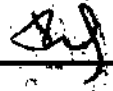


УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «ИМПАКТ»


Волков Д.В.

« 22 » октября 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения оксалатов в моче ферментативным методом.

ФОТООКСАЛАТЫ НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения содержания оксалатов в моче ферментативным методом в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 20 определений. Может быть адаптирован на автоматические анализаторы.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

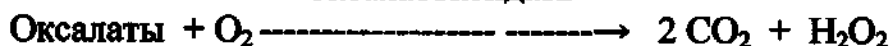
При соединении аниона щавелевой кислоты с катионом кальция образуется плохо растворимая соль – оксалат кальция, что является главным признаком мочекаменной болезни. Растворимость кальция оксалата не зависит от изменений pH мочи. Уменьшение экскреции оксалатов с мочой связано с гиперглицинемией и гиперглицинурией. Под гипероксалурией понимают повышенную экскрецию оксалатов с мочой, что может быть связано с диетой богатой оксалатами, аутомно-рецессивным нарушением метаболизма глиоксалата и развитием нефрокальциноза с прогрессирующей почечной недостаточностью, а также при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, хронических панкреатитах, желчно-каменной болезни. Установлена более высокая частота возникновения оксалатных камней у населения, проживающего в районах, где отмечается низкое содержание магния в воде и пищевых продуктах.

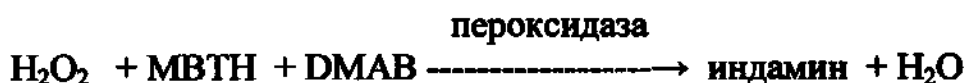
В настоящее время, несмотря на огромное количество опубликованных методов, измерение концентрации оксалатов в моче остается главной проблемой для клинических биохимиков. Большинство методов являются трудоемкими, требующими большого количества времени и не всегда доступного в клинических лабораториях оборудования. Предлагаемый ферментативный метод быстрый, специфичен для оксалатов, не требует специального оборудования, легко адаптируется для автоматических анализаторов.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Оксалаты окисляются в присутствии фермента – оксалаатоксидазы до диоксида углерода и перекиси водорода. Перекись водорода реагирует с 3-метил-2-бензтиазолинонгидразоном (МВТН) и 3-диметиламинобензойной кислотой (DMAВ) в присутствии фермента пероксидазы образуя окрашенный индамин с максимумом поглощения при длине волны 590 нм.

оксалаатоксидаза





СОСТАВ НАБОРА:

1. Реагент 1: Буфер –сукцинатный 0,05 моль/л, pH ~ 3,1 ± 0,1 - 1 флакон(20 мл)
2. Реагент 2: Субстраты – MBTH – 0,22 ммоль/л,
DMAV – 3,2 ммоль/л - 1 флакон (~30 мг)
3. Реагент 3: Ферменты – Оксالاتоксидаза - 3000 ед/л,
Пероксидаза – 100 000 ед/л - 1 флакон (~15 мг)
4. Реагент 4: Реагент для разведения образцов –
Буфер 0,1 моль/л,
ЭДТА 10 ммоль/л, pH ~ 7,6 ± 0,1 - 1 флакон (40 мл)
5. Реагент 5: Калибратор - калибровочный раствор
щавелевой кислоты 0,5 ммоль/л - 1 флакон (3мл)
6. Реагент 6: Уголь активированный - 1 флакон (6,0 г)
7. Ложка мерная - 1 штука

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор обеспечивает линейность при определении оксалатов в моче в диапазоне концентраций от 0,08 до 1,8 ммоль/л, отклонение от линейности - не более 7%. Чувствительность - не более 0,05 ммоль/л. Коэффициент вариации - не более 7%.

Для проверки правильности определений рекомендуется использовать контрольные растворы оксалатов известной концентрации и отечественные или зарубежные контрольные материалы мочи.

Нормальные величины содержания оксалатов в моче – 0,08-0,49 ммоль/сут. Дети – 0,14 – 0,42 ммоль/сут.

Нормальные величины относительных показателей в утренней пробе мочи оксалат (ммоль/л)/креатинин (ммоль/л) - мужчины – 0,008 – 0,048; женщины – 0,006 – 0,046.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин для обследуемого контингента людей.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Компоненты набора не токсичны. В качестве консерванта Реагент 1 содержит азид натрия (0,095%). Не глотать! Избегать контакта реагентов с кожей и слизистыми. При попадании на кожу и глаза Реагента 1 или Реагента 4 необходимо немедленно промыть их большим количеством воды.

Необходимо следовать принятым мерам безопасности при работе с лабораторными реагентами.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Суточную мочу собирают в стеклянную или пластиковую бутылку. Объем мочи записывают в литрах. Оксалаты стабильны в течение 7 суток при хранении в холодильнике или в замороженном состоянии. Для устранения действия бактерий можно использовать в качестве консерванта тимол или соляную кислоту.

На результаты анализа может влиять аскорбиновая кислота (витамин С) в концентрации превышающей 16 ммоль/л. Пациентам рекомендуется отказаться от приема большого количества витамина С или продуктов, богатых витамином С, за 48 часов до

сбора мочи.

Процесс сбора и исследования суточной мочи трудоемок, достаточно неудобен, требует наличия специальной лабораторной посуды, и использования консервантов мочи. Применение консервантов может повлиять на результаты исследования и приводит к существенным ошибкам при анализе полученных результатов.

Альтернативой изучению суточной экскреции мочи является определение относительных биохимических показателей в утренней порции мочи. С этой целью в ней определяют концентрацию (ммоль/л) оксалатов и (ммоль/л) креатинина в моче. Результат получают в относительных единицах ммоль оксалата/ммоль креатинина. В пробах утренней мочи влияние факторов питания, а также отклонений, вызванных физической активностью и положением тела, сводится к минимуму.

Простота получения и возможность анализа нескольких разных проб мочи для каждого пациента делают многократное исследование порции утренней мочи в терапевтическом и диагностическом плане более значимым, чем исследование одной 24-часовой пробы.

Концентрация креатинина является постоянной величиной, которая зависит от клубочковой фильтрации, массы тела и возраста. У мужчин уровень креатинина (молекулярная масса 113,12) составляет примерно 0,17 – 0,24 ммоль/кг/сут (19,2 – 27,2 мг/кг/сут), а у женщин 0,13 – 0,19 ммоль/кг/сут (14,7 – 21,5 мг/кг/сут). Результат получают в относительных единицах ммоль оксалата/ммоль креатинина.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

- Спектрофотометр, фотометр или автоматический анализатор, длина волны 590 (580-600) нм,
- кювета с длиной оптического пути 10мм;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,05 - 1,0 мл;
- секундомер;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл;
- пробирки центрифужные вместимостью 15 мл;
- центрифуга или плотная фильтровальная бумага;
- вода дистиллированная.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

1. Приготовление Рабочего реагента

Содержимое флакона с Реагентом 2 пересыпать во флакон с Реагентом 1. Перемешать круговыми движениями до полного растворения. Во флакон с Реагентом 2 добавить 1 мл раствора из флакона с Реагентом 1, перемешать круговыми движениями для растворения возможных остатков порошка и перелить раствор во флакон с Реагентом 1. Хорошо перемешать. Рабочий реагент готов к употреблению.

Раствор стабилен не более 2 месяцев при температуре (+2 ÷ +8°C).

2. К содержимому флакона с Реагентом 3 добавить 2,0 мл дистиллированной воды. Перемешать, не встряхивая, до полного растворения. Раствор стабилен не более 1 месяца при температуре (+2 ÷ +8°C) или 2 месяца при температуре (-18 ÷ -20°C).

3. Реагент 4, Реагент 5 и Реагент 6 готовы к употреблению.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Подготовка пробы.

1. Подготовить серию пронумерованных пробирок для проб мочи и контрольных образцов.
2. В каждую пробирку внести по 2 мл образца (количество можно менять) и такое же количество (2 мл) Реагента 4. Перемешать.
3. Проверить в каждой пробирке pH. Если pH меньше 7,0 добавить 1 N NaOH, если больше 7,0 – подкислить 1N HCl.
4. Пронумеровать центрифужные пробирки. В каждую пробирку внести по 1 мерной ложке (или взвесить 250-300 мг) Реагента 6 и по 2 мл каждого разбавленного образца (см. п.2). Перемешать, встряхивая вручную время от времени в течение 5 минут или на ротационном миксере.
5. Отцентрифугировать пробирки в течение 5 минут при 2000 об/мин или отфильтровать, используя плотную фильтровальную бумагу.

Проведение анализа

Анализ проводится при температуре 18-25° С или при 37°С.

Для определения концентрации оксалата внести в пробирки анализируемые образцы и реагенты по следующей схеме:

Реагенты	Холостая проба, мл	Калибровочная проба, мл	Опытная проба, мл
Рабочий реагент	1,0	1,0	1,0
Дистиллированная вода	0,05	-	-
Реагент 5 (калибратор)	-	0,05	-
Проба мочи (супернатант после центрифугирования)	-	-	0,05
Реагент 3	0,1	0,1	0,1

Пробы тщательно перемешать. Инкубировать 5 минут при выбранной температуре. Измерить величину оптической плотности опытной ($\Delta A_{пр}$) и калибровочной ($\Delta A_{кал}$) проб в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 590 нм против холостой пробы.

Окраска проб стабильна в течение 30 минут.

РАСЧЕТЫ

Расчёт концентрации оксалатов в анализируемых пробах провести по формуле:

$$C = \frac{\Delta A_{пр}}{\Delta A_{кал}} \times 0,5 \times 2$$

где: C - концентрация оксалатов, ммоль /л;

0,5 – концентрация оксалатов в калибраторе, ммоль/л;

2 – коэффициент разбавления пробы

Количество оксалатов в суточной моче = C (ммоль/л) x суточный объем мочи.

Для того чтобы получить экскрецию оксалатов в мг/сут величину концентрации оксалатов в суточной моче ммоль/сут необходимо умножить на 90.

Если концентрация оксалатов в моче превышает верхнюю границу линейного диапазона, необходимо разбавить образец в 2 раза (к 1 объему мочи добавить 1 объем

дистиллированной воды) и далее провести анализ как описано выше. Результаты умножить на фактор разведения -2.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ

Хранение набора должно проводиться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре $+2 \div +8^{\circ}\text{C}$ в темном месте в течение всего срока годности.

Срок хранения набора – 12 месяцев.

Рабочий реагент можно хранить при температуре $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 2 месяцев при условии достаточной герметизации.

Раствор Реагента 3 можно хранить при температуре $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 1 месяца или при температуре $(-20 \div -25)^{\circ}\text{C}$ не более 2 месяцев.

Реагент 4 после вскрытия флакона можно хранить при температуре $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 месяцев.

Реагент 5 после вскрытия флакона можно хранить при $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 месяцев.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора «ФОТООКСАЛАТЫ», следует обращаться в ООО «ИМПАКТ» по телефону: (495) 679-17-03, 8-919-109-29-31 (Журавлева Нина Ивановна).

Главный специалист
ООО «ИМПАКТ» К.Х.Н.



Журавлева Н. И.

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО Минздрав-
соцразвития России д. м. п., профессор



Толгов В. В.

Подпись	<i>В. В. Толгов</i>
удостоверение	
№	<i>10</i>
д. м. п.	<i>20/12</i>

Листы в количестве 5 шт.
Прошиты и опечатаны

Генеральный директор
ОО «ИМПАКТ»  Д.В.Волков

