

**DAC-SPECTROMED S.R.L.**

МД-2012, Молдова, г. Кишинев, ул. Армянская, 47, кв. 64

Тел.: +37322/ 574900, 574922/23; факс: +37322/ 574920

Email: [office@dacspectromed.com](mailto:office@dacspectromed.com)[www.dacspectromed.com](http://www.dacspectromed.com)**Citric Acid Sp-DAC**

Код 3026C100 100 мл

PT MD 11-15796482-001:2003

Только для диагностики «in vitro»

**Хранить при 2-8°C**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ В СПЕРМЕ. ФЕРМЕНТАТИВНО-СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД

**ПРИНЦИП МЕТОДА**

Лимонная кислота в образце реагирует с лимонной лиазой (CL), образуя оксалацетат и ацетат. В присутствии малат-дегидрогеназы (MDH) и лактат-дегидрогеназы (LDH), оксалацетат и пируват (декарбоксилированный продукт оксалацетата), превращается в L-малат и L- лактат, окисляя NADH до NAD, что вызывает убывание абсорбции раствора.

Абсорбция, измеренная при длине волны 340 (334-365) nm, пропорциональна концентрации лимонной кислоты.

**СОСТАВ НАБОРА**

<b>Good Buffer:</b>	<b>100 ml</b>	<b>pH 7,8</b>
Буферный раствор		> 10 mmol/l
LDH		500 U/l
<b>Substrat:</b>	<b>5 x 20 ml</b>	
MDH		> 350 U/l
NADH		> 0,1 mmol/l
<b>Starter:</b>	<b>5 x 0,5 ml</b>	
CL		> 300 U/l
<b>Diluent:</b>	<b>2 x 65 ml</b>	
Раствор для разведения образцов		
<b>Standard:</b>	<b>10 ml</b>	
Лимонная кислота		1 mg/ml

**ХРАНЕНИЕ И СТАБИЛЬНОСТЬ РЕАГЕНТОВ**

Реагенты при 2-8°C стабильны до срока, указанного на этикетке.

**ОБРАЗЦЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Сперма. Стабильна 2 дня при 2-8°C.

Перед тестированием образец отцентрифугируйте при 3000 об/мин в течение 10 минут и разведите 20 µl образца в 1200 µl раствора **Diluent**.

**ДОПОЛНИТЕЛЬНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ**

Анализатор, спектрофотометр или термостатирующий при 37°C фотометр с фильтром 340 (334-365) nm.

Дозаторы на 25 µl, 30 µl и 1,0 ml.

**МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ**

Набор предназначен только для диагностики **in vitro**.

Реагенты содержат неактивные и консервирующие компоненты. Избегайте контакта с кожей и слизистыми.

Возможные остатки реагентов и образцы пациентов подлежат уничтожению в соответствии с утвержденными внутрибольничными правилами.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧИХ РЕАГЕНТОВ**

**Рабочий субстрат:** растворите содержимое флакона с **Substrat** в 20 ml **Good Buffer**, осторожно перемешайте до полного растворения, избегая пенообразования.

**Рабочий субстрат** стабилен в течение 15 дней при 2-8°C, в течение 30 дней при -20°C.

**Рабочий стартер:** растворите содержимое флакона с **Starter** в 0,5 ml **Good Buffer**, осторожно перемешайте до полного растворения, избегая пенообразования.

**Рабочий стартер** стабилен в течение 24 часов при 2-8°C, в течение 30 дней при -20°C.

Целесообразно **Рабочий субстрат** и **Рабочий стартер** расфасовать в пластиковые пробирки в соответствии с ежедневной потребностью каждой лаборатории.

**Внимание!** Исключить повторное замораживание и размораживание **Рабочих растворов**.

**ПРОЦЕДУРА ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

Метод:	конечная точка
Длина волны:	340 (334-365) nm
Температура:	37°C
Длина оптического пути:	1 cm
Установка нуля:	бланк по реагенту

1. Доведите температуру реагентов до 37°C.

2. Внесите в маркированные пробирки:

	Контроль	Стандарт (St)	Образец (O)
<b>Рабочий субстрат</b>	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
<b>Standard</b>	-	30 µl	-
<b>Разведенный образец</b>	-	-	30 µl
<b>Дистиллир. вода</b>	30 µl	-	-
<b>Рабочий стартер</b>	25 µl	25 µl	25 µl

*NB: Объемы реагентов, стандарта и образца могут быть пропорционально изменены в соответствии с рабочим объемом кюветы используемого анализатора.*

3. Содержимое пробирок тщательно смешайте и инкубируйте 10 min при 37°C.

4. Учтите Абсорбции **Standard (A<sub>St</sub>)** и **Образца (A<sub>O</sub>)** при длине волны 340 nm против **Контроля**.

**ВЫЧИСЛЕНИЯ**

Концентрация лимонной кислоты (C<sub>O</sub>) в образце вычисляется по следующей общей формуле:

$$\frac{A_O}{A_{St}} \times C_{St} \times 61 = C_O$$

Где:

C<sub>O</sub> - концентрация лимонной кислоты в образце;

A<sub>O</sub> - абсорбция образца;

A<sub>St</sub> - абсорбция стандарта;

61 - коэффициент разведения образца;

C<sub>St</sub> - концентрация лимонной кислоты в стандарте, mg/ml.

**РЕФЕРЕНТНЫЙ ИНТЕРВАЛ**

Лимонная кислота 3,5 - 6,7 mg/ml.

Данные величины ориентировочны, рекомендуется в каждой лаборатории установить референтный интервал для своего населения.

**КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА**

Для контроля хода реакции и процедуры измерения рекомендуется использовать контрольные сыворотки с нормальными и патологическими значениями лимонной кислоты (Код 3027C30).

Каждая лаборатория должна установить собственную внутреннюю систему контроля качества.

## МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

- Воспроизводимость в пределах периода:

Средняя концентрация	CV*	n*
0,17 mg/dl	1,38 %	20
0,58 mg/dl	0,77 %	20

- Воспроизводимость от периода к периоду:

Средняя концентрация	CV*	n*
0,169 mg/dl	2,29 %	20
0,575 mg/dl	1,63 %	20

\* Где: CV–коэффициент вариации; n–количество определений.

- Предел линейности: 0,4 mg/ml (эквивалентно 24,4 mg/ml в цельном образце).

Для более высоких значений разведите образец физраствором 1:4 и повторите определение. Результат умножьте на 4.

- Достоверность: сравнительный анализ 50 образцов дал следующие результаты:

Лимонная кислота LTA = x

Лимонная кислота сравнительным методом = y

n = 50

$y = 1,00381x - 0,0028 \text{ mg/dl}$      $r = 0,99827$

Детали сравнительных экспериментов предоставляются по запросу.

Данные метрологические характеристики были получены на анализаторе. Результаты могут варьировать в зависимости от используемого оборудования или процедуры определения.

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

В процессе онтогенеза и, особенно с момента полового созревания, в секрете предстательной железы резко возрастает содержание лимонной кислоты. Лимонная кислота, образующаяся в предстательной железе, способствует разжижению семени, активации гиалуронидазы, а последняя, в свою очередь, способствует проникновению сперматозоидов в яйцеклетку. Определение лимонной кислоты в семенной жидкости даёт информацию о секреторной функции простаты. Низкую концентрацию лимонной кислоты находят у мужчин с воспалением генитальной сферы. Оценка простатической функции позволяет определить субклинические варианты простатита, которые снижают мужскую фертильность, и предотвратить передачу инфекции женщине-партнёру.

Клинический диагноз должен устанавливаться на основе интеграции клинических и лабораторных данных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Mollering, H.& Gruber, W. (1999) Determination of citrate with citrate lyase, *Anal. Biochem.* 17, 369-376.
2. Dagley, St (1974) in *Methoden der enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, N. U., Hrsg.) Bd. 2, S. 1607-1611; Verlag Chemie Weinheim ana (1974) in *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, N. U., ed.) 2nd ed, vol 3 pp. 1562-1565, Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, Inc., New York and London.
3. Pasquinelli, *Diagnostica e tecniche di laboratorio* Vol. 1. p. 1379.