



kód 11002 40 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-30°C
Reagenty pro měření koncentrace 17-ketosteroidů. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích

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

- Reagent.** 1 x 5 mL. Hexametylenetetramin 0,7 mol/L, azid sodný 0,5 g/L.
Nebezpečí :
H317 – Může vyvolat alergickou kožní reakci. H334 – Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. P285 – V případě nedostatečného větrání použijte vybavení pro ochranu dýchacích cest. P302 – PŘI STYKU S KÚŽÍ: P333 + P313 – Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
- Reagent.** 1 x 500 mL. Hydroxid draselný 1 mol/L v etanolu 3,4 mol/L.
Nebezpečí :
H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KÚŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- Reagent.** 1 x 250 mL. Bezvodý etanol 99% (analytická třída).
Nebezpečí :
H225 – Vysoce hořlavá kapalina a páry.
P420 – Skladujte odděleně od ostatních materiálů.
- Mikrokolony.** 2 x 20. Obsahují pufrovanou neutrální pryskyřici.
- A. Reagent.** 2x po 20 mL. m-Dinitrobenzen prach 60 mmol/L, v etanolu po rozpuštění.
Nebezpečí :
H300 – Při požití může způsobit smrt. H310 – Při styku s kůží může způsobit smrt. H330 – Při vdechování může způsobit smrt. H373 – Může způsobit poškození orgánů při prodloužené nebo opakované expozici ostatní cesty expozice nejsou nebezpečné. H400 – Vysoce toxický pro vodní organismy. H410 – Vysoce toxický pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky. P264 – Po manipulaci důkladně omyjte ... P280 – Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. P273 – Zabraňte uvolnění do životního prostředí. P284 – Používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest. P301 + P310 – PŘI PÓŽITÍ: Okamžitě volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.
- B. Reagent.** 1 x 90 mL. Hydroxid draselný 9 mol/L.
Nebezpečí :
H314 – Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. P303 + P361 + P353 – PŘI STYKU S KÚŽÍ (nebo s vlasy): Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/osprchujte.
- C. Reagent.** 1 x 230 mL. Dichlormetan 99%.
Varování :
H351 – Podezření na vyvolání rakoviny P309 + P311 – PŘI expozici nebo necítíte-li se dobře: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře.
- S. Standard.** 1 x 5 mL. Dehydroepiandrosteron (DHEA) 1000

mg/L = 3470 μmol/L, etanol. Základní standard.

Nebezpečí :

H225 – Vysoce hořlavá kapalina a páry. **P420** – Skladujte odděleně od ostatních materiálů.

Pro další upozornění a opatření viz Karta bezpečnostních údajů příslušného výrobku.

Používejte pouze mikrokolony (4) a reagenty (2) ze stejné šarže.

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, absorbance reagent blanku nad 0,100 při 520 nm.
- Mikrokolony (4): Nepřítomnost pufry 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.

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 reagenty (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

- 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.
- Nalejte obsah zkumavky (hydrolyzovaný vzorek) do kolony a ponechte kapalinu volně protékat kolonou ven.
- Přidejte do kolony:

Destilovaná voda	2,0 mL	ponechte volně protékat ven
Reagent (2)	10,0 ml	ponechte volně protékat ven



17-KETOSTEROIDY

Chromatografie – spektrofotometrie

ZIMMERMANN

kód 11002 40 Testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 2-30°C
Reagenty pro měření koncentrace 17-ketosteroidů. Pouze pro <i>in vitro</i> diagnostiku v klinických laboratořích

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	—	25 µL	—
Standard	—	—	—
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:

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

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_{SC}) je 0,025 mL, koncentrace Standardu (C_{St}) je 3470 µmol/L (1000 mg/L) a průměrná výtěžnost (Rec) je 0,88. Následující vzorec je pro výpočet koncentrace:

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

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

mg/L 17-KS	$\times V_{\text{Moče/24 h}} (\text{L}) =$	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 svoji 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 zředte 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 nalézá u mužů s primárním hypogonadismem (Klinifelterův syndrom, kastrace), se sekundárním hypogonadismem (panhypopituitarismus) a u žen s hypofizním hypoadrenalismem (Addisonova nemoc)⁵. Zvýšené hodnoty se nalézájí 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 umístíte do pracovní polohy a pryskyřici nechte usadit.



17-KETOSTEROIDY

Chromatografie – spektrofotometrie

ZIMMERMANN

kód 11002 40 Testů

SKLADOVÁNÍ PŘI 2-30°C

Reagenty pro měření koncentrace 17-ketosteroidů.
Pouze pro *in vitro* diagnostiku v klinických laboratořích

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. Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, WB Saunders Co, 2005. Tietz.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical lab. 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: 5.8.2016.

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