

ALA

Determinazione Cromatografico – Colorimetrica
dell'Acido δ-Aminolevulinico
nelle Urine

20 test

REF KR01-20

USO PREVISTO

Kit per la determinazione quantitativa in vitro dell'Acido δ-Aminolevulinico nelle urine.

PRINCIPIO

Nella biosintesi dell'emoglobina il piombo inibisce l'attività dell'enzima ALA deidrasi, il quale catalizza la condensazione di due molecole di ALA (acido δ-aminolevulinico) per formare una molecola di PBG (porfobilinogeno). Nella intossicazione da piombo solo una piccola parte di ALA viene utilizzata per la sintesi dell'emoglobina, mentre la maggior parte viene riversata nell'urina. L'aumento di ALA urinario è quindi l'indice più sicuro per stimare l'avvenuto avvelenamento da piombo.

Nello screening dei lavoratori esposti al piombo si è finora usato determinare contemporaneamente il PBG e l'ALA urinario.

In base a recenti studi la determinazione del PBG ha perduto valore diagnostico poiché è stato accertato che la concentrazione del PBG nei campioni di urina dei lavoratori esposti al piombo è molto bassa o addirittura nulla come nei soggetti normali non esposti al piombo.

Quindi l'ALA urinario può essere determinato validamente senza prima rimuovere il PBG per passaggio su una colonna di resina anionica. Si utilizza una sola colonna di resina cationica, su cui l'ALA viene adsorbito. Dopo lavaggio delle sostanze interferenti, esso viene eluito e determinato quantitativamente mediante la reazione di Ehrlich.

REAGENTI E COLONNE

Composizione del kit:

REAGENT 1 Sodio acetato	Codice KR01-20 2 x 60 ml
*REAGENT 2 Acetilacetone	1 x 1.5 ml
REAGENT 3/A DMAB (predosato)	1 flacone
*REAGENT 3/B Acido acetico	1 x 25 ml
*REAGENT 3/C Acido perclorico	1 x 5 ml
REAGENT 4 Standard acido δ-aminolevulinico 0.2 g/L	1 x 1 ml
COLUMNS Colonne cromatografiche	20

(*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le Schede di sicurezza.

STABILITÀ: i reagenti e le colonne sigillati sono stabili a 2-8°C fino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

STRUMENTAZIONE NECESSARIA

Bagnomaria 100°C

Spettrofotometro o fotometro a filtri a 553 nm (520-570 nm)

PREPARAZIONE DEI REAGENTI DI LAVORO

REAGENTE 3 (3/A + 3/B)

Sciogliere il contenuto di un flacone di Reagente 3/A nel flacone di Reagente 3/B e agitare fino a completa solubilizzazione.

STABILITÀ: 6 mesi a 2-8°C.

REAGENTE DI EHRLICH (3/C + 3)

Aggiungere 1.9 ml. di Reagente 3/C a 10 ml di Reagente 3 e agitare sino ad ottenere una soluzione omogenea. La soluzione così preparata è sufficiente per 11 determinazioni. Quantità maggiori possono essere preparate, se necessario, tenendo conto che ogni colonna necessita di 1 ml di questo reagente.

STABILITÀ: 6 ore a temperatura ambiente.

CAMPIONE

Urine delle 24 ore.

Raccogliere le urine ed aggiungere acido cloridrico concentrato fino a che il relativo pH sia inferiore a 6.

Mescolare le urine, misurarne il volume e conservarle a 2-8°C. STABILITÀ: almeno un mese a 2-8°C e a pH < 6.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda:	553 nm (520 - 570 nm)
Cammino ottico:	1 cm
Lettura:	contro bianco reagente
Temperatura:	bagnomaria bollente
Metodo:	colorimetrico end point
Linearità:	fino a 6 mg/100 ml
Sensibilità:	0.1 mg/100 ml
C.V. (intra-assay):	2%
C.V. (inter-assay):	3%

PREPARAZIONE DELLA COLONNA

Togliere il tappo superiore e quindi spezzare la lancetta di chiusura inferiore della colonna.

Lasciare defluire completamente il liquido scartandolo.

SEPARAZIONE CROMATOGRAFICA

Pipettare nella colonna:

Acqua distillata	5.0 ml	scartare l'eluato
Urine	0.5 ml	scartare l'eluato
Acqua distillata	10.0 ml	scartare l'eluato

Porre la colonna sopra una provetta pulita e pipettare nella colonna:

Reagente 1	5.0 ml	raccogliere l'ELUATO ALA
------------	--------	--------------------------

REAZIONE COLORIMETRICA

Mescolare con cura l'eluato raccolto e pipettare in 3 provette contraddistinte:

	Bianco reagente	Campione	Standard
ELUATO ALA	---	2 ml	---
Reagente 4 standard	---	---	0.02 ml
Reagente 1	2 ml	---	1.98 ml
Reagente 2	0.04 ml	0.04 ml	0.04 ml

Agitare energicamente ed incubare le provette in bagnomaria bollente per 10 minuti. Raffreddare quindi in acqua corrente, mescolare bene e pipettare in 3 nuove provette:

Aliquota prelevata	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Reagente di Ehrlich	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml

Mescolare ed incubare a temperatura ambiente per 15 minuti. Leggere le assorbanze del campione (Ac) e dello standard (Ast) contro bianco reagente, preferibilmente entro 5-10 minuti. La colorazione che si sviluppa raggiunge la massima intensità dopo 15 minuti, ed è stabile per 15 minuti.

CALCOLO

Acido δ-aminolevulinico (mg/100 ml) = (A campione/A standard) x 2

mg ALA/100 ml x 10 x L di urine 24 ore = mg ALA/24 ore

VALORI DI RIFERIMENTO

Acido δ-aminolevulinico: fino a 0.60 mg/100 ml

OSSERVAZIONI

1. Indicazione del grado di intossicazione da piombo:

ALA (mg/100 ml)	Entità dell'intossicazione
< 0.60	Assente
0.60 - 1.50	Moderata
1.50 - 3.00	Severa
3.00 - 6.00	Grave
> 6.00	Gravissima

2. Le quantità dei reagenti sono sufficienti per effettuare 28 test (20 campioni, 4 standard e 4 bianco).

3. Confrontando il kit FAR (y) per la determinazione dell'ALA rispetto ad un metodo diretto si è ottenuto un coefficiente di correlazione pari a 0.989.

BIBLIOGRAFIA

1. K. Tomokuni, M. Ichiba, Y. Hirai et T. Hasegawa, Clin. Chem., 33 (9), 1665-1667 (1987)

Edizione apr 03 RR Rev. 1



Edizione 02 - marzo 2022



FAR srl

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

Tel. +39 045 6700870 - Fax +39 045 7157763

sito web: <http://www.fardiag.com> e-mail: fardiag@fardiag.com