



In vitro solutions

Набор биохимических реагентов для ветеринарии

АЛЬФА-АМИЛАЗА ДиаВетТест



ООО «ДИАВЕТ»

142290, г. Пущино, Московской обл.

<https://diakonvet.ru/>

info@diakonvet.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

АЛЬФА-АМИЛАЗА ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для определения общей активности альфа-амилазы кинетическим методом в сыворотке и плазме крови животных и птиц.

Набор реагентов должен использоваться квалифицированным персоналом в области ветеринарной лабораторной диагностики.

Количество определений зависит от объема фасовки реагентов и типа используемого биохимического анализатора.

МЕТОД

Ферментативный фотометрический тест (субстрат EPS-G7).

ПРИНЦИП МЕТОДА

α -Амилаза катализирует реакцию гидролиза субстрата 4,6-этилиден-глюкоза-7-п-нитрофенил-глюкоза-1- α -D-мальтогептазида (EPS-G7) с образованием п-нитрофенилолигомальтозидов, которые с участием α -глюкозидазы расщепляются до глюкозы и п-нитрофенола. Скорость образования п-нитрофенола прямо пропорциональна активности α -амилазы в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 405 нм.

СОСТАВ НАБОРА

| | |
|-----------|--|
| Реагент 1 | Буферно – ферментный раствор, pH 7,15 |
| Реагент 2 | Буферно – субстратный раствор, pH 7,15 |

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

| Параметр | Значение |
|--------------------------|----------------|
| Линейность | 5–2000 Е/л |
| Отклонение от линейности | не более 5% |
| Чувствительность | не более 5 Е/л |
| Коэффициент вариации | не более 5% |

Примечание. Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. При активности α -амилазы в образце более 2000 Е/л (изменение оптической плотности пробы в минуту ΔA /мин не должно превышать 0,35) анализируемую пробу следует развести в 10 раз физиологическим раствором (0,9% NaCl), повторить анализ и полученный результат умножить на 10

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для калибровки автоматических фотометрических систем и уточнения фактора пересчета для полуавтоматических биохимических анализаторов рекомендуем использовать мультикалибратор TruCal U производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия).

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов проводите измерения контрольной сыворотки «Норма» (TruLab N) и контрольной сыворотки «Патология» (TruLab P) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия).

Возможно использование других контрольных сывороток, аттестованных данным методом и не уступающих по своим свойствам рекомендуемому.

Калибровку рекомендуем проводить в следующих случаях: при непрохождении контроля качества (в случае выхода значений контроля качества за пределы установленных диапазонов для используемого лота контрольного материала), при использовании набора новой серии, при уточнении фактора пересчета.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для диагностики *in vitro*.
2. Слюна и кожа содержат α -амилазу, поэтому не пипетируйте реагенты ртом и избегайте контакта реагента с кожей. При работе с реагентами набора соблюдайте осторожность и не допускайте их

попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промойте пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании выпейте 0,5 л теплой воды и вызовите рвоту.

3. Предпринимать стандартные меры предосторожности при работе с лабораторными реактивами.

4. Не использовать реагенты и контроли после истечения срока годности.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом.

Реагенты 1 и 2 готовы к использованию.

Монореагентная схема – запуск реакции образцом.

Для приготовления рабочего реагента: смешать 4 объема Реагента 1 и один объем Реагента 2. Для стабилизации компонентов раствора рабочий реагент перед использованием следует выдержать 20–30 мин при комнатной температуре (15–25°C). Рабочий реагент можно хранить в защищенном от света месте при температуре 2–8°C в течение 6 месяцев или при комнатной температуре (15–25 °C) в течение 1 месяца, при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Следует тщательно закрывать флаконы с Реагентами 1 и 2 непосредственно после каждого использования, в том числе при хранении на борту автоматических биохимических анализаторов (в нерабочее время).

Лиофилизированный мультикалибратор TruCal U производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия) готовят согласно прилагаемой к каждому лоту инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Адаптации к автоматизированным системам запрашивайте дополнительно.

Перед проведением анализа рабочий реагент следует прогреть при температуре $37 \pm 1,0^\circ\text{C}$ в течение 5 мин.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблицах.

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом

| Отмерить, мкл* | Контрольная (холостая) проба | Калибровочная проба | Сыворотка или плазма |
|--|------------------------------|---------------------|----------------------|
| Вода дистиллированная | 30 | – | – |
| Мультикалибратор | – | 30 | – |
| Образец | – | – | 30 |
| Реагент 1 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Перемешать, инкубировать 1 мин, затем добавить: | | | |
| Реагент 2 | 250 | 250 | 250 |
| Перемешать. Через 2 мин измерить оптическую плотность (A_1) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A_2) через 1, 2 и 3 мин при длине волны 405 нм, при 37°C , относительно холостой пробы, в кюветках с длиной оптического пути 1 см. | | | |

Монореагентная схема – запуск реакции образцом

| Отмерить, мкл* | Контрольная (холостая) проба | Калибровочная проба | Сыворотка или плазма |
|--|------------------------------|---------------------|----------------------|
| Вода дистиллированная | 30 | – | – |
| Мультикалибратор | – | 30 | – |
| Образец | – | – | 30 |
| Рабочий реагент | 1000 | 1000 | 1000 |
| Пробу и рабочий реагент перемешать. Через 2 мин измерить оптическую плотность (A_1) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A_2) через 1, 2 и 3 мин при длине волны 405 нм, при 37°C , относительно холостой пробы, в кюветках с длиной оптического пути 1 см. | | | |

Вычислить среднее значение ΔA /мин образца/мультикалибратора



Примечание. Количество реагентов и анализируемых образцов может быть пропорционально изменено в зависимости от объема используемой кюветы и типа используемого биохимического анализатора (соотношение сыворотки крови/плазмы к рабочему реагенту составляет 1:33).

РАСЧЕТЫ

По мультикалибратору

$$\text{Активность } \alpha\text{-амилазы [Е/л]} = \frac{\Delta A / \text{мин}_{\text{оп}}}{\Delta A / \text{мин}_{\text{кал}}} \times$$

x Активность α -амилазы в мультикалибраторе [Е/л]

где: $\Delta A / \text{мин}_{\text{оп}}$ – изменение оптической плотности опытной пробы в минуту, ед.опт.пл.;
 $\Delta A / \text{мин}_{\text{кал}}$ – изменение оптической плотности калибровочной пробы в минуту, ед.опт.пл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Аскорбиновая кислота до 300 мкг/мл, билирубин до 684 мкмоль/л, липемия до 11,26 ммоль/л триглицеридов не влияют на точность анализа. Гемоглобин, даже при низких концентрациях, мешает определению. В составе набора содержатся вещества (АЛФ), устраняющие липемичность сыворотки.

ТРАНСПОРТИРОВКА, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

Замораживание компонентов набора не допускается.

Транспортирование должно производиться с использованием крытого грузового авто, авиа, ж/д транспорта, в соответствии с требованиями и правилами, принятыми на данном виде транспорта, при температуре 2-8°C. Допускается транспортирование наборов при температуре до 25°C не более 5 суток.

Срок годности набора – 18 месяцев.

Прекратить применение серии изделия по истечению срока ее годности.

При соблюдении условий хранения все компоненты набора стабильны в течение всего срока годности.

Реагенты 1 и 2 после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Рабочий реагент можно хранить в защищенном от света месте при температуре 2–8°C в течение 6 месяцев или при комнатной температуре (15–25°C) в течение 1 месяца, при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

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

ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор АЛЬФА-АМИЛАЗА ДиаВетТест не содержит взрывоопасных веществ, представляющих угрозу окружающей среде и здоровью медицинского персонала.

УТИЛИЗАЦИЯ И УНИЧТОЖЕНИЕ

Утилизацию после проведения исследования следует проводить в соответствии с местными правилами, принятыми для лабораторных отходов.

ИЗГОТОВИТЕЛЬ

АО «ДИАКОН-ДС», 142290, Московская область, г. Пущино, ул. Грузовая, д.1а.

Система менеджмента качества сертифицирована на соответствие требованиям: EN ISO 13485, ГОСТ ISO 13485



ПАМЯТКА ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ

α -амилаза – кальций-зависимый гидролитический фермент, расщепляющий сложные полисахариды, типа крахмала, в любом месте с образованием простых олигосахаридов, вплоть до мальтозы и глюкозы. У животных α -амилаза является основным пищеварительным ферментом. Большая часть амилазы синтезируется в поджелудочной железе, печени, тонком кишечнике, почках, слюнных железах. Набор реагентов (АЛЬФА-АМИЛАЗА ДиаВетТест) возможно использовать на различных моделях полуавтоматических и автоматических и биохимических анализаторах открытого типа. Не допускается использование набора по истечению срока годности, указанной на упаковке!

Показания к применению

Повышение уровня α -амилазы в сыворотке крови отмечается при панкреатитах, кистах поджелудочной железы, закупорке протока поджелудочной железы, раке поджелудочной железы, а также иногда при почечной недостаточности, отравлениях, сахарном диабете, первичном билиарном циррозе, непроходимости и заворотах ЖКТ, электролитных нарушениях. Понижение активности отмечается при позднем некрозе поджелудочной железы, тиреотоксикозе, отравлениях мышьяком, барбитуратами или после применения антикоагулянтов.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

| Кат. № | Состав набора, мл | Общий объем, мл |
|------------|------------------------------------|-----------------|
| DV 771 001 | Реагент 1: 2x68 Реагент 2: 2x17 | 170 |
| DV 771 002 | Реагент 1: 6x68 Реагент 2: 6x17 | 510 |

Забор образцов

1. Требования к квалификации персонала.

К выполнению исследований допускаются лица, прошедшие подготовку (лаборанты, ветеринарные фельдшера, ветеринарные врачи, химики и др.) по эксплуатации анализатора и методикам выполнения измерений.

2. Отбор проб.

2.1. Отбор крови проводят утром, до кормления животных и проведения лечебных мероприятий. «Правила взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования» утв. Минсельхоз СССР 24.06.1971.

2.2. Для отбора проб крови применяют стеклянные пробирки многообразного использования или системы взятия крови (СВК) по ГОСТ ISO 6710-2011.

2.2.1. Правила взятия крови при использовании вакуумных систем:

Обязательное соответствие цвета вакуумной системы и целей исследования.

Для биохимических исследований используются СВК с красной, желтой или оранжевой крышкой.

Каждая пробирка содержит определенное количество реагента для указанного на ней объема крови. Пробирки заполняются в соответствии с указанным уровнем, в пределах $\pm 10\%$ от указанного объема.

При применении СВК с красной/желтой/оранжевой маркировкой, которые содержат активаторы свертывания с биологически инертным гелем, образующие после центрифугирования барьер, отделяющий сыворотку от форменных элементов крови, что позволяет получать образцы более высокого качества и сократить время коагуляции (указывается производителем в инструкциях по применению СВК).

Внимание! Неправильное соотношение крови и реагента в пробе ведет к недостоверным результатам анализа.

Сразу после заполнения пробирку необходимо аккуратно перевернуть 4–10 раз на 180° для смешивания крови с наполнителем. Количество перемешиваний указывается в инструкции по применению. Перемешивание необходимо проводить аккуратно, пробирку не трясти, во избежание коагуляции и гемолиза.

Внимание! В плохо перемешанной пробе образуются микросгустки, приводящие к искажению результатов анализов, а также к поломкам лабораторных анализаторов.

3. Транспортировка.

Пробирки с кровью плотно закрываются пробками и в строго вертикальном положении в термоконтейнерах с хладагентом перемещаются в лабораторию. Время доставки не должно превышать 24 часа при температуре 2,0–8,0°C.

Следует избегать тряски во избежание развития гемолиза. Температура ниже 4°C и выше 30°C может существенно изменить содержание в образце многих анализов.

4. Подготовка проб:

4.1. Получение плазмы крови.

Отобранные пробы крови переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20–30 минут при 2000–3000 об/мин., отделившуюся плазму переносят в чистые сухие пробирки.

При применении СВК допускается центрифугирование непосредственно в первичной пробирке, в соответствии с инструкцией к использованию.

4.2. Получение сыворотки крови.

Сыворотка крови должна быть отделена от форменных элементов не позднее 1 часа после забора материала.

Кровь в стеклянных пробирках, в течение часа после забора, обводят тонкой спицей из нержавеющей стали диаметром 1,0–1,5 мм и ставят в термостат при температуре 37–38°C на 30 минут для окончательного отделения сыворотки. Отделившуюся сыворотку переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 20–30 минут при 2000–3000 об/мин.

Внимание! Исследования не проводятся при:

- гемолизе, хилезе сыворотки (плазмы) крови (за исключением исследований, на которые наличие гемолиза, хилеза не влияет [6]).
- поступлении в СВК с несоответствующей маркировкой (то есть материал взят не с тем антикоагулянтом, консервантом и др.).
- наличии сгустков в пробах с антикоагулянтом.
- поступлении в СВК с истекшим сроком годности.

5. Хранение.

Негемолизированная сыворотка или гепаринизированная или ЭДТА-плазма крови.

Стабильность:

| | |
|--------|-------------|
| 7 дней | при 15–25°C |
| 4 мес. | при 2–8°C |
| 1 год | при -20°C |

Загрязненные образцы хранению не подлежат!

Замораживать образцы можно не более одного раза!

6. Возможные причины получения недостоверных результатов:

- низкое качество дистиллированной (деионизированной) воды. Для повышения точности калибровки рекомендуется использовать высокоочищенную воду, как для приготовления контрольных сывороток, так и для самой калибровки (нулевая точка).
- недостаточно чистая посуда. Посуду следует мыть хромовой смесью или раствором 4М соляной кислоты в дистиллированной (деионизированной) воде, затем тщательно ополоснуть дистиллированной (деионизированной) водой.
- загрязнение блоков кювет. Рекомендуется регулярно проверять чистоту измерительных кювет с использованием соответствующих утилит анализатора и при необходимости проводить очистку согласно инструкции по эксплуатации на прибор.
- несоблюдение условий хранения и эксплуатации наборов, калибраторов и стандартных сывороток. Рекомендуется заменять реагенты, калибраторы, стандартные сыворотки.
- технические ошибки при программировании методов на автоматических анализаторах. Необходимо проверить соответствие параметров установленной методики с адаптациями производителя к конкретному анализатору.
- ошибки при проведении преаналитического этапа. Необходимо повторно произвести забор крови и выделение сыворотки (плазмы) с соблюдением установленных норм и правил.
- ошибки при приготовлении реагентной смеси, и нарушение соотношения реагент/образец (при работе на полуавтоматических биохимических анализаторах). Необходимо повторить смешивание.
- недостоверные результаты при проведении контроля качества. Необходимо провести калибровку прибора в соответствии с инструкцией по эксплуатации анализатора.



НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ*

| Образец | Нормальный диапазон, Е/л |
|----------------------------|--------------------------|
| Собаки | 510-1864 |
| Кошки | 365-948 |
| Лошади | 9,0-34,0 |
| Крупный рогатый скот (КРС) | 12,0-107 |
| Свиньи | 43,5-88,0 |
| Овцы | 0-2,04 |
| Куры | 111-401 |

*Рекомендуем в каждой лаборатории уточнять диапазон значений нормальных величин для обследуемых животных, которые могут зависеть от различных факторов

Возможные причины изменения уровня α -амилазы:

Повышение уровня α -амилазы:

- Острый панкреатит;
- Острый гепатит;
- Хронические заболевания почек;
- Тяжелые воспалительные заболевания кишечника;
- Гепатобилиарные заболевания;
- Перитонит;
- Отравления.

Понижение уровня α -амилазы:

- Некроз поджелудочной железы;
- Отравление тетрахлорметаном или мышьяком;
- Острые и токсические диспепсии.

ВНИМАНИЕ! Лабораторное исследование только этого параметра не является достаточным основанием для постановки диагноза, но может быть частью комплексного клинико-терапевтического обследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boyd J.W. The interpretation of serum biochemistry test results in domestic animals, in Veterinary Clinical Pathology, Veterinary Practice Publishing Co., Vol. XIII, # II, 1984.
2. Кондрахин И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. – М.: 2004.
3. Медведева М. А. Клиническая ветеринарная лабораторная диагностика. – М.: «Аквариум Принт», 2013–416 с.
4. Холод В.М. Справочник по ветеринарной биохимии. – В.: 2005.
5. Guder W.G., Zawta B. et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001.
6. Д. Мейер, Дж. Харви. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика. Пер. с англ. – М.: Софион. 2007, 456 с.
7. Методические рекомендации по применению наборов реагентов «ДиаВетТест» для биохимических исследований сыворотки (плазмы) крови животных на автоматических и полуавтоматических анализаторах. – М.: ФГБУ ЦНМВЛ, Россельхознадзор, 2018.
8. I.S.I.S., Standard International Units - March 2002.

За дополнительной информацией или при рекламациях следует обращаться в **ООО «ДИАВЕТ»:**

142290, г. Пущино, Московской обл.

<https://diakonvet.ru/>

info@diakonvet.ru

Рекомендовано Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией

