

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «ИМПАКТ»



Волков Д.В.

« 22 » октября 2012 г.

ИНСТРУКЦИЯ

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

ФОТОЦИТРАТЫ**НАЗНАЧЕНИЕ**

Набор предназначен для количественного определения содержания лимонной кислоты (цитратов) в моче ферментативным методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 20 определений.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Лимонная кислота является важным химическим ингибитором камнеобразования. Гипоцитратурия является одним из самых частых метаболических дефектов, который предрасполагает к камнеобразованию в мочеполовой системе, поэтому в качестве первичной или дополнительной терапии почти всех пациентов, у которых диагностируются кальций содержащие камни, рекомендуется определять содержание цитратов.

Ферментативный гидролиз лимонной кислоты в присутствии фермента Цитратлиазы (ЦЛ) протекает до образования щавелевоуксусной кислоты, с последующим декарбоксилированием ее до пировиноградной кислоты и восстановлении образовавшихся кислот под действием восстановленного Никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) в присутствии ферментов L-малатдегидрогеназы (МДГ) и L-лактатдегидрогеназы (ЛДГ) до L-яблочной и L-молочной кислот. При этом НАДН превращается в окисленную форму НАД⁺. Уменьшение концентрации НАДН в исследуемом растворе пропорционально концентрации лимонной кислоты или ее соли. Изменение оптической плотности измеряется при длине волны 340 нм (334-365 нм).

СОСТАВ НАБОРА:

- | | |
|---|---------------------|
| 1. Реагент 1: Буфер- глицилглицин 0,1 моль/л, рН ~7,8 | - 1 флакон (20 мл) |
| 2. Реагент 2: Суспензия ферментов – МДГ ~600 ед/мл,
ЛДГ ~1400 ед/мл | - 1 флакон (0,5 мл) |
| 3. Реагент 3: НАДН – 0,1 ммоль/л | - 1 флакон (1,0 мл) |
| 4. Реагент 4: Фермент Цитратлиаза ~40 ед/мл | - 1 флакон (50 мг) |
| 5. Реагент 5: Калибратор (калибровочный раствор
лимонной кислоты, 1,04 ммоль/л) | - 1 флакон (2,0 мл) |

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Набор обеспечивает линейность при определении цитратов в моче в диапазоне концентраций от 0,26 до 2,08 мМ /л, отклонение от линейности - не более 7%. Чувствительность - не более 0,2 мМ/л. Коэффициент вариации - не более 7%.

Для проверки правильности определений рекомендуется использовать контрольные растворы лимонной кислоты известной концентрации (калибратор) и отечественные или зарубежные контрольные материалы мочи.

Нормальные величины содержания цитратов в моче -0,6 -1,67 ммоль/л.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Компоненты набора не токсичны. При работе с Реагентом 1, содержащим в качестве консерванта азид натрия (0,095%), следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые. В случае попадания на кожу и слизистые следует промыть пораженное место большим количеством проточной воды.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Суточную мочу собирают в стеклянную или пластиковую бутылку, содержащую соляную кислоту или 10 г борной кислоты в качестве консерванта. Объем мочи записывают в литрах. Цитраты стабильны в течение 30 суток при хранении в холодильнике или в замороженном состоянии.

Пациентам рекомендуется отказаться по возможности от приема лекарств, вызывающих защелачивание или закисление мочи.

Используют прозрачные образцы, при необходимости пробу можно отфильтровать. Проверить pH мочи. Если pH больше 7,0 скорректировать добавлением 1 N HCl. Если pH меньше 5,0 - добавить 1N NaOH.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

- Спектрофотометр, фотометр или автоматический анализатор, длина волны 340 (334, 365) нм,
- кювета для измерений в УФ области спектра с длиной оптического пути 10мм;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,02 - 1,0 мл;
- секундомер;
- пробирки стеклянные вместимостью 10 мл;
- вода дистиллированная.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Флаконы Реагент 1, Реагент 2 и Реагент 3 - готовы к употреблению.

Содержимое флакона Реагент 4 растворить в 2,0 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен не более 1 недели при температуре (+2 ÷ +8°C) или 2 месяца при температуре (-18 ÷ -20°C).

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Внести в пробирки анализируемые образцы и реагенты по следующей схеме:

Реагенты	Холостая проба, мл	Калибровочная проба, мл	Опытная проба, мл
Реагент 1	1,0	1,0	1,0
Реагент 2	0,02	0,02	0,02
Реагент 3	0,05	0,05	0,05
Реагент 5	-	0,1	-
Проба	-	-	0,1
Дистиллированная вода	0,1	-	-

Перемешать и измерить величину оптической плотности (A_1) опытной, калибровочной и холостой пробы в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 340 (334, 365) нм относительно оптической плотности воздуха через 2 мин. Затем внести:

Реагент 4	0,1	0,1	0,1
-----------	-----	-----	-----

Перемешать и измерить величину оптической плотности (A_2) растворов через 3 мин.

При проведении серийных испытаний для всей серии образцов используют только одну холостую пробу.

Рассчитать разность оптических плотностей ($A_1 - A_2$) пр. Она должна находиться в интервале от 0,05 до 1,0 (измерения при длинах волн 334 и 340 нм) или от 0,1 до 0,5 (измерения при длине волны 365 нм). При большей разности оптических плотностей раствор пробы разбавить в 2 раза (к 1 объему мочи добавить 1 объем дистиллированной воды) и далее провести анализ как описано выше. Результаты умножить на фактор разведения $F = 2$.

РАСЧЕТЫ

Рассчитать разность оптических плотностей опытной $[(A_1 - A_2)_{\text{пр}}]$, калибровочной $[(A_1 - A_2)_{\text{кал}}]$ и холостой $[(A_1 - A_2)_{\text{хп}}]$ пробы:

$$\Delta A_{\text{пр}} = (A_1 - A_2)_{\text{пр}} - (A_1 - A_2)_{\text{хп}}$$

$$\Delta A_{\text{кал}} = (A_1 - A_2)_{\text{кал}} - (A_1 - A_2)_{\text{хп}}$$

Расчёт концентрации цитратов в анализируемых пробах провести по формуле:

$$C = \frac{\Delta A_{\text{пр}}}{\Delta A_{\text{кал}}} \times 1,04 \times F$$

где: C - концентрация лимонной кислоты, ммоль /л;

1,04 – концентрация лимонной кислоты в калибраторе, ммоль/л;

F – фактор разбавления пробы (при проведении определения без разбавления $F=1$).

Количество цитратов в суточной моче = C (ммоль/л) $\times$ суточный объем мочи.

АВТОМАТИЗАЦИЯ

При работе на автоматических анализаторах приготовить рабочий раствор: смешать: Реагент 1 – 10 мл; Реагент 2 – 0,2 мл; Реагент 3 – 0,5 мл.

При использовании автоматических или полуавтоматических биохимических анализаторов количество реагентов и анализируемых образцов может быть пропорционально изменено в зависимости от объема используемой кюветы (соотношение объема мочи к рабочему раствору составляет 1: 10).

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.

Буферный раствор можно хранить при температуре $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 6 месяцев после вскрытия флакона.

Суспензию ферментов можно хранить при температуре $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 6 месяцев после вскрытия флакона.

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

Раствор ЦЛ можно хранить при температуре $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 1 недели или при температуре $(-20 \div -25)^{\circ}\text{C}$ не более 2 месяцев при условии достаточной герметизации флакона.

Рабочий раствор для автоматического анализатора можно хранить при температуре $(+2 \div +8)^{\circ}\text{C}$ не более 3 суток или при температуре $(-20 \div -25)^{\circ}\text{C}$ не более 4 недель.

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

По вопросам, касающимся качества набора «Фотоцитраты», 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. н., профессор



Долгов В. В.

Подпись 
удостоверяю:
Специалист по кадрам РМАПО
Подпись _____
"10" _____ 2012 года

Документы на 4 листах
прошиты и опечатаны

Генеральный директор
ООО "Импакт"

Д.В.Волков

