



# 5-AMINOLEVULINIC ACID (ALA)/PORPHOBILINOGEN (PBG)

COD 11017 40 determinaciones
CONSERVAR A 15-30°C
Reactivos para medir la concentración de ácido 5-aminolevulínico y porfobilinógeno. Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

## ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO (ALA)/PORFOBILINÓGENO (PBG)

Cromatográfica - espectrofotométrica

### FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La muestra se pasa consecutivamente a través de dos microcolumnas que contienen resinas de intercambio iónico: la primera retiene el porfobilinógeno (PBG), la segunda retiene el ácido 5-aminolevulínico (ALA). Una vez eliminadas las interferencias por lavado, se eluyen el ALA y el PBG y se determinan espectrofotométricamente a partir de la absorbancia a 555 nm del producto de la reacción de Ehrlich <sup>1,2</sup>.

### CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

- Reactivo.** 2 x 350 mL. Acetato de sodio 1 mol/L.
  - Reactivo.** 1 x 175 mL. Ácido acético 1 mol/L.
  - Microcolumnas PBG.** 2 x 20. Contienen resina de intercambio aniónico equilibrada.
  - Microcolumnas ALA.** 2 x 20. Contienen resina de intercambio catiónico equilibrada.
- A. Reactivo.** 1 x 17 mL. Acetilacetona.  
*Nocivo (Xn): R10: Inflamable. R22: Nocivo por ingestión. S21: No fumar durante su utilización. S23.2: No respirar los vapores. S24/25: Evítese el contacto con los ojos y la piel.*
- B1. Reactivo.** 2 para 50 mL. Polvo de 4-dimetilaminobenzaldehído, 6 mmol/L una vez disuelto.  
*Nocivo (Xn): R22: Nocivo por ingestión. R36/37/38: Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S36/37/39: Usen indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.*
- B2. Reactivo.** 2 x 50 mL. Ácido acético 18 mol/L.  
*Corrosivo (C): R10: Inflamable. R35: Provoca quemaduras graves. S23.2: No respirar los vapores. S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico. S45: En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico (si es posible, muéstrela la etiqueta).*
- S Patrón de ALA.** 2 para 5 mL. La concentración del patrón reconstituido viene indicada en la etiqueta del vial.

### CONSERVACIÓN

Conservar a 15-30°C.

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

#### Indicaciones de deterioro:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez, absorbancia del blanco de reactivo superior a 0,060 (ALA) y 0,025 (PBG) a 555 nm (cubeta de 1 cm).
- Microcolumnas (3 y 4): Ausencia de tampón sobre el filtro superior.

### REACTIVOS AUXILIARES

- Ácido perclórico al 70 % de grado analítico.

### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Reactivo B:** Transferir el contenido del frasco B2 al B1 y agitar hasta disolución completa. Estable 6 meses a 2-8°C.

**Patrón (S):** Disolver en 5 mL de agua destilada. Estable 12 meses a 2-8°C.

**Reactivo de Ehrlich:** Añadir 1,9 mL de ácido perclórico (70%) a 10 mL de Reactivo B, agitar hasta obtener una mezcla homogénea. Estable 7 horas a temperatura ambiente (15-30°C). Para preparar más cantidad mantener la misma proporción de reactivos.

### EQUIPO ADICIONAL

- Espectrofotómetro o fotómetro para lecturas a 555 nm (520-570).
- Baño de agua hirviendo.
- Cuvas de 1 cm de paso de luz.

### MUESTRAS

Orina de 24 horas recogida mediante procedimientos estándar.

Ajustar el pH alrededor de 6 con ácido clorhídrico concentrado.

Conservar resguardado de la luz. El ALA es estable 1 mes y el PBG durante 24 horas a 2-8°C. El PBG es estable durante un mes si se conserva la muestra a -20°C. Centrifugar o filtrar antes de iniciar la determinación.

### PROCEDIMIENTO

#### Separación cromatográfica

- Tomar una Microcolumna de PBG (3) y una Microcolumna de ALA (4) por muestra. Destapar las Microcolumnas, romper la lengüeta inferior y bajar el filtro hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla. Dejar pasar todo el sobrenadante desechando los eluidos.
- Colocar la columna de PBG sobre la de ALA.
- Pipetear sobre la columna superior (PBG):

Agua destilada	10,0 mL	Desechar el eluido
Muestra	1,0 mL	Desechar el eluido
Agua destilada	20,0 mL	Desechar el eluido

- Separar la columna superior (PBG) y guardarla en la oscuridad para cuantificar posteriormente el PBG.

#### Determinación del ALA

- Colocar la columna de ALA sobre un tubo y pipetear:

Reactivo (1)	10,0 mL	Recoger el eluido
--------------	---------	-------------------

- Agitar bien el eluido y pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón de ALA (S)	—	—	Eluido
Reactivo (1)	10,0 mL	0,1 mL	—
Reactivo (A)	0,2 mL	9,9 mL	—
		0,2 mL	0,2 mL

- Agitar bien e incubar durante 10 minutos en un baño de agua hirviendo.
- Enfriar los tubos en agua corriente, agitar bien y pipetear en una serie de tubos:

Incubados	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Reactivo de Ehrlich	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien, esperar 15 minutos a temperatura ambiente (15-30°C) y leer la absorbancia (A) de la muestra y del patrón frente al blanco a 555 nm. El color es estable durante aproximadamente 30 minutos.

#### Determinación del PBG (esta determinación debe considerarse orientativa)

- Colocar la columna de PBG sobre un tubo y pipetear:

Reactivo (2)	4,0 mL	Recoger el eluido
--------------	--------	-------------------

- Agitar bien y pipetear en una serie de tubos:

	Blanco	Muestra
Eluido	—	1,0 mL
Agua destilada	1,0 mL	—
Reactivo de Ehrlich	1,0 mL	1,0 mL

12. Agitar bien, esperar 10 minutos (15-30°C) y leer la absorbancia (A) de la muestra frente al blanco a 555 nm. El color es estable durante aproximadamente 30 minutos.

## CÁLCULOS

### Cálculo de la concentración de ALA

La concentración de ALA en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times \frac{V_E}{V_M} \times \frac{V_{PC}}{V_{EC}} \times C_P \times \frac{1}{\text{Rec}} = C_{\text{Muestra}}$$

El volumen de muestra ( $V_M$ ) es 1 mL, el volumen de eluido ( $V_E$ ) es 10 mL, el volumen de eluido en la colorimetría ( $V_{EC}$ ) es 10 mL, el volumen de Patrón en la colorimetría ( $V_{PC}$ ) es 0,1 mL, la concentración del Patrón ( $C_P$ ) viene indicada en la etiqueta del vial y la media de la recuperación (Rec) es 0,81. Se deduce la siguiente fórmula para calcular la concentración:

$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_P$	$\times 0,123 = C_{\text{Muestra}}$
---	-------------------------------------

La cantidad de ALA en la orina de 24 horas se calcula según las siguientes fórmulas generales:

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

### Cálculo de la concentración de PBG:

La concentración de PBG en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

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

El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) del producto de la reacción de Ehrlich a 555 nm es  $0,062 \text{ L} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , el paso de luz (l) es 1 cm, el volumen de muestra ( $V_M$ ) es 1 mL, el volumen de eluido ( $V_E$ ) es 4 mL, el volumen total de reacción ( $V_T$ ) es 2 mL, el volumen de eluido en la colorimetría ( $V_{EC}$ ) es 1 mL y la media de la recuperación (Rec) es 0,66. Teniendo en cuenta que  $1 \mu\text{mol}$  de PBG son  $0,226 \text{ mg}$  de PBG y  $1 \text{ L}$  son  $10 \text{ dL}$ , se deducen las siguientes fórmulas para calcular la concentración:

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

La cantidad de PBG en la orina de 24 horas se calcula según las siguientes fórmulas generales:

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

## VALORES DE REFERENCIA

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

Orina<sup>4</sup>: PBG: 0 - 3,4 mg/24h = 0 - 15  $\mu\text{mol}/24\text{h}$ .

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

## CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de la Orina Control (cod. 18036 y 18037) para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

## CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

### Determinación de ALA

- Límite de detección: 0,03 mg/dL = 2,5  $\mu\text{mol/L}$ .
- Límite de linealidad: por lo menos hasta concentraciones de 6,03 mg/dL = 460  $\mu\text{mol/L}$ .

- Repetibilidad (intraserie):

Concentración media	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

- Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	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

- Sensibilidad: 20,6 mA·L/mg = 2,7 mA·L/ $\mu\text{mol}$ .

- Veracidad: En la determinación de muestras cargadas con distintas concentraciones de ALA, los resultados no muestran diferencias sistemáticas con las concentraciones teóricas. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

- Interferencias: Algunos alimentos, medicamentos y sustancias pueden interferir<sup>5</sup>.

### Determinación de PBG

- Límite de detección: 0,02 mg/dL = 0,7  $\mu\text{mol/L}$ .

- Linealidad: por lo menos hasta concentraciones de 4,64 mg/dL = 205  $\mu\text{mol/L}$ .

- Repetibilidad (intraserie):

Concentración media	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

- Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	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

- Veracidad: En la determinación de muestras cargadas con distintas concentraciones de PBG, los resultados no muestran diferencias sistemáticas con las concentraciones teóricas. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

- Interferencias: Algunos alimentos, medicamentos y sustancias pueden interferir<sup>5</sup>.

## CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

Las porfirias son un grupo de enfermedades genéticas que afectan la regulación de la síntesis del grupo hemo. En estas enfermedades se detectan grandes cantidades de precursores del hemo, como el ácido 5-aminolevulínico (ALA) o el porfobilinógeno (PBG), en la orina.

En los casos de intoxicación por plomo pueden detectarse concentraciones de ALA elevadas en orina, ya que el plomo puede bloquear la vía metabólica en la que interviene el ALA.

La determinación conjunta de ALA y PBG permite diferenciar las porfirias de la intoxicación por plomo<sup>4,6</sup>.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

## BIBLIOGRAFÍA

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. 4ª 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.