



Kód 11006 40 Testů

SKLADOVÁNÍ PŘI 15-30°C

Reagenty pro měření koncentrace 17-Hydroxykortikosteroidů
Pouze pro laboratorní *in vitro* diagnostiku**17-HYDROXYKORTIKOSTEROIDY**Chromatografická-spektrofotometrie
PORTER-SILBER**PRINCIP METODY**

Vzorek je upraven kaolinem a po průchodu neutrálním adsorbčním ionexem (pryskyřice) na koloně jsou 17-hydroxykortikosteroidy (17-OH) zachyceny. Interferující částice jsou na koloně vymyty a 17-hydroxykortikosteroidy jsou poté kvantitativně stanoveny spektrofotometricky na základě Porter-Silberovy reakce¹.

OBSAH A SLOŽENÍ

1. **Reagent.** 1 x 10 mL. Kyselina sírová 8 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.

2. **Reagent.** 1 x 90 mL. Fosforečnan sodný- pufr 1 mol/L pH 6,6, azid sodný 15 mmol/L.

3. **Reagent.** 2 x 20. Aktivovaný kaolin. 0,25 g.

Škodlivý (Xn): R20/21/22: Škodlivý při inhalaci, kontaktu s kůží a při požití. S22: Nedýchejte jeho prach. S24/25: Zabraňte kontaktu s kůží a očima. S36/37/39: Při manipulaci se doporučuje nosit vhodný ochranný oděv, rukavice a ochranný obličejový štít.

4. **Mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují přesně navážené množství pufované neutrální pryskyřice.

A. **Reagent.** 3 x 55 mL. Kyselina sírová 15 mol/L.

Korozivní (C): R35: Způsobuje vážné popáleniny. S26-30-45: V případě kontaktu s očima, vypláchněte je neprodleně pod tekoucí vodou a vyhledejte lékařskou pomoc. Nikdy nepřidávejte vodu do tohoto produktu. V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc.

B. **Reagent.** 2 pro 55 mL. Fenyhydrazin prach 6 mmol/L, po rekonstituci.

Toxický (T), Nebezpečný pro životní prostředí (N): R23/24/25-36/38-43-45-48/23/24/25-50-68: Toxický při inhalaci, kontaktu s pokožkou a při požití. Při kontaktu může způsobit poškození pokožky. Může vyvolat rakovinové bujení. Toxický: Nebezpečí vážného poškození zdraví při déletrvajících expozicích a při inhalaci, kontaktu s pokožkou a při požití. Velmi toxický pro vodní organismy. Může způsobit nevratná poškození. S45-53-61: V případě nehody, nebo když se necítíte v pořádku, vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc. Po upotřebení - tato látka se nesmí odstraňovat do běžného životního prostředí. Pro likvidaci použijte speciální instrukce v bezpečnostních listech - k dispozici na www.jktrading.cz

S. **Standard.** 1 x 5 mL. Kortisol 1.000 mg/L = 2.770 μmol/L v etanolu.

Vysoce hořlavý (F): R11: Vysoce hořlavý. S7-16: Skladujte nádobu pevně uzavřenou. Zabraňte kontaktu s otevřeným ohněm - nekuřte.

SKLADOVÁNÍ

Składujte 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 0,090 (v 1 cm kyvetě).
- Mikrokolony: Nepřítomnost pufru nad krycím diskem pryskyřic

PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

- Bezvodý etanol (Analytické třídy).
- Ředící poměr lution solvent: Bezvodý etanol zředěte následovně:
70 mL etanolu + 30 mL destilované vody

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Pracovní reagent: Pокlepejte na uzávěr lahvičky reagentu B, aby se prach usadil na dně lahvičky. Pak ji otevřete a přidejte obsah lahvičky reagentu A. Uzavřete a třepejte do rozpuštění. Stabilita je 4 měsíce při 2-8°C na tmavém místě.

Pracovní standard: Naředěte 17-OH Standard (S) 1/6 s Etanolem (1 mL 17-OH Standardu + 5 mL Etanolu). Stabilita je 2 měsíce při 2-8°C.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 370, 410 a 450 nm
- Termostatická vodní lázeň
- Stolní centrifuga

VZORKY

Moč. 24 hodinový vzorek odebraný standardním postupem. Vzorek může být skladován maximálně 7 dní při 2-8°C, nebo 1 měsíc při -20°C, jestliže je upraveno pH na 3-6 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vzorek před testováním odstředěte nebo zfiltrujte.

POSTUP

Příprava vzorku:

1. Pipetujte do zkumavky (3):

Vzorek	5,0 mL
Reagent (1)	2 kapky

2. Důkladně 3 minuty protřepejte, pak centrifugujte 5 minut při 4000 r.p.m.
3. Nalejte supernatant do centrifugační zkumavky a přidejte:

Reagent (2)	2,0 mL
-------------	--------

4. Promíchejte a 5 minut centrifugujte při 4000 r.p.m.

Chromatografická separace (Poznámka 2)

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

7. Přidejte do kolony (poznámka 1):

Destilovaná voda	10,0 mL	Ponechte odtéct pryč
Eluční činidlo (3)	6,0 mL	Sbírejte eluát

Kolorimetrie:

8. Důkladně eluát promýchejte a pipetujte do uzavíratelných centrifugačních zkumavek:

	Reagent Blank	Standard	Vzorek Blank	Vzorek
Eluát	—	—	1,0 mL	1,0 mL
Pracovní Standard	—	0,1 mL	—	—
Eluční činidlo	1,0 mL	0,9 mL	—	—

9. Vložte zkumavky do ledové lázně a opatrně přidejte:

Reagent (A)	—	—	1,0 mL	—
Pracovní Reagent	1,0 mL	1,0 mL	—	1,0 mL

10. Několikrát zkumavky opatrně protřepejte a ponořte je zpět do ledové lázně, abyste zabránili přehřátí.

11. Zkumavky uzavřete a inkubujte po dobu 15 minut při 60°C nebo 90 minut při 37°C.

12. Zkumavky ochlaďte na pokojovou teplotu (15-30°C) a odečtěte absorbanci (A) vzorku proti vzorku blanku a absorbanci standardu proti reagentu blanku při 370, 410 a 450 nm.

VÝPOČET

Koncentrace 17-OH ve vzorku se vypočítá:

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

ΔA se vypočítá podle Allenovy korekce²:

$$\Delta A = 2 \times A_{410} - (A_{370} + A_{450})$$

Objem vzorku (V_S) je 5 mL, objem eluátu (V_E) je 6 mL, objem eluátu při kolorimetrii (V_{EC}) je 1 mL, objem Standardu při kolorimetrii (V_{StC}) je 0,1 mL, koncentrace Standardu (C_{St}) je 166,7 mg/L nebo 461,7 $\mu\text{mol/L}$ (standard je naředěn 1/6) a průměrná výtěžnost (Rec) je 0,664. Následující vzorec je pro výpočet koncentrace:

$\frac{\Delta A_{\text{Vzorku}}}{\Delta A_{\text{Standardu}}}$	$\times 30,1 = \text{mg/L 17-OH}$
	$\times 83,4 = \mu\text{mol/L 17-OH}$

Množství 17-OH ve 24 h/ vzorku moče se vypočítá:

mg/L 17-OH	$\times V_{\text{Moče}/24 \text{ h}} (\text{L}) =$	mg 17-OH/24 h
$\mu\text{mol/L 17-OH}$		$\mu\text{mol 17-OH/24 h}$

REFERENČNÍ HODNOTY

Ženy: 2 - 8 mg/24-h = 5,5 – 22,2 $\mu\text{mol}/24\text{-h}$

Muži: 3 - 10 mg/24-h = 8,3 – 27,7 $\mu\text{mol}/24\text{-h}$

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: 1,3 mg/L = 3,4 $\mu\text{mol/L}$.

– Linearita: do 72 mg/L = 200 $\mu\text{mol/L}$. Při vyšších hodnotách zředte vzorek 1/2 destilovanou vodou a opakujte měření.

– Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Průměrná koncentrace	CV	n
2,8 mg/L = 7,8 $\mu\text{mol/L}$	9.3 %	25
10,5 mg/L = 29,0 $\mu\text{mol/L}$	9.7 %	25

– Reprodukovatelnost (run to run):

Průměrná koncentrace	CV	n
2,8 mg/L = 7,8 $\mu\text{mol/L}$	11,2 %	25
10,5 mg/L = 29,0 $\mu\text{mol/L}$	9,1 %	25

– Citlivost: 9,61 mA·L/mg = 3,47 mA·L/ μmol .

– Správnost: Výsledky získané touto soupravou nevykazovaly systematické rozdíly ve srovnání s teoretickými hodnotami. Podrobnosti o porovnávací zkoušce jsou k dispozici na vyžádání.

– Interference: Některé léky a další látky mohou interferovat⁴.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

17-Hydroxyketosteroidy jsou metabolity steroidních hormonů z kortizolového metabolismu. Jsou charakterizovány hydroxylovou skupinou na uhlíku 17. Jejich produkty jsou vylučovány močí.

Měření 17-OH v moči indikuje stupeň kortizolu uvolněného z adrenálního kortexu do krve.

Snížené hodnoty 17-OH se nalézají u Cushingova syndromu jako výsledek adrenálního tumoru, tumoru hypofýzy, ektopického tumoru, a ostatních příčin jako jsou: obezita, hypertenze a těhotenství.^{3,5}

Zvýšené hodnoty se nalézají u Addisonova onemocnění.^{3,5}

Klinická diagnóza by neměla být stanovena jen na základě výsledku jednoho testu, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní údaje.

POZNÁMKY

Poznámka 1. Test je možné v tomto kroku stanovení přerušit. Skladujte v uzavřené zkumavce při 2-8°C, maximálně však po dobu 3 dnů.

Poznámka 2: 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 nechejte usadit.

LITERATURA

1. Ariyoshi Y, Osawa Y. Improved Assay for Urinary 17-Hydroxycorticosteroids. *Clin Chem* 1976; 22: 232-234.
2. Allen, W. M. A simple method for analyzing complicated absorption curves of use in the colorimetric determination of urinary steroids. *J. Clin. Endocrinol.* 1950; 10: 71-75.
3. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3rd ed. AACC Press, 1997.

UPOZORNĚNÍ

Příklad pořízen k datu: 6.9.2004

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