

2. Определение мочевины в цельной крови.

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки вместимостью 10 мл в количествах, указанных в таблице 2.

Таблица 2

Отмерить, мл	Опытная пробы	Калибровочная пробы	Контрольная (холостая) пробы
Цельная кровь	0,05	-	-
Калибровочный раствор мочевины	-	0,05	-
Раствор трихлоруксусной кислоты	0,5	0,50	0,10
Содержимое пробирок тщательно перемешать. Центрифугировать опытные пробы в течение 10 минут при 3000 об/мин при комнатной температуре (+18–25° С)			
Надосадочная жидкость	0,10	0,10	-
Рабочий раствор	2,00	2,00	2,00

Дальше определение, измерение оптической плотности и расчеты проводить так, как это указано для сыворотки (плазмы) крови.

УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2–8° С в течение всего срока годности. Допускается хранение наборов при температуре до +25° С не более 5 суток.

Срок годности набора – 3 года.

Раствор реакционной смеси может храниться в темном месте в плотно укупоренной посуде при комнатной температуре (+18–25° С) не более 2 недель.

Раствор серной кислоты и раствор трихлоруксусной кислоты могут храниться в плотно укупоренной посуде при комнатной температуре не более 1 года.

Рабочий раствор хранению не подлежит.

Калибровочный раствор мочевины после вскрытия флакона может храниться в укупоренном виде при температуре +2–8° С не более 3 месяцев.

При концентрации мочевины выше, чем 17 ммоль/л, исследуемый образец необходимо развести дистиллированной водой в соотношении 1:1, повторить анализ и полученный результат умножить на 2.

Для липидических или гемолизированных образцов сыворотки (плазмы) крови определение следует проводить так, как это описано для цельной крови.

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

По вопросам, касающимся приобретения наборов и их качества, просим обращаться по адресу: 105173, г. Москва, ул. Западная, д. 2, стр. 1, ООО «Агат-Мед». Телефон для справок: (495) 777-41-92.

Инструкция составлена: к.б.н. И.В. Смирновым – зав. лабораторией ГНЦ РАМН, В.В. Гладуном – главным технологом ООО «Агат-Мед».



Клиническая
биохимия

МОЧЕВИНА АГАТ

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Департамента государственного контроля
лекарственных средств, изделий медицинского назначения
и медицинской техники МЗ РФ
В.Е.Акимочкин
18.09.2003 г.

Рекомендована к утверждению
экспертной Комиссией по лабораторным реагентам
Комитета по новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 8 от 31 октября 2002 г.)

ИНСТРУКЦИЯ по применению набора реагентов для колориметрического определения содержания мочевины в биологических жидкостях по реакции с диацетилмонооксимом

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного колориметрического определения концентрации мочевины в сыворотке и плазме крови, цельной крови и моче человека диацетилмонооксимным методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и в научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 400 определений при расходе 2,0 мл рабочего раствора на один анализ.

ПРИНЦИП МЕТОДА

В кислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа мочевина образует с диацетилмонооксимом комплексное соединение красного цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевины в анализируемом образце и измеряется фотометрически при длине волн 510 (490–540) нм.

СОСТАВ НАБОРА

1. **Реакционная смесь** сухая (диацетилмонооксим – 0,101 г; тиосемикарбазид – 0,015 г), 0,136 г – 4 пробирки.

2. **Раствор соли железа трехвалентного** (железо треххлористое – 5,0 ммоль/л), 5,0 мл – 1 флакон.

3. **Калибровочный раствор мочевины** (мочевина – 8,0 ммоль/л, бензойная кислота – 1,8 г/л), 2,0 мл – 1 флакон.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Линейная область определения концентрации мочевины – в диапазоне от 2 до 17 ммоль/л, отклонение от «линейности» – не более 7%.

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

Воспроизводимость: коэффициент вариации результатов определений – не более 7%.

Нормальные величины концентрации мочевины составляют:

– для сыворотки крови и плазмы крови, цельной крови 2,5–8,3 ммоль/л;

– для мочи 330–580 ммоль/сут.

Качество набора можно оценивать по контрольным сывороткам отечественного или зарубежного производства, аттестованным данным методом.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон нормальных величин у обследуемого контингента.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

Потенциальный риск применения набора – класс 2а.

При работе с набором необходимо соблюдать правила техники безопасности, рекомендуемые при работе с кровью в соответствии с «Инструкцией по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебных и профилактических учреждений», утвержденной Минздравом СССР 17.01.91 г., и «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (М., 1981 г.).

При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированные, способные длительное время сохранять или передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Рабочий раствор содержит тиосемикарбазид – ядовитое вещество, и серную кислоту – едкое вещество. При работе с набором используется трихлоруксусная кислота – едкое вещество. Операции приготовления раствора трихлоруксусной кислоты и инкубации пробирок с образцами в кипящей водяной бане следует проводить в вытяжном шкафу. В случае попадания растворов на кожу и слизистые необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством проточной воды. Пипетирование ртг ос категорически запрещается. При попадании внутрь следует немедленно выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

Другие компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАГЕНТЫ

- Спектрофотометр, длина волны 510 нм, или фотоэлектроколориметр, длина волны 490–540 нм (зеленый светофильтр), кювета с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм;
- пипетки, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,01; 0,05; 0,5 и 2,0 мл;
- колбы мерные вместимостью 100, 200 и 500 мл;
- пробирки центрифужные вместимостью 10 мл;
- баня водяная, обеспечивающая температуру +100±1° С;
- центрифуга лабораторная на 3000 об/мин;
- секундомер;
- вода дистиллированная;
- кислота серная концентрированная (98%), хч;
- кислота трихлоруксусная, ч;
- перчатки резиновые или пластиковые.

АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Негемолизированная сыворотка или плазма крови, цельная кровь, моча.

Мочу перед анализом следует развести дистиллированной водой в соотношении 1:50–1:100, полученный результат умножить на разведение.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Раствор реакционной смеси. В мерную колбу вместимостью 100 мл количественно перенести содержимое одной пробирки с сухой реакционной смесью и растворить его примерно в 60 мл дистиллированной воды при нагревании до температуры +40–50° С. После охлаждения добавить 1,0 мл раствора соли железа трехвалентного и довести дистиллированной водой до метки.

Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре (+18–25° С) не более 2-х недель. Наличие небольшого количества нерастворимого осадка не мешает определению.

Раствор серной кислоты 1,8 моль/л. В мерную колбу вместимостью 500 мл внести около 300 мл дистиллированной воды и при постоянном помешивании добавить 50 мл серной кислоты; после охлаждения довести дистиллированной водой до метки.

Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре не более 1 года.

Рабочий раствор. Готовят смешиванием одной части раствора реакционной смеси с одной частью раствора серной кислоты.

Следует ежедневно готовить свежий рабочий раствор, хранению не подлежит.

Раствор трихлоруксусной кислоты 50 г/л (для депротеинирования). 10 г трихлоруксусной кислоты растворить в 200 мл дистиллированной воды.

Полученный раствор можно хранить при комнатной температуре не более 1 года. Калибровочный раствор мочевины готов к применению.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1. Определение мочевины в сыворотке (плазме) крови и моче.

Компоненты реакционной смеси внести в пробирки вместимостью 10 мл в количествах, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Отмерить, мл	Опытная проба,	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка (плазма) крови, разведенная моча	0,01	-	-
Калибровочный раствор мочевины	-	0,01	-
Рабочий раствор	2,00	2,00	2,00

Содержимое пробирок тщательно перемешать, пробирки закрыть колпачками из алюминиевой фольги и поместить точно на 10 минут в кипящую водяную баню. Затем пробирки быстро охладить в потоке холодной воды и измерить величину оптической плотности калибровочной и опытных проб против контрольной (холостой) пробы при длине волны 510 (490–540) нм в кювете с толщиной поглощающего свет слоя 10 или 5 мм. Окраска устойчива в течение 15 минут после охлаждения проб.

Концентрацию мочевины в сыворотке (плазме) крови рассчитать по формуле:

$$C = \frac{E_0}{E_K} \times 8,0 ,$$

где: C – концентрация мочевины в опытной пробе, г/л;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

E_K – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

8,0 – концентрация мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л.

Клиренс мочевины (содержание мочевины в суточной моче) рассчитать по формуле:

$$K = \frac{E_0}{E_K} \times R \times D \times 8,0 ,$$

где: K – клиренс мочевины, ммоль/сут;

E_0 – оптическая плотность опытной пробы, ед.опт.плотн.;

E_K – оптическая плотность калибровочной пробы, ед.опт.плотн.;

R – коэффициент разведения мочи;

D – суточный диурез, л;

8,0 – концентрация мочевины в калибровочном растворе, ммоль/л.

Примечание: при использовании кювет другого объема расход реагентов может быть пропорционально изменен с сохранением соотношения объема анализируемого образца к объему рабочего раствора 1:200.