



Kyselina 5 – aminolevulová (ALA) / Porfobilinogén(PBG)

Kód 11017 40 testov	Kyselina 5 - aminolevulová (ALA) / porfobilinogén (PBG)
Skladovanie pri 2 - 30°C	
Reagencie pre stanovenie koncentrácie kyseliny 5-aminolevulovej a porfobilinogénu Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

Chromatografia – spektrofotometria

PRINCÍP METÓDY

Vzorka prechádza postupne dvomi chromatografickými kolónami. Prvá z nich obsahuje anex, ktorý zachytí porfobilinogén (PBG), druhá kolóna obsahuje katex a zachytí kyselinu 5 – aminolevulovú (ALA). Potom nasleduje premytie, pri ktorom sa odstránia interferujúce častice a zachytia sa obidva analyty. Kvantifikácia sa uskutočňuje spektrofotometricky pri 555nm prostredníctvom Ehrlichovej reakcie.^{1,2}

OBSAH A ZLOŽENIE

- 1. Reagencia.** 2 x 350 mL. Octan sodný 1 mol/L.
 - 2. Reagencia.** 1X175 ml. Kyselina octová 1 mol/L.
 - 3. PBG mikrokolóny.** 2 x 20. Obsahujú navážené množstvo pufovaného anexu- živice.
 - 4. ALA mikrokolóny.** 2 x 20. Obsahujú navážené množstvo pufovaného katexu- živice.
- A. Reagencia.** 1 x 17 mL. Acetylaceton.
Varovanie : H226: Horľavá kvapalina a výpary.
H302: Škodlivý pri požití. H311 Toxický pri kontakte s kožou. H331 Toxický pri inhalácii. P280: Noste ochranné okuliare/ ochranný plášť, ochranný štít na tvár P331: Po požití nevyvolávajte zvracanie. P420: Skladujte oddelene od ostatných materiálov.
- B1. Reagencia.** 2 x 50 mL. 4-Dimetylaminobenzaldehyd 6 mmol/L, po rekonštitúcii.
- B2. Reagencia.** 2 x 50 mL. Kyselina octová 18 mol/L.
Varovanie: H226: Horľavá kvapalina a výpary.
H314: Spôsobuje ťažké popáleniny kože a poškodenie očí. P303+P361+P353: V prípade zasiahnutia kože (alebo vlasov) ihneď odstráňte kontaminovaný odev. Omyte postihnuté miesto vodou /sprchou. P420: Skladujte oddelene od ostatných materiálov.
- S. ALA Štandard.** 2 ml x 5 mL. ALA 20,0 mg/ dl (1526 µmol/ l) po rekonštitúcii. Primárny štandard.

Ďalšie varovania a upozornenia – viď bezpečnostný list.

SKLADOVANIE

Składujte pri 2 – 30°C. (Poznámka1)
Reagencie a štandard sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu používania.

Príznaky zhoršenia kvality :

- Reagencie : Prítomnosť zrazeniny, zákalu , absorbanca reagencie blank je nad 0,120 (ALA) a 0,08 (PBG) pri 555nm (1cm kyveta)
- Mikrokolóny (3 a 4) : neprítomnosť pufru nad krycím diskom živice.

VAROVANIE A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA

Dodržiavajte bežné preventívne opatrenia potrebné na zaobchádzanie so všetkými laboratórnymi činidlami. Bezpečnostný list je pre profesionálnych užívateľov na požiadanie k dispozícii. Likvidácia všetkého odpadu by mala byť v súlade s miestnymi predpismi. Akúkoľvek vážnu udalosť, ktorá by sa mohla vyskytnúť

v súvislosti so súpravou, nahláste BioSystems S.A.

PRÍDAVNÉ REAGENCIE

- kyselina perchlorová 70% p.a.

PRÍPRAVA REAGENCIÍ

Reagencia B : Preneste obsah fľaštičky B2 do B1 a miešajte do úplného rozpustenia. Stabilita – 6 mesiacov pri 2 – 8°C. (Poznámka1)

Štandard (S): Rozpusťte v 5 ml destilovanej vody. Stabilita : 12 mesiacov pri 2 – 8°C. Pre dlhšie skladovanie zamrazte zriadené v alikvotných podieloch. Zamraziť iba raz.

Ehrlichovo činidlo : pridajte 1,9 ml kyseliny perchlorovej (70%) do 10ml reagencie B a pretrepávajte do dosiahnutia homogénnej zmesi. Stabilita – 7 hodín pri izbovej teplote 15 – 30°C. Väčší objem pripravte v rovnakom pomere.

PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- Spektrofotometer alebo fotometer s filtrom 555nm (520-570).
- Termostatický vodný kúpeľ
- Kyveta 1cm.

VZORKY

Moč. 24 hodinové vzorky odobrané štandardným spôsobom. Upravte pH vzorky na 6 pomocou HCl. Chráňte pred svetlom. ALA je stabilná 1 mesiac a PBG maximum 24 hodín pri 2-8°C. Ak sa skladuje vzorka pri – 20°C, je PBG je stabilný 1 mesiac . Pred testovaním vzorku centrifugujte alebo filtrujte.

POSTUP

Príprava vzorky

Chromatografická separácia

1. Na každú vzorku použite jednu ALA (4) a jednu PBG (3) kolónu. Najprv odstráňte horný uzáver kolóny , potom uzáver v jej spodnej časti. Pomocou okrúhleho konca pipety zatlačte horný filter smerom dole k povrchu živice tak, aby ste ju príliš nestlačili. Všetku kvapalinu nechajte volne vytečť von.
2. Umiestnite PBG kolónu nad ALA kolónu.
3. Do vrchnej kolóny (PBG) pipetujte :

Destilovaná voda	10,0 ml	nechajte volne vytečť von
Vzorka	1,0 ml	nechajte volne vytečť von
Destilovaná voda	20,0 ml	nechajte volne vytečť von

4. Odložte vrchnú kolónu (PBG) do tmy , aby ste mohli neskôr PBG kvantifikovať.

ALA stanovenie

5. Pod ALA kolónu umiestnite skúmavku a pipetujte:

Reagencia (1)	10,0 ml	Zachyťte eluát
---------------	---------	----------------

6. Eluát riadne premiešajte a pipetujte :



Kyselina 5 – aminolevulová (ALA) / Porfobilinogén(PBG)

Kód 11017	40 testov	Kyselina 5 - aminolevulová (ALA) / porfobilinogén (PBG) Chromatografia – spektrofotometria
Skladovanie pri 2 - 30°C		
Reagencie pre stanovenie koncentrácie kyseliny 5-aminolevulovej a porfobilinogénu Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

	blank	štandard	vzorka
	-	-	Eluát
ALA štandard (S)	-	0,1 ml	-
Reagencia (1)	10,0 ml	9,9 ml	-
Reagencia (A)	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml

7. Riadne premiešajte a vložte do vriaceho kúpeľa na 10 minút.

8. Skúmavku vychladte pod tečúcou vodou, riadne premiešajte a pipetujte do označenej testovacej skúmavky :

Inkubovaná zmes	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Ehrlichovo činidlo	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

9. Riadne premiešajte, nechajte stáť 15 minút pri 15 – 30°C a odčítajte absorbančiu (A) vzorky a štandardu pri 555nm oproti blanku. Absorbancia je stabilná 30 minút.

Stanovenie PBG (tento test je orientačný)

10. Pod kolónu PBG umiestnite skúmavku a pipetujte :

Reagencia (2)	4,0 ml	Zachyťte eluát
---------------	--------	----------------

11. Riadne premiešajte a pipetujte do označenej testovacej skúmavky :

	Blank	vzorka
Eluát	-	1,0 ml
Destilovaná voda	1,0 ml	-
Ehrlichov reagent	1,0 ml	1,0 ml

12. Riadne premiešajte, nechajte stáť 10 minút pri 15 – 30°C a odčítajte absorbančiu (A) vzorky oproti blanku pri 555nm. Absorbancia je stabilná 30 minút.

VÝPOČET

Koncentrácia ALA vo vzorke sa vypočíta :

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

Objem vzorky (V_S) je 1ml, objem eluátu (V_E) je 10ml, objem eluátu pri kolorimetrii (V_{EC}) je 10 ml, objem štandardu pri kolorimetrii (V_{st}) je 0,1ml, koncentrácia štandardu (C_{st}) je 20,0 mg/dl alebo 1526 $\mu\text{mol/l}$ a priemerná výťažnosť (R_{EC}) je 0,81.

Nasledujúci vzorec slúži pre výpočet koncentrácie :

$$\frac{A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Standard}}} \left| \begin{array}{l} \times 2.46 = \text{mg/dL ALA} \\ \times 188 = \mu\text{mol/L ALA} \end{array} \right.$$

Množstvo ALA v 24 hodinovej vzorke moči sa vypočíta :

mg/dl	$\times 10 \times V_{\text{moč}/24 \text{ hodín}} (L) =$	mg/24 hodín
$\mu\text{mol/l}$	$\times V_{\text{moč}/24 \text{ hodín}} (L) =$	$\mu\text{mol} / 24 \text{ hodín}$

Koncentrácia PBG vo vzorke sa vypočíta :

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

Molárna absorbančia (ϵ) produktu Ehrlichovej reakcie pri 555nm je 0,062 L. $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, (l) kyveta je 1 cm, objem vzorky (V_S) je 1 ml, objem eluátu (V_E) je 4 ml, celkový reakčný objem (V_T) je 2 ml, objem eluátu v kolorimetrii (V_{EC}) je 1ml a priemerná výťažnosť (R_{EC}) je 0,86. Keď 1 μmol PBG je 0,226 mg PBG a 1 l je 10dl, nasledujúci vzorec slúži pre výpočet koncentrácie :

$$A_{\text{vzorky}} \left| \begin{array}{l} \times 5,76 = \text{mg/dl PBG} \\ \times 225 = \mu\text{mol/l PBG} \end{array} \right.$$

Množstvo PBG v 24 hodinovom moči sa vypočíta podľa vzorca :

mg/dl	$\times 10 \times V_{\text{moč}/24 \text{ hod}} (L) =$	mg/24 hod
$\mu\text{mol/l}$	$\times V_{\text{moč}/24 \text{ hod}} (L) =$	$\mu\text{mol}/24 \text{ hod}$

REFERENČNÉ HODNOTY

Moč³ : ALA : 1,5 – 7,5 mg/24 h = 11,4 – 57,2 $\mu\text{mol}/24 \text{ h}$.
 Moč⁴ : PBG : 0 – 3,4 mg/24 h = 0 – 15 $\mu\text{mol}/24 \text{ h}$.
 Tieto hodnoty sú iba orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoje vlastné, normálne rozmedzie.

KONTROLA KVALITY

Pre overenie správnosti merania sa odporúča použiť Kontrolný moč (kód 18036 a 18037). Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre



Kyselina 5 – aminolevulová (ALA) / Porfobilinogén(PBG)

Kód 11017 40 testov	Kyselina 5 - aminolevulová (ALA) / porfobilinogén (PBG) Chromatografia – spektrofotometria
Skladovanie pri 2 - 30°C	
Reagencie pre stanovenie koncentrácie kyseliny 5-aminolevulovej a porfobilinogénu Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovenie ALA

- detekčný limit : 0,03mg/l = 2,5 µmol/l
- linearita : 6,03mg/l = 460 µmol/l
- opakovateľnosť (jednej vzorky) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
0,41mg/l = 31 µmol/l	4,2%	25
2,65mg/l = 202 µmol/l	2,2%	25

- reprodukovateľnosť (run to run) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
0,41mg/l = 31 µmol/l	5,9%	25
2,65mg/l = 202 µmol/l	3,7%	25

- citlivosť : 20,6 mA.L/mg = 2,7 mA.L/µmol
- správnosť : výsledky získané touto súpravou pri porovnaní s teoretickými hodnotami nevykazovali systematické rozdiely. Podrobnosti o porovnávačej skúške sú k dispozícii na vyžiadanie .
- interferencie : Interferovať môžu niektoré zložky potravín, lieky a ďalšie látky⁵.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

Stanovenie PBG

- detekčný limit : 0,02mg/l = 0,7 µmol/l
- linearita : 4,64mg/l = 205 µmol/l
- opakovateľnosť (jednej vzorky) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
0,09mg/l = 3,9 µmol/l	7,5%	25
1,99mg/l = 88 µmol/l	4,2%	25

- reprodukovateľnosť (run to run) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
0,09mg/l = 3,9 µmol/l	12,4%	25
1,99mg/l = 88 µmol/l	4,7%	25

- správnosť : výsledky získané touto súpravou pri porovnaní s teoretickými hodnotami nevykazovali systematické rozdiely. Podrobnosti o porovnávačej skúške sú k dispozícii na vyžiadanie .
- interferencie : Interferovať môžu niektoré zložky potravín, lieky a ďalšie látky⁵.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

Porfýria je genetická abnormalita v regulácii syntézy hemu, pri ktorej sa vyskytujú zvýšené hladiny prekurzorov hemu, ako je kyselina 5- aminolevulová a porfobilinogén v moči. Pri otravách olovom koncentrácia ALA v moči vzrastá, pretože olovo blokuje ALA metabolickú cestu. Otrava olovom a porfýria môžu byť rozlíšené kvantifikáciou ALA a PBG.^{4,6} Klinická diagnóza nemôže byť stanovená na základe výsledkov jedného testu, ale je potrebné vziať v úvahu jak klinické, tak laboratórne údaje.

POZNÁMKA

1.Komponenty B2 a B môžu kryštalizovať ak sú skladované pri teplote 2 - 8°C . Pred použitím ich vytemperujte, aby ste získali homogénny roztok.

POZNÁMKA distribútora

1. Dlhodobé uskladnenie koloniek vedie k stlačeniu živice a tým i ku spomaleniu ich prietoku. Pre obnovu ich funkcie obráťte kolónu pred stanovením na 10 minút tak, aby sa živica presypala. Potom kolónu umiestnite do pracovnej polohy a živicu nechejte usadiť. Kolóna je pripravená k použitiu.

LITERATÚRA

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. 4^a 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, 5th ed. AACC Press, 2000.
6. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4rd ed. AACC Press, 2001.

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 16.7.2020
Vzhľadom k možnej inovácii výrobu sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v



Kyselina 5 – aminolevulová (ALA) / Porfobilinogén(PBG)

Kód 11017 40 testov	Kyselina 5 - aminolevulová (ALA) / porfobilinogén (PBG)
Skladovanie pri 2 - 30°C	
Reagencie pre stanovenie koncentrácie kyseliny 5-aminolevulovej a porfobilinogénu Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	
Chromatografia – spektrofotometria	

zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese www.biosystems.es.

Slovenský návod je k dispozícii na www.jktrading.cz

Výhradný distribútor:

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 prípade mimoriadnych udalostí:

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 informačné centrum Bratislava, 833 05,
Limbová 5, tel.: +421 254 774 166