moč<sup>4</sup>: 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 svojí 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: 20,6 mA.dL/mg = 2,7 mA.L/ $\mu\text{mol}$ .
- Správnost: Výsledky získané těmito reagensy neukazují systematické rozdíly ve srovnání s teoretickými koncentracemi. Podrobnosti o těchto srovnávacích studiích jsou na vyžádání k dispozici.
- Interference: Některé složky potravin, léky a další látky mohou interferovat<sup>5</sup>.

### 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 reagensy neukazují systematické rozdíly ve srovnání s teoretickými koncentracemi. Podrobnosti o těchto srovnávacích studiích jsou na vyžádání k dispozici.
- Interference: Některé složky potravin, léky a další látky mohou interferovat<sup>5</sup>.

### DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

**Porfyrie** je skupina metabolických onemocnění, u nichž se projevuje porucha funkce enzymů řídících syntézu hemu v červených krvinkách. V moči se hromadí 5-aminolevulová kyselina (ALA) a porfobilinogen (PBG).

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

Otravu olovem a porfyrii lze rozlišit měřením jak ALA, tak PBG<sup>4,6</sup>.

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

### POZNÁMKA

1. Jestliže jsou komponenty B2 a B skladovány při 2 – 8°C, můžou krystalizovat. Před použitím je vytemperujte je na pokojovou teplotu abyste získali homogenní roztok.

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

Kód 11017	40 testů	<b>KYSELINA 5-AMINOLEVULOVÁ (ALA)/ PORFOBILINOGEN (PBG)</b>
Skladovat při 2 - 30°C		
Reagencie pro stanovení koncentrace kyseliny aminolevulové a porfobilinogenu. Pouze pro in vitro diagnostiku v klinických laboratořích		
Chromatografie - spektrofotometrie		

**POZNÁMKA distributora**

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 nechejte usadit. Kolona je připravena k použití.

**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  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine, J. Biol. Chem. 1956, 219: 435-446.
3. Jacques W, Clinical Interpretation of the laboratory tests. 4<sup>a</sup> ed. Masson, 2002.
4. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, WB Saunders Co, 2005.
5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5<sup>th</sup> ed. AACC Press, 2000.
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4rd ed. AACC Press, 2001.

**UPOZORNĚNÍ**

Překlad revidován k datu: 10.7.2020.

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem porovnáním podle identifikačního čísla návodu uvedeném v zápatí.

Originální návod najdete v soupravě a na internetové adrese: [www.biosystems.es](http://www.biosystems.es).

Český návod a bezpečnostní listy jsou k dispozici na: [www.jktrading.cz](http://www.jktrading.cz)

**Výhradní distributor :**

**ČR** : JK-Trading spol.s.r.o., Křivatcová 421/5, 150 21 Praha5,  
tel.: +420 257 220 760  
**SK** : JK-Trading spol.s.r.o., Dlhá 43, 900 31, Stupava  
tel.: + 421 264 774 591

V případě mimořádných událostí:

**ČR** : Toxikologické informační středisko (TIS), klinika pracovního lékařství VFN a LF UK,  
tel.: +420 224 91 92 93 a +420 224 91 54 02  
**SK** : Toxikologické informační centrum Bratislava, 833 05, Limbová 5, tel.: +421 254 774 166