



kód 11002 40 testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 15-30°C
Reagenty pro měření koncentrace 17-ketosteroidů Pouze pro laboratorní <i>in vitro</i> diagnostiku

17-KETOSTEROIDY

Chromatografie-spektrofotometrie
ZIMMERMANN

PRINCIP METODY

Vzorek po hydrolyze v kyselém prostředí následně prochází neutrálním ionexem (pryskyřice), kde jsou 17-ketosteroidy zachyceny. Hydrofilní a fenolické interference jsou odstraněny vymytím a 17-ketosteroidy jsou poté eluovány. Jejich množství se stanovuje spektrofotometricky na základě Zimmermanovy reakce^{1,2}.

OBSAH A SLOŽENÍ

1. Reagent. 1 x 5 mL. Hexametylenetetramin 0,7 mol/L, azid sodný 0,5 g/L. Škodlivý (Xn): R42/43: Může způsobit podráždění při inhalaci nebo při styku s pokožkou. S18-24-28.1: Manipulujte a otevřete nádoby s opatrností. Zabraňte styku s pokožkou. Potřísněnou pokožku opláchněte pod tekoucí vodou.

2. Reagent. 1 x 500 mL. Hydroxid draselný 1 mol/L v etanolu 3,4 mol/L. Korozivní (C): R35: Způsobuje vážné popáleniny. S26-36/37/39-45: V případě kontaktu s očima, vypláchněte je neprodleně pod tekoucí vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Při manipulaci se doporučuje nosit vhodný ochranný oděv, rukavice a ochranný obličejový štít. V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.

3. Reagent. 1 x 250 mL. Bezvodý etanol 99% (analytická třída). Vysoce hořlavý (F): R11: S7: Skladujte nádobu pevně uzavřenou. S16: Zabraňte kontaktu s otevřeným ohněm – nekuřte.

4. Mikrokolony. 2 x 20. Obsahují pufrovanou neutrální pryskyřici.

A. Reagent. 2x po 20 mL. *m*-Dinitrobenzen prach 60 mmol/L v etanolu, po rozpuštění.

Velmi toxický (T+), Nebezpečný pro životní prostředí (N): R26/27/28-33-50/53: Velmi toxický při inhalaci, kontaktu s pokožkou a při požití. Nebezpečí kumulativního efektu. Velmi toxický pro vodní organismy. Může způsobit dlouhodobé nepříznivé podmínky vodního prostředí. S28.1-36/37-45-60-61: Při kontaktu s pokožkou jí okamžitě opláchněte pod tekoucí vodou. Při manipulaci se doporučuje nosit vhodný ochranný oděv, rukavice. V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc. Tato látka se nesmí vylévat do odpadu a nesmí se odstraňovat do běžného životního prostředí. Pro likvidaci použijte speciální instrukce v bezpečnostních listech - k dispozici na www.jktrading.cz

B. Reagent. 1 x 90 mL. Hydroxid draselný 9 mol/L.

Korozivní (C): R22-35: Škodlivý při požití. Způsobuje různé popáleniny. S26-36/37/39-45: V případě kontaktu s očima, vypláchněte je neprodleně pod tekoucí vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Při manipulaci se doporučuje nosit vhodný ochranný oděv, rukavice. V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.

C. Reagent. 1 x 230 mL. Dichlormetan 99%.

Škodlivý (Xn): R40: Možné nebezpečí nevratného poškození. S23.2-24/25-36/37: Nedýchejte vzniklé výpary. Zabraňte kontaktu s pokožkou a očima. Při manipulaci se doporučuje nosit vhodný ochranný oděv, rukavice.

S. Standard. 1 x 5 mL. Dehydroepiandrosteron (DHEA) 1000 mg/L = 3470 μmol/L, etanol. Základní standard.

Vysoce hořlavý (F): R11 . S7: Skladujte nádobu pevně uzavřenou. S16: Zabraňte kontaktu s otevřeným ohněm – nekuřte.

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při 15-30°C. Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, jestliže jsou skladovány uzavřené a je zabráněno kontaminaci v průběhu jejich užívání.

Známky zhoršení kvality:

- Reagenty: Přítomnost sraženiny, zákalu, absorbance reagent blanku nad 0,100 při 520 nm.
- Mikrokolony (4): Nepřítomnost pufru nad krycím diskem pryskyřice.

PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

–Koncentrovaná kyselina chlorovodíková (analytická kvalita).

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Reagent A: Rozpusťte suchý prášek ve 20 mL reagentu 3. Stabilita 2 měsíce při 2-8°C.

Toxický (T), Vysoce hořlavý (F): R11: Vysoce hořlavý. R23/24/25: Velmi toxický při inhalaci, kontaktu s pokožkou a při požití. R52/53: Velmi toxický pro vodní organismy. Může způsobit dlouhodobé nepříznivé podmínky vodního prostředí. Skladujte nádobu pevně uzavřenou. S16: Zabraňte kontaktu s otevřeným ohněm – nekuřte. Při kontaktu s pokožkou jí okamžitě opláchněte pod tekoucí vodou. Při manipulaci se doporučuje nosit vhodný ochranný oděv, rukavice. V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 520 nm (515-525)
- Termostatická vodní lázeň
- Varná vodní lázeň
- Stolní centrifuga

VZORKY

Moč. 24 hodinový vzorek odebraný standardním postupem. Vzorek může být skladován maximálně 15 dní při 2-8°C, nebo 1 měsíc při -20°C, jestliže je upraveno pH na 3-6 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vzorek před testováním odstředte nebo zfiltrujte.

POSTUP

Použijte pouze mikrokolony (4) a reagent (2) ze stejné šarže !

Hydrolyza vzorku:

1. Pipetujte do zkumavky:

Vzorek	5,0 mL
Koncentrovaná HCl	1,0 mL
Reagent (1)	1 kapka

2. Důkladně promíchejte a inkubujte zkumavku v horké vodní lázni po dobu 10 minut. Pak zkumavku ochlaďte pod tekoucí vodou. (Pozn. 1)

Chromatografická separace

3. Odstraňte jako první horní uzávěr (4) a poté spodní uzávěr kolony. Pomocí okrouhlého konce pipety zatlačte horní filtr směrem dolů k povrchu pryskyřice tak, abyste ji příliš nestlačili. Ponechte kapalinu volně protékat kolonou ven.
4. Nalejte obsah zkumavky (hydrolyzovaný vzorek) do kolony a ponechte kapalinu volně protékat kolonou ven.
5. Přidejte do kolony:

Destilovaná voda	2,0 mL	ponechte volně protékat ven
Reagent (2)	10,0 ml	ponechte volně protékat ven
Destilovaná voda	2,0 mL	ponechte volně protékat ven
Reagent (3)	4,0 mL	zachyťte eluát

6. Eluát důkladně promíchejte.

Kolorimetrie:

7. Pipetujte do označených centrifugačních zkumavek se šroubovacím uzávěrem:

	Blank	Standard	Vzorek
Eluát	—	—	1,0 mL
Reagent (3)	1,0 mL	1,0 mL	—
DHEA Standard	—	25 µL	—
Reagent (A)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Reagent (B)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

8. Důkladně promíchejte, uzavřete a inkubujte 25 min při 25°C nebo 60 min. při 2-8°C. Potom přidejte:

Reagent (C)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
-------------	--------	--------	--------

9. Důkladně promíchejte a centrifugujte 5 min při 3000 ot./min.

10. Odečtěte absorbanci (A) vrchní fáze vzorku a standardu proti blanku při 520 nm (Poznámka 2 a 3).

VÝPOČET

Koncentrace 17-KS ve vzorku se vypočítá podle vztahu:

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

Objem vzorku (V_S) je 5 mL, objem eluátu (V_E) jsou 4 mL, objem eluátu při kolorimetrii (V_{EC}) je 1 mL, objem Standardu při kolorimetrii (V_{SIC}) je 0,025 mL, koncentrace Standardu (C_{St}) je 3,470 µmol/L (1000 mg/L) a průměrná výtěžnost (Rec) je 0,88. Následující vzorec je pro výpočet koncentrace:

$\frac{A_{\text{Vzorku}}}{A_{\text{Standardu}}}$	x 22,7 = mg/L 17-KS
	x 78,9 = µmol/L 17-KS

Množství 17-KS ve 24 h vzorku moče se vypočítá:

mg/L 17-KS	x $V_{\text{Moče}/24 \text{ h}} (L) =$	mg 17-KS/24 h
µmol/L 17-KS		µmol 17-KS/24 h

REFERENČNÍ HODNOTY

Ženy: 6 - 14 mg/24h - 21 - 49 µmol/24h

Muži: 10 - 25 mg/24h - 35 - 87 µmol/24h

Tyto hodnoty³ jsou pouze orientační; Každá laboratoř by si měla stanovit svá vlastní normální rozmezí.

KONTROLA KVALITY

Pro ověření správnosti měření se doporučuje použít Kontrolní moč (kód. 18036 a 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

- Detekční limit: 2,85 mg/L = 9,9 µmol/L.
- Linearita: do 173 mg/L = 600 µmol/L. Při vyšších hodnotách zředit vzorek 1/2 destilovanou vodou a opakujte měření.

- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Průměrná koncentrace	CV	n
4,32 mg/L = 15 µmol/L	5,2 %	25
25,65 mg/L = 89 µmol/L	6,6 %	25

- Reprodukovatelnost (run to run):

Průměrná koncentrace	CV	n
4,32 mg/L = 15 µmol/L	4,0 %	25
25,65 mg/L = 89 µmol/L	6,0 %	25

- Citlivost: 12,25 mA-L/mg = 3,52 mA-L/µmol.

- Správnost: Výsledky získané touto soupravou nevykazovaly systematické rozdíly při porovnání s teoretickými hodnotami. Podrobnosti o porovnávací zkoušce jsou k dispozici na vyžádání.

- Interference: Některé potraviny, léky a další látky mohou interferovat⁴.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

17-ketosteroidy jsou metabolity látek vylučovaných adrenálními žlázami, varlaty a do značné míry i vaječníky. Jsou charakterizovány ketoskupinou na uhlíku 17 a jsou vylučovány močí. U mužů je přibližně 2/3 celkových močových 17-KS vytvořeno z adrenálních žláz, zatímco u žen jsou tvořeny výlučně z adrenálních žláz. Měření steroidních metabolitů je důležité pro určení adrenální androgenní produkce. Snížené hodnoty 17-KS se všeobecně nalézají u mužů s primárním hypogonadismem (Klinifelterův syndrom, kastrace), se sekundárním hypogonadismem (panhypopituitarismus) a u žen s hypofýzním hypoadrenalismem (Addisonova nemoc)⁵. Zvýšené hodnoty se nalézají u pacientů s testikulárními tumory (intersticiální buněčný nádor, chorioepiteliomie) adrenální hyperplasie, adrenální karcinom, Cushingův syndrom a u některých žen s nadměrným ochlupením (hirsutismus)⁵. Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKY

1. Hydrolyzované vzorky vždy centrifugujte jestliže obsahují větší množství precipitátu (např. močové kontroly).
2. Pokud se zdá být horní fáze kalná, odstraňte ji, přidejte kousek bezvodého síranu sodného, protřepejte a odstředte.
3. U některých vzorků se u posledního extraktu může případně objevit tmavě-hnědé zabarvení, které vede k falešně zvýšeným hodnotám. Pokud se tak stane, je doporučeno upravit absorbanci vzorku dle Talbotovy korekce: $A_{\text{corr}} = (A_{520} - 0,6 \times A_{430}) / 0,73$.

Pozn. Distributora: Dlouhodobé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení průtoku kapaliny přes pryskyřici. Pro obnovu funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechejte usadit.

LITERATURA

1. Bradlow HL. Extraction of steroid conjugates with a neutral resin. *Steroids* 1968; 11: 265-272.
2. Zimmermann W. Z. Eine Farbreaktion der Sexualhormone und ihre Anwendung zur quantitativen colorimetrischen Bestimmung. *Physiol Chem* 1935; 233:257-264.
3. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical lab. tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 5.1.2010

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem. Více informací můžete nalézt na internetové adrese: www.biosystems-sa.com. nebo na adrese výhradního distributora pro ČR: www.jktrading.cz

VÝROBCE

BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona (Spain)
ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001
ISO 9001 - TÜV CERT - Reg.: 01 100 6696