

КОПИЯ ВЕРНА

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Руководителя Департамента
Государственного контроля качества,
эффективности, безопасности лекарственных
средств и медицинской техники МЗ РФ



Топорков А.А.

2001 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения концентрации мочевины
в биологических жидкостях
(МОЧЕВИНА -- ОЛЬВЕКС)

Рекомендована к утверждению комиссией по лабораторным реагентам
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 1 от 29 января 2001 г.)

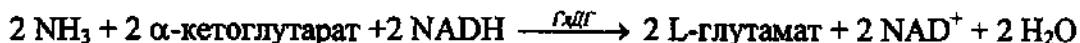
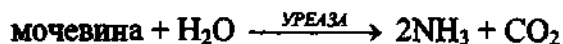
Назначение

Набор предназначен для количественного определения мочевины в сыворотке (плазме) крови и моче человека уреазно-глутаматдегидрогеназным методом в клиничко-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 50, 100 или 400 определений при расходе 1,0 мл рабочего реагента на один анализ.

Принцип метода

Определение основано на проведении сопряженных реакций, катализируемых уреазой и глутаматдегидрогеназой (ГлДГ) в присутствии NADH:



Инструкция составлена руководителем НКО клинической лабораторной диагностики, руководителем отдела атеросклероза НИИ Кардиологии Минздрава РФ, д.м.н., профессором В.С.Гуревичем и техническим директором ООО "Ольвекс Диагностикум" А.Ю.Ивановым.

Уменьшение оптической плотности, связанное с переходом NADH в окисленную форму (NAD⁺), пропорционально концентрации мочевины в пробе и регистрируется фотометрически при длине волны 340 нм.

Состав набора:

Реагент 1. Буфер, pH 8,0.

Конечные концентрации в рабочем реагенте: ТРИС, 100 ммоль/л; натрия азид, 13,8 ммоль/л; кислота янтарная, 50 ммоль/л — 1 флакон (30 мл), или 1 флакон (60 мл), или 1 флакон (240 мл).

Реагент 2. Раствор ферментов, pH 8,0.

Конечные концентрации в рабочем реагенте: АДФ, 1,5 ммоль/л; уреазы, 30000 Ед/л; ГлДГ, 1000 Ед/л, кислота ортофосфорная, 10 ммоль/л; натрия азид, 13,8 ммоль/л; натрия гидроокись, 5 ммоль/л — 1 флакон (10 мл), или 1 флакон (20 мл), или 1 флакон (80 мл).

Реагент 3 – NADH.

Конечные концентрации в рабочем реагенте: динатриевая соль α -кетоглутаровой кислоты, 15 ммоль/л; NADH, 0,35 ммоль/л, натрия азид, 13,8 ммоль/л — 1 флакон (10 мл), или 1 флакон (20 мл), или 1 флакон (80 мл).

Калибратор - калибровочный раствор мочевины, 13,3 ммоль/л; натрия азид, 13,8 ммоль/л; готов к применению — 1 флакон (2,0 мл), или 1 флакон (4,0 мл), или 1 флакон (10 мл).

Аналитические характеристики

Линейная область определения концентрации мочевины — в диапазоне от 1 до 33,3 ммоль/л, отклонение от линейности не превышает 5 %.

Чувствительность определения концентрации мочевины не превышает 0,7 ммоль/л.

Коэффициент вариации результатов определений - не более 5 %.

Качество набора может проверяться по отечественным или зарубежным контрольным сывороткам с известной концентрацией мочевины, аттестованными уреазным-глутаматдегидрогеназным методом.

Нормальные величины: сыворотка (плазма) крови — 1,7–8,3 ммоль/л; моча — 333–583 ммоль/сут.

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

Анализируемые образцы

Негемолизированная сыворотка (плазма) крови, моча.

Перед проведением анализа свежую мочу следует развести дистиллированной водой в 100 раз.

Меры предосторожности

Реагенты содержат токсичный компонент — азид натрия в качестве протектора. Следует избегать попадания реагентов на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место проточной водой. При попадании внутрь следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

При работе с сывороткой или плазмой крови следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека являются потенциально инфициро-

ванным материалом, способным длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Оборудование, материалы и реагенты:

- Спектрофотометр, длина волны 340 нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 10 мм; полуавтоматический или автоматический биохимический анализатор;
- термостат, поддерживающий температуру $+37 \pm 1$ °С;
- секундомер;
- пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками; позволяющие отбирать объемы жидкости 10 и 1000 мкл;
- колбы конические вместимостью 50, 100, 200, 400 мл;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- вода дистиллированная.

Приготовление рабочего реагента

Смешать в колбе конической необходимое количество реагента 1, реагента 2 и реагента 3 в соотношении 3:1:1.

Полученный рабочий реагент можно хранить в темном месте при температуре $+2-8$ °С не более 20 дней.

Проведение анализа

Внести в кювету спектрофотометра, предварительно подогретую до температуры $+37$ °С, 10 мкл сыворотки (плазмы) крови или разведенной мочи, добавить 1000 мкл рабочего реагента, предварительно подогретого до температуры $+37$ °С, перемешать и через 60 с (точно!) измерить оптическую плотность (E_1) при длине волны 340 нм при температуре $+37$ °С в кювете с толщиной слоя 10 мм против воздуха. Через 60 с (точно!) повторно измерить оптическую плотность (E_2) при тех же условиях.

Аналогичным образом измерить оптическую плотность калибратора в тех же условиях.

Расчеты

Вычислить изменения оптической плотности для анализируемой и калибровочной проб по следующим формулам:

$$\begin{aligned}\Delta E_{\text{оп}} &= E_1 - E_2 \\ \Delta E_{\text{кал}} &= E_1 - E_2\end{aligned}$$

где: $\Delta E_{\text{оп}}$ – изменение оптической плотности анализируемой пробы, ед. опт. плотн;
 $\Delta E_{\text{кал}}$ – изменение оптической плотности калибровочной пробы, ед. опт. плотн.

Содержание мочевины в сыворотке (плазме) крови определить по формуле:

$$C = \frac{\Delta E_{\text{оп}}}{\Delta E_{\text{кал}}} \cdot 13,3 \quad ,$$

где: C – концентрация мочевины, ммоль/л;
 13,3 – концентрация мочевины в калибраторе, ммоль/л.

Содержание мочевины (X_m) в моче рассчитать по формуле:

$$X_m = \frac{E_{np}}{E_{kal}} \cdot 13,3 \cdot V \cdot 100 \quad (\text{ммоль/сут}),$$

где: E_{np} – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотности;
 E_{kal} – оптическая плотность калибратора, ед. опт. плотности;
 13,3 – концентрация мочевины в калибраторе, ммоль/л;
 V – объем суточной мочи, л;
 100 – коэффициент разведения исследуемого образца.

Условия хранения и эксплуатации набора

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя в темном месте при температуре $+2-8^\circ\text{C}$ в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до $+25^\circ\text{C}$ не более 5 дней.

Калибратор после вскрытия флакона стабилен до конца срока годности набора.

Реагенты 1, 2 и 3 после вскрытия флаконов флакона стабильны в течение 1 мес.

Рабочий реагент можно хранить не более 20 с при температуре $+2-8^\circ\text{C}$.

Срок годности набора - 6 мес.

Для отбора и добавления анализируемых проб и компонентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические одноканальные пипетки, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования.

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

По вопросам, касающимся качества набора МОЧЕВИНА-ОЛЬВЕКС, следует обращаться в ООО «Ольвекс Диагностикум» по адресу:

193029, г. Санкт-Петербург, пр. Обуховской обороны, д. 70.

Тел: (812) 567-84-46, (812) 567-83-02;

Факс: (812) 567-84-29

и в Институт государственного контроля лекарственных средств НЦЭГКЛС Минздрава РФ по адресу:

117246, г. Москва, Научный проезд, д. 14 А.

Тел: (095) 120-60-95.

Д.м.н., профессор



В.С.Гуревич

Технический директор ООО "Ольвекс Диагностикум"



А.Ю.Иванов