



17 – Hydroxykortikosteroidy (17- OH)



Kód 11006 40 testov	17 – Hydroxykortikosteroidy Chromatografia – spektrofotometria PORTER - SILBER
Skladovanie pri 2 - 30°C	
Reagenty pre meranie koncentrácie 17-hydroxykortikosteroidov Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

PRINCÍP METÓDY

Vzorka sa upraví kaolínom a prechádza neutrálnou adsorpčnou živicom, kde sa 17 – hydroxykortikosteroidy (17-OH) zachytia. Interferujúce častice sa vymyjú a 17-OH sa stanovia kvantitatívne spektrofotometricky pomocou Porter-Silberovej reakcie.¹

OSAH A ZLOŽENIE

1. Reagent. 1X10 ml. Kyselina sírová 8mol/l.

Výstraha :

H314 – Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.

Upozornenie :

P303+P361+P353 – PRI STYKU S KOŽOU (alebo vlasami) : Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte. Kožu opláchnite / osprchujte vodou.

2. Reagent. 1X90 ml. Fosforečnan sodný – pufer 1 mmol/l, pH 6,6, aid sodný 15mmol/l.

3. Reagent. 2X20. Aktivovaný kaolín. 0,25g.

4. Mikrokolóny. 2X20. Obsahujú presne navážené množstvo pufovej neutrálnej živice.

A. Reagent . 3X55ml. Kyselina sírová 15mol/l.

Výstraha :

H314 – Spôsobuje ťažké poleptanie kože a poškodenie očí.

Upozornenie :

P303+P361+P353 – PRI STYKU S KOŽOU (alebo vlasami) : Všetky kontaminované časti odevu okamžite vyzlečte. Kožu opláchnite / osprchujte vodou.

B. Reagent. 2X55ml. Práškový fenylhydrazín 6mmol/l po rekonštitúcii.

Výstraha :

H301 – Toxický pri požití.

H315 – Dráždi kožu.

H317 – Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu.

H319 – Spôsobuje vážne podráždenie očí.

H330 – Pri vdychovaní môže spôsobiť smrť.

H341 – Podozrenie na genetické poškodenie.

H350 – Môže vyvolať rakovinu .

H372 – Spôsobuje poškodenie orgánov pri predĺženej alebo opakovanej expozícii. *Ostatné cesty expozície nie sú nebezpečné>*.

Upozornenie :

P273 – Zabráňte úniku do životného prostredia.

P280 – Používajte ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ štít na tvár.

P301 + P310 – PRI POŽITÍ: Okamžite volajte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÉ STREDISKO alebo lekára.

P305 + P351+ P338 - Po zasiahnutí očí : Niekoľko minút ich opatrne oplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní.

S. Štandard. 1X5ml. Kortizol v etanole 1000mg/l = 2770 μmol/l

Výstraha :

H225 – Veľmi horľavá kvapalina a pary

Upozornenie :

P420 – Skladujte oddelene od ostatných materiálov.

Ďalšie varovania a upozornenia – viď bezpečnostný list.

SKLADOVANIE

Skladujte pri 2 – 30°C.

Reagenty a štandard sú stabilné do dátumu uvedeného na štítku v prípade, že sú skladované uzatvorené a je zabránené kontaminácii v priebehu používania.

Príznačky zhoršenia kvality :

- Reagenty : Prítomnosť zrazeniny, zákalu , absorbancia blanku nad 0,090 (1cm kveta)
- Mikrokolóny : neprítomnosť pufru nad krycím diskom živice.

PRÍDAVNÉ REAGENTY

- bezvodý etanol p.a.
- elučné rozpúšťadlo : zriedte bezvodý etanol : 70ml etanolu + 30ml destilovanej vody

PRÍPRAVA REAGENCIÍ

Pracovný reagent : Jemne poklepte na uzáver fľaštičky reagentu B tak, aby sa prášok usadil jej dne . Potom fľaštičku otvorte a pridajte k nej obsah fľaštičky s reagentom A.

Uzatvorenú fľaštičku pretrepávajte až do úplného rozpustenia . Takto pripravený roztok je stabilný 4 mesiace. Skladujte v tme pri 2 – 8°C.

Pracovný štandard : Zriedte 17-OH Štandard (S) v pomere 1: 6 s etanolom (1 ml 17-OH Štandardu + 5 ml etanolu). Stabilný 2 mesiace pri 2 – 8°C.

PRÍDAVNÉ ZARIADENIA

- Spektrofotometer alebo fotometer s filtrom 370,410 a 450nm
- Termostatický vodný kúpeľ
- Stolná centrifúga

VZORKY

Moč. 24 hodinové vzorky odobrané štandardným spôsobom. Udržujte pri 2-8°C a použite do 24 hodín. Vzorky môžu byť skladované pri 2-8°C po dobu max. 7 dní, alebo pri -20°C po dobu 1 mesiaca pri pH upravenom na hodnotu 3 – 6 pomocou koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Pred testovaním vzorku odstredte alebo prefiltrujte.

POSTUP

Príprava vzorky

1. Do jednorázového reagentu (3) pridajte :

vzorka	5,0 ml
Reagent (1)	2 kvapky

2. Pretrepávajte 3 minúty a centrifugujte 5 minút pri 4000 otáčkach/ minútu.

3. Nalejte supernatant do uzavierateľnej skúmavky a pridajte :

Reagent (2)	2,0 ml
-------------	--------

4. Premiešajte a centrifugujte (4000 ot/min ; 5 minút)



17 – Hydroxykortikosteroidy (17- OH)



Kód 11006	40 testov	17 – Hydroxykortikosteroidy Chromatografia – spektrofotometria PORTER - SILBER
Skladovanie pri 2 - 30°C		
Reagenty pre meranie koncentrácie 17-hydroxykortikosteroidov Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku		

Chromatografická separácia

- Najprv odstráňte horný uzáver kolóny (4), potom uzáver v jej spodnej časti. Pomocou okrúhleho konca pipety zatlačte horný filter smerom dole k povrchu živice tak, aby ste ju príliš nestlačili. Všetku kvapalinu nechajte voľne vytečť von.
- Nalejte supernatant z centrifugačnej skúmavky do kolóny a kvapalinu nechajte kompletne vytečť von.
- Do kolóny pridajte (poznámka 1) :

Destilovaná voda	10,0 ml	nechajte voľne vytečť von
Elučné rozpúšťadlo	6,0 ml	Eluát zachyťte

Kolorimetria

- Eluát dôkladne premiešajte a pipetujte do centrifugačnej skúmavky :

	reagent blank	štandard	vzorka blank	vzorka
Eluát	-	-	1,0 ml	1,0 ml
Pracovný štandard	-	0,1 ml	-	-
Elučné rozpúšťadlo	1,0 ml	0,9 ml	-	-

- Vložte skúmavky do ľadového kúpeľa a opatrne pridajte :

Reagent (A)	-	-	1,0ml	-
Pracovný reagent	1,0ml	1,0ml	-	1,0ml

- Skúmavky niekoľkokrát opatrne premiešajte a potom ich ponorte späť do ľadového kúpeľa, aby ste zabránili ich prehriatiu.
- Skúmavky uzatvorte a inkubujte 15 minút pri 60°C alebo 90 minút pri 37°C.
- Ochladte na izovú teplotu (15 – 30°C) a odčítajte absorbancie vzorky (A) pri 370,410 a 450 nm oproti vzorka blanku a štandardu oproti reagent blanku.

VÝPOČET

Koncentrácia 17-OH vo vzorke sa vypočíta :

$$\frac{\Delta A_{\text{vzorky}}}{\Delta A_{\text{štandardu}}} \times \frac{V_E}{V_S} \times \frac{V_{\text{šic}}}{V_{\text{EC}}} \times \frac{1}{R_{\text{EC}}} \times C_{\text{šT}} = C_{\text{vzorky}}$$

ΔA sa vypočíta aplikáciou Allenovej korekcie :

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

Objem vzorky (V_S) je 5ml, objem eluátu (V_E) je 6ml, objem eluátu pri kolorimetrii (V_{EC}) je 1 ml, objem štandardu pri

kolorimetrii ($V_{\text{šic}}$) je 0,1ml, koncentrácia štandardu ($C_{\text{šT}}$) je 166,7mg/l alebo 461,7 $\mu\text{mol/l}$ (štandard je zriedený v pomere 1:6) a priemerná výťažnosť (R_{EC}) je 0,664. Nasledujúci vzorec slúži pre výpočet koncentrácie :

ΔA_{vzorky}	$\times 30,1 = \text{mg/l 17-OH}$
$\Delta A_{\text{štandardu}}$	$\times 83,4 = \mu\text{mol/l 17-OH}$

Množstvo 17-OH v 24 hodinovej vzorke moči sa vypočíta :

mg/l 17-OH	x V moča/24 h (L)	mg17-OH/24 h
$\mu\text{mol/l 17-OH}$		$\mu\text{mol 17-OH/ 24 h}$

REFERENČNÉ 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 $\mu\text{mol/24 h}$.
Tieto hodnoty ³ sú iba orientačné. Každé laboratórium by si malo stanoviť svoje vlastné, normálne rozmedzie.

KONTROLA KVALITY

Pre overenie správnosti merania sa odporúča použiť Kontrolný moč (kód 18036 a 18037). Každé laboratórium by si malo stanoviť svoju vlastnú vnútornú kontrolu kvality a postupy pre nápravu pre prípad, že kontroly nie sú v tolerančnom rozpätí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- detekčný limit : 1,3mg/l = 3,4 $\mu\text{mol/l}$
- linearita : 72mg/l = 200 $\mu\text{mol/l}$; pri vyšších hodnotách vzorku nariedte na 1/2 destilovanou vodou a meranie opakujte.
- opakovateľnosť (jednej vzorky) :

Priemerná koncentrácia	CV	n
2,8mg/l = 7,8 $\mu\text{mol/l}$	9,3%	25
10,5mg/l = 29,0 $\mu\text{mol/l}$	9,7%	25

- reprodukovateľnosť (run to run) :

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

- citlivosť : 11,6 mA.L/mg = 4,19 mA.L/ μmol
- správnosť : výsledky získané touto súpravou pri porovnaní



17 – Hydroxykortikosteroidy (17- OH)



Kód 11006 40 testov	17 – Hydroxykortikosteroidy Chromatografia – spektrofotometria PORTER - SILBER
Skladovanie pri 2 - 30°C	
Reagenty pre meranie koncentrácie 17-hydroxykortikosteroidov Výhradne pre profesionálnu in vitro diagnostiku	

s teoretickými hodnotami nevykazovali systematické rozdiely. Podrobnosti o porovnávacej skúške sú k dispozícii na vyžiadanie .

- interferencie : Interferovať môžu niektoré lieky a ďalšie látky⁴.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

17- hydroxykortikosteroidy sú metabolitom steroidného hormónu kortizol. Sú charakteristické tým, že majú hydroxylovú skupinu na 17 uhlíku. Vytvárajú sa v pečeni a vylučujú sa močom. Množstvo 17-OH namerané v moči indikuje množstvo kortizolu, ktorý sa uvoľní z adrenálneho kortexu do krvi. Zvýšené hodnoty 17-OH sa vyskytujú pri Cushingovom syndróme ako výsledok adrenálneho tumoru, pri tumore hypofýzy, pri ektopickom tumore a i v iných prípadoch, ako je obezita, hypertenzia a tehotenstvo. ^{3,5} Znížené hodnoty sa môžu vyskytovať pri Addisonovej chorobe. ^{3,5} Klinická diagnóza by nemala byť stanovená len na základe výsledku jediného testu, je potrebné zhodnotiť klinické i ďalšie laboratórne údaje.

POZNÁMKY

1. Testovanie môže byť v tomto bode prerušené. Skladujte v uzavretej skúmavke maimálne 3 dni pri teplote 2 – 8°C.
2. Poznámka distribútora : Dlhodobé skladovanie kolón vedie k utlačeniu živice, čím sa spomalí prietok kvapaliny cez túto živicu. Pre obnovu funkcie obráťte kolónu pred stanovením tak, aby sa živica presypala a ponechajte tak cca 10 minút. Potom kolónu umiestnite do pracovnej polohy a živicu nechajte usadiť.

LITERATÚRA

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.

UPOZORNENIE

Slovenský preklad k 1.8.2016.
Vzhľadom k možnej inovácii výrobku sa odporúča prekontrolovať slovenský preklad s originálnym príbalovým letákom tak, že sa porovnajú identifikačné čísla uvedené v zápätí. Originálny návod nájdete v súprave a na internetovej adrese www.biosystems-sa.com.
Slovenský návod je k dispozícii na www.jktrading.cz

Výhradný distribútor:

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 prípade mimoriadnych udalostí:

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