Urinary Oxalate

Enzymatic Method
(Automated&Manual)

مقدمه:

اندازه گیری اگزالات ادرار در بیماران مبتلا به سنگ های کلیوی و بیمارانی که تحت شرایطی مستعد افزایش دفع اگزالات هستند (سندروم های اولیه و ثانویه هیپراگزالوریک) حائز اهمیت کلینیکی است.

اصول متد:

بیشتر متدهای معمولی برای اندازه گیری اگزالات ادرار شامل جدا سازی آن از مواد تداخلگر موجود در ادرار از طریق رسوب گیری ، استخراج با کروماتوگرافی و اندازه گیری اگزالیک اسید به روشهایی چون تیتراسیون حجمی کلریمتری، اسپکتروسکوپی جذب اتمی ، فلوریمتری و کروماتوگرافی مایع می باشد که علاوه بر طولانی بودن مراحل آن هر یک به نوبه خود دارای عیوبی بوده و از طرفی میزان بازیابی متد پایین است.در این متد از روش آنزیمی استفاده شده که در آن اگزالات ادرار توسط آنزیم اگزالات اکسیداز به دی اکسید کربن و پراکسید هیدروژن تبدیل می گردد. پراکسید هیدروژن ایجاد شده سپس درحضور آنزیم پراکسیداز با اکسیداسیون کروموژن مناسب ایجاد کمپلکس رنگی نموده که به روش اسپکترو فتومتری اندازه گیری می گرددو شدت رنگ آن متناسب با غلظت اگزالات خواهد بود.

معرف ها:

1 . محلول بافر	25 ml
2 .معرف آنزیمی لیوفیلیزه	5 vials
3 . زغال اکتیو	12 g
4 . استاندارد اسید اگزالیک(0.25 mM)	5 ml
5 . محلول رقیق کننده ادرار	60 ml
6 . معرف رنگزا لیوفیلیزه	1 vial

***طرز تهیه معرف رنگزا :**

جهت تهیه این معرف مقداری از بافر شماره (1) را به ویال شماره (6) اضافه کرده و پس از حل شدن به ظرف حاوی با فر شماره (1) منتقل نموده مخلوط کنید .این معرف در یخچال حداقل به مدت چهار ماه پایدار است .

طرز تهیه معرف آنزیمی:

به هر ویال معرف شماره 2 به میزان 1 ml آب مقطر اضافه کرده و به مدت 5 دقیقه درحرارت اتاق قرار داده تا آنزیم حل شود.(این محلول حداقل به مدت سه هفته در یخچال پایدار است.

شرایط نگهداری و پایداری محلول ها:

معرفهای مذکور در صورتی که دور از آلودگی و تابش مستقیم نور در یخچال نگهداری شوند تا تاریخ مندرج روی آنها پایدارند. از فریز نمودن محلولها خودداری شود.

بهداشت و ایمنی دفع مواد زائد:

در مورد دفع مواد زائد در صورت وجود قوانین تدوین شده طبق قانون موجود عمل شود.

تهیه نمونه ادرار:

جهت جمع آوری نمونه ادرار 24ساعته 10 ml اسید کلریدریک غلیظ در یک ظرف ریخته و نمونه روی آن جمع آوری شود.یک میلی لیتر از نمونه ادرار 24 ساعته را با یک میلی لیتر محلول رقیق کننده ادرار (شماره 5) مخلوط کرده و pH آنرا با سود یک نرمال بین 5 الی 7 تنظیم نمائید. در مرحله بعد دو قاشقک سر صاف از زغال اکتیو (معرف شماره 3) اضافه کرده وبه مدت 5 دقیقه باشیکرمخلوط کرده وآن را توسط کاغذ صافی با اندازه کوچک صاف کرده از محلول صاف شده به عنوان نمونه استفاده گردد.همچنین میتوانید به جای استفاده از کاغذ صافی مخلوط ادرار و زغال را به مدت10 دقیقه با دور 3000 rpm سانتریفوژ نمائید و سپس از لایه شفاف میانی با دقت 50 میکرولیتر جهت آزمایش بردارید. (کنترل و کالیبراتورها نیاز به مراحل آماده سازی ندارند.)

کالیبراتورها و کنترل ها:

جهت کالیبراسیون از استاندارد اگزالات و یا کالیبراتورهای معتبر و جهت کنترل از کنترلهای معتبر تجاری استفاده گردد.

نمونه : ادرار

روش کار:

1-دستگاهی:

جهت نصب روی دستگاههای مختلف با شرکت درمان فراز کاو تماس بگیرید.

2-روش دستی:

در سه لوله آزمایش بشرح جدول زیر عمل نمائید:

	T(µl)	S(µl)	B(µl)
ادرار صاف شده	50	—	—
استاندارد	—	50	—
آب مقطر	—	—	50
*معرف رنگزا تهیه شده	1000	1000	1000
محلول آنزیمی آماده شده	250	250	250

کاملا مخلوط نموده و به مدت 10 دقیقه درحرارت 37 ° C قرار دهید سپس جذب لوله های T وS را در مقابل لوله B (بلانک) در طول موج 590 nm بخوانید

محاسبات :

$$\text{غلظت اگزالات ادرار}\ (\text{mmol/L}) = \frac{Abs.T}{Abs.S} \times 0.25 \times 2$$

اگزالات ادرار 24 ساعته :

mmol/ 24h= mmol/L × حجم ادرار24ساعته(لیتر)

(برای تبدیل mmol/L به mg/L نتیجه را در عدد 90 ضرب نمایید)

ویژگی های آنالیتیک کیت :

محدوده اندازه گیری:

این کیت جهت اندازه گیری اگزالات در محدوده0.05 تا0.7 میلی مولار طراحی شده و در مواردی که مقدار اگزالات بیش از 0.7 میلی مولار میباشد نمونه بایدرقیق و نتیجه در ضریب رقت ضرب گردد.

حساسیت :

حداقل مقدار اگزالات قابل اندازه گیری 0.05 mmol/L می باشد.

عوامل مداخله گر:

گلوکز تا غلظت 50mmol/L, اسید آسکوربیک تا غلظت16mmol/L و اسید اوریک تا غلظت 5mmol/L باعث تداخل در آزمایش اگزالات نمی شود.

دقت (precision): با استفاده از ادرار نتایج زیردر حرارت37°C حاصل شده است.

Within run, n=20	Sample1	Sample2	Sample3
Mean (mmol/L)	0.25	0.410	0.55
SD (mmol/L)	0.09	0.011	0.018
CV%	3.6	2.68	3.27

Between run, n=18	Sample1	Sample2	Sample3
Mean (mmol/L)	0.25	0.41	0.55
CV%	4.0	3.65	3.27

مقایسه روش ها :

به منظور مقایسه با متدهای معتبر تعداد 60 نمونه ادرار بیمار را با متد درمان فرازکاو (Y) و یک متد معتبر خارجی(X) مورد آنالیز قرار داده که نتیجه زیر بدست آمد

$$Y=1.035(X) - 0.170 \; ; \; r = 0.966$$

مقادیر نرمال:

	mg/24h	mmol/24 h
مردان :	9-49	0.1-0.55
زنان:	7-40	0.08-0.44
کودکان:	12-41	0.14-0.45

SD (mmol/L)	0.10	0.15	0.016

محدوده گزارش شده از آنالیزتعدادی نمونه از افراد نرمال گزارش شده توصیه میشود هر آزمایشگاه با توجه به محدوده جغرافیایی خود محدوده نرمال را به دست آورد.

References:

1.M.F Laker,A.F.Hofmann. and B.J.D.Meeuse. Clin. Chem. 267 ,827-830 ,1980.

2. Joseph E . Buttery and Peter R. Pannall . Clin.Chem. 33/10,1931-1933 ,1987.

3. Darman faraz Kave Res . Lab . Isfahan , Iran . 2015

لطفادر صورت نیاز با شماره تلفن های 52374132 ، 52374707 -031 تماس حاصل فرمائید.

آدرس : اصفهان ، شهرک صنعتی سه راه مبارکه، فاز چهارم ، خیابان دهم ، پلاک 7، شرکت درمان فراز کاو

شماره فاکس : 52374254 -031

E.mail : info@darmanfarazkave.com

WWW.darmanfarazkave.com