



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

Kód 11017	40 testů	KYSELINA 5-AMINOLEVULOVÁ (ALA)/ PORFOBILINOGEN (PBG) Chromatografie - spektrofotometrie
Skladovat při 2 - 30°C		
Reagenty 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^{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 katexu - pryskyřice.
- Reagent.** 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.
- Reagent.** 2 x 50 mL. 4-Dimethylaminobenzaldehyd 6 mmol/L, po rekonstituci.
- Reagent.** 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 neprodlně 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).
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 0,120 (ALA) a 0,080 (PBG) při 555 nm v 1 cm kyvetě.
Mikrokolony (3 a 4) : ztráta (nepřítomnost) pufru nad pryskyřicí.

PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

- Kyselina perchlorová 70 % (analytická třída).

PŘÍPRAVA REAGENTŮ

Reagent B: Přeneste obsah lahvičky B2 do B1 a třeptejte do úplného rozpustění. 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 reagentu B. Protřeptejte 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)
- kyveta 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 pryskyřicí nechejte 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:

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 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:

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 při 555 nm proti blanku. Zbarvení je stabilní 30 minut.

VÝPOČET

Koncentrace ALA se vypočítá podle vzorce:

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



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

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

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_{ST}) 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 (R_{EC}) = 0,81. Následující rovnice uvádí výpočet koncentrace:

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

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:

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

Molární absorpance (ϵ) produktu z Ehrlichovy z reakce při 555 nm je 0,062 $\text{L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 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}	$\times 4,42 = \text{mg/dL PBG}$ $\times 196 = \mu\text{mol/L PBG}$
---------------------	--

Množství PBG za 24 h se vypočítá podle následujícího vzorce:

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

REFERENČNÍ 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 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/ 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 složky potravin, 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 složky potravin, léky a další látky mohou interferovat⁵.

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^{4,6}.

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

POZNÁMKA

- 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.

POZNÁMKA distributora

- 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. Kolona je připravena k použití.

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

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

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. 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.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 18.1.2019.

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.

Český návod a bezpečnostní listy jsou k dispozici na: www.iktrading.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., Mečíkova 30, 841 07 Bratislava,
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