



Kód 11006 40 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-30°C
Reagenty pro měření koncentrace 17-hydroxykortikosteroidů Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.

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

- Reagent.** 1 x 10 mL. Kyselina sírová 8 mol/L.
Nebezpečí :
H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- Reagent.** 1 x 90 mL. Fosforečnan sodný- pufr 1 mol/L, pH 6,6, azid sodný 15 mmol/L
- Reagent.** 2 x 20. Aktivovaný kaolin. 0,25 g.
- Mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují přesně navážené množství pufrované neutrální pryskyřice.
- A. Reagent.** 3 x 55 mL. Kyselina sírová 15 mol/L.
Nebezpečí :
H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí.
P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KŮŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- B. Reagent.** 2 ml pro 55 mL. Fenyhydrazin prach 6 mmol/L, po rekonstituci.
Nebezpečí :
H301 – Toxický při požití.**H311** – Toxický při styku s kůží.
H315 – Dráždí kůži. **H317** – Může vyvolat alergickou kožní reakci. **H319** – Způsobuje vážné podráždění očí.
H330 – Při vdechování může způsobit smrt.
H341 – Podezření na genetické poškození .
H350 – Může vyvolat rakovinu. **H372** – Způsobuje poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici ostatní cesty expozice nejsou nebezpečné.
P273 – Zabraňte uvolnění do životního prostředí.
P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.**P301 + P310** – PŘI POŽITÍ: Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.
P305 + P351 + P338 – PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování.
- S. Standard.** 1 x 5 mL. Kortisol 1.000 mg/L= 2770 μmol/L v etanolu.
Nebezpečí :H225 – Vysoce hořlavá kapalina a páry.
P420 – Skladujte odděleně od ostatních materiálů.

Pro další varování a bezpečnostní opatření čtěte bezpečnostní list (SDS)

SKLADOVÁNÍ

Składujte při 2-30°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, ΔA blanku nad 0,090 (v 1 cm kyvetě).
- Mikrokolony: Nepřítomnost pufru nad krycím diskem pryskyřic

PŘÍDAVNÉ REAGENCIE

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

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

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

Pracovní standard : Naředte 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 koncentrací kyseliny chlorovodíkové. Vzorek před testováním odstředte 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. Nalijte 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. Nalijte 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.



Kód 11006 40 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-30°C
Reagenty pro měření koncentrace 17-hydroxykortikosteroidů Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích.

17-HYDROXYKORTIKOSTEROIDY

Chromatografická-spektrofotometrie
PORTER-SILBER

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:

$$\frac{\Delta A_{\text{vzorku}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{St}}}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{R_{\text{EC}}} \times C_{\text{St}} = C_{\text{vzorku}}$$

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_{St}) 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 (R_{EC}) 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	$\times V_{\text{moče/24 h}} (\text{L}) =$	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 $\mu\text{mol/24-h}$

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

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 svoji 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 zředěte 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: 11,6 mA·L/mg = 4,19 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 kortisolového metabolismu. Jsou charakterizovány hydroxylovou skupinou na uhlíku 17. Tvoří se v játrech a vylučují se močí. Množství 17-OH v moči indikuje množství kortisolu uvolněného z adrenálního kortexu do krve.

Zvýšené 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} Snížené 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

1. Test je možné v tomto kroku stanovení přerušit. Skladujte v uzavřené zkumavce při 2-8°C, maximálně však po dobu 3 dnů.
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 nechte 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 Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, WB Saunders Co, 2005.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
5. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 4rd ed. AACC Press, 2001.

UPOZORNĚNÍ

Překlad revidován k datu: 25.07.2016.

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-sa.com.

Český návod je k dispozici na: www.jktrading.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 informačné centrum Bratislava, 833 05,

Limbová 5, tel.: +421 254 774 166