

УТВЕРЖДЕНА
Приказом Росздравнадзора
от _____ 200__ г. № _____

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ЗАО «Вектор-Бест»



М.Д. Хусаинов
_____ 2010 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора реагентов для ферментативного определения
мочевины в сыворотке крови и моче
(НОВОКАРБ)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов НОВОКАРБ предназначен для количественного определения мочевины в сыворотке крови и моче человека ферментативным методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

1.2. Набор рассчитан, в зависимости от варианта комплектации, на проведение (вариант 1) или 400 (вариант 2) определений мочевины при расходе 0,5 мл рабочего раствора реагента 1 на одно определение.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип действия

Метод определения основан на том, что мочевина под действием уреазы разлагается на углекислый газ и аммиак, последний в реакции с салицилатом натрия и гипохлоритом натрия в присутствии натрия пентацианонитрозилферрата (II) образует окрашенный продукт. Интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевины и измеряется фотометрически при длине волны 640 (610-670) нм.

2.2. Состав набора

Набор может поставляться в двух вариантах комплектации (варианты 1 и 2).

В состав набора входят:

– реагент 1: раствор уреазы, 40 Е/мл, в фосфатном буфере, 35 ммоль/л, рН 7,0±0, содержащем глицерин 50% – 1 флакон (10 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 20 мл) (вариант 2)

Инструкция составлена сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест»: начальником отдела, Л.В. Гаевой и зам. начальника отдела биохимии, к.б.н. Г.Е. Яковлевой.

– реагент 2: раствор натрия салициловокислого, 1,4 моль/л; натрия пентацианонитрозилферрата (II) 2-водного, 0,2 моль/л – 1 флакон (5,0 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 10 мл) (вариант 2);

– реагент 3: раствор гипохлорита натрия, 0,075 моль/л; натрия гидроокиси, 0,5 моль/л – 1 флакон (40 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 80 мл) (вариант 2);

– реагент 4: фосфатный буферный раствор, 0,35 моль/л, pH 7,0±0,2 – 1 флакон (5,0 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 10 мл) (вариант 2);

– калибратор: калибровочный раствор мочевины, 5,0 ммоль/л, в бензойной кислоте 0,2%; готовый к использованию – 1 флакон (3,0 мл) (вариант 1) или 2 флакона (по 3,0 мл) (вариант 2).

Конечные концентрации реагентов в рабочих растворах:

– фосфатный буфер – 0,035 ммоль/мл;

– уреазы – 8,0 Е/мл;

– натрий салициловокислый – 0,035 ммоль/мл;

– натрия пентацианонитрозилферрат (II) 2-водный – 0,005 ммоль/мл;

– гипохлорит натрия – 0,015 ммоль/мл;

– натрия гидроокись – 0,112 ммоль/мл.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность набора обусловлена использованием уреазы, разлагающей мочевину с образованием аммиака.

3.2. Линейность. Линейная область определения концентрации мочевины – в диапазоне от 1,5 до 33,3 ммоль/л. Отклонение от «линейности» – не более 7%.

3.3. Чувствительность определения – не более 1,0 ммоль/л.

3.4. Коэффициент вариации результатов измерений – не более 7%.

3.5. Нормальные величины концентрации мочевины в сыворотке крови – 2,5-8,3 ммоль/л; в суточной моче – 333-583 ммоль/сут.

3.6. Рекомендуются в каждой лаборатории при использовании набора уточнить диапазоны нормальных величин концентрации мочевины у исследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

4.2. Реагент 3 содержит натрия гидроокись и гипохлорит натрия. Следует избегать попадания реагента на кожу и слизистые. В случае попадания его на кожу и слизистые необходимо промыть поражённые участки большим количеством проточной воды.

4.3. При работе с набором необходимо соблюдать «Правила устройства, техники

безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

4.4. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы сыворотки крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатитов или любой другой возбудитель вирусных инфекций.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- Спектрофотометр (длина волны 640 нм) или фотоэлектроколориметр (длина волны 610-670 нм), кювета с длиной оптического пути 10 мм;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объёмы жидкости 10, 500 и 2000 мкл;
- пробирки стеклянные вместимостью 5,0-10 мл;
- мерные колбы вместимостью 50 и 200 мл;
- мерный цилиндр вместимостью 500 мл;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\pm 0,5$ °С;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- секундомер;
- вода дистиллированная.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка крови, моча человека.

Образцы сыворотки крови можно хранить при температуре $+2-8$ °С не более 7 сут и при температуре минус 20 °С и ниже не более 2 мес.

Мочу перед анализом развести в стеклянной посуде дистиллированной водой в 100 раз.

Разведенные образцы мочи можно хранить при комнатной температуре ($+18-25$ °С) более 4 сут.

7. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

7.1. Приготовление рабочего раствора реагента 1.

Содержимое одного флакона с реагентом 4 количественно перенести в мерную колбу вместимостью 50 мл (вариант 1) или 100 мл (вариант 2), добавить дистиллированной воды примерно до 25-30 мл. Туда же количественно перенести содержимое одного флакона с реагентом 1. Объем раствора довести до метки дистиллированной водой, перемешать и перелить в ёмкость из темного стекла.

Внимание. При наличии кристаллов в реагенте 4, флакон с содержимым, не вскрывая, подогреть в теплой воде (40-50 °С) до полного растворения осадка.

Рабочий раствор реагента 1 можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

7.2. Приготовление рабочего раствора реагента 2.

Содержимое одного флакона с реагентом 2 количественно перенести в мерную колбу вместимостью 200 мл (вариант 1) или мерный цилиндр 500 мл (вариант 2). Объем раствора довести дистиллированной водой до метки (вариант 1) или до 400 мл (вариант 2), перемешать и перенести в ёмкость из темного стекла.

Рабочий раствор реагента 2 можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

7.3. Приготовление рабочего раствора реагента 3.

Содержимое одного флакона с реагентом 3 количественно перенести в мерную колбу вместимостью 200 мл (вариант 1) или мерный цилиндр 500 мл (вариант 2). Объем раствора довести дистиллированной водой до метки (вариант 1) или до 400 мл (вариант 2), перемешать и перенести в ёмкость из темного стекла.

Рабочий раствор реагента 3 можно хранить в плотно закрытом виде при температуре +2-8 °С не более 1 мес.

7.4. Определение концентрации мочевины в сыворотке крови и моче.

Компоненты реакционной смеси для определения концентрации мочевины в сыворотке крови и моче отобрать в количествах, указанных в таблице.

Внести в каждую пробирку по 500 мкл рабочего раствора реагента 1, поместить пробирки в термостат и перед добавлением анализируемой пробы (сыворотки крови или разведенной мочи) выдержать в течение 5 мин при температуре $+37 \pm 0,5$ °С.

Табл

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная проба
Сыворотка крови или разведенная моча	10	—	—
Дистиллированная вода	—	—	10
Калибратор	—	10	—
Рабочий раствор реагента 1	500	500	500
Пробу перемешать и выдержать в течение 5 мин при температуре $+37 \pm 0,5$ °С.			
Рабочий раствор реагента 2	2000	2000	2000
Рабочий раствор реагента 3	2000	2000	2000

После добавления рабочего раствора реагента 3 пробы тотчас перемешать и выждать в течение 5 мин при температуре $+37\pm 0,5$ °С.

8. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измерить оптическую плотность растворов опытной и калибровочной проб против контрольной пробы при длине волны 640 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Спектральная кривая растворов устойчива в течение 2 ч.

9. РАСЧЕТЫ

9.1. Содержание мочевины в сыворотке крови (ммоль/л) определить по формуле:

$$C = \frac{E}{E_k} \times C_k,$$

где: C – концентрация мочевины, ммоль/л;

E – оптическая плотность раствора анализируемой пробы, ед. опт. плотн.;

E_k – оптическая плотность раствора калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

C_k – концентрация мочевины в калибраторе, ммоль/л.

9.2. Содержание мочевины в суточной моче (ммоль/сут) определить по формуле:

$$M = \frac{E}{E_k} \times C_k \times V \times 100,$$

где: M – концентрация мочевины в суточной моче, ммоль/сут;

E – оптическая плотность раствора анализируемой пробы, ед. опт. плотн.;

E_k – оптическая плотность раствора калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

C_k – концентрация мочевины в калибраторе, ммоль/л;

V – количество мочи, собранное за сутки, л/сут;

100 – коэффициент разбавления мочи.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

10.1. Набор реагентов НОВОКАРБ должен храниться в упаковке предприятия изготовителя при температуре $+2-8$ °С в течение всего срока годности (2 года). Допускается хранение наборов при температуре до $+25$ °С не более 10 сут.

Замораживание компонентов набора не допускается.

10.2. Рабочие растворы реагента 1, реагента 2, реагента 3 можно хранить в плотно закрытом виде при температуре $+2-8$ °С не более 1 мес.

10.3. Калибратор после вскрытия флакона можно хранить в плотно закрытом виде при температуре $+2-8$ °С не более 3 мес.

