

Набор биохимических реагентов для ветеринарии

КРЕАТИНКИНАЗА ДиаВетТест



ООО «ДИАВЕТ»

142290, г. Пущино, Московской обл.

<https://diakonvet.ru/>

info@diakonvet.ru

НАЗНАЧЕНИЕ

КРЕАТИНКИНАЗА ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для определения общей активности креатинкиназы кинетическим методом в сыворотке крови животных и птиц.

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

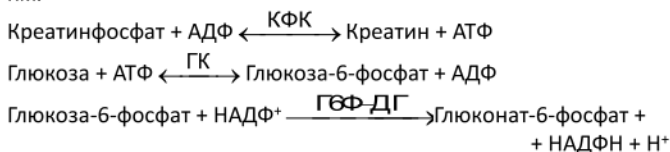
Количество определений зависит от объема фасовки реагентов и типа используемого биохимического анализатора.

МЕТОД

Оптимизированный УФ тест в соответствии с рекомендациями DGKS (Германское Общество Клинической Химии) и IFCC (Международная Федерация Клинической Химии и Лабораторной Медицины).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Креатинкиназа катализирует реакцию образования АТФ в присутствии креатинфосфата и АДФ. Гексокиназа при наличии АТФ катализирует реакцию фосфорилирования глюкозы с образованием глюкозо-6-фосфата. При наличии глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы реакция дегидрирования глюкозо-6-фосфата сопровождается образованием НАДФН. Скорость синтеза НАДФН, сопровождающаяся повышением оптической плотности образца, прямо пропорциональна активности креатинкиназы и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.



СОСТАВ НАБОРА

Реагент	Состав	Концентрация
Реагент 1	Буферно-ферментный раствор, pH 6,0, содержащий имидазол	60 ммоль/л
	глюкозу	≥20 ммоль/л
	НАДФ	≥2,0 ммоль/л
	гексокиназу	≥4,0 кЕ/л
	азид натрия	0,095%
Реагент 2	Субстратно-ферментный раствор, содержащий имидазол	160 ммоль/л
	креатинфосфат	≥120 ммоль/л
	АДФ	≥8,0 ммоль/л
	АМФ	≥20 ммоль/л
	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу	≥10 кЕ/л
	азид натрия	0,095%

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Параметр	Значение
Линейность	20–1500 Е/л
Отклонение от линейности	не более 5%
Чувствительность	не более 15 Е/л
Коэффициент вариации	не более 5%

Примечание. Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. При активности креатинкиназы в образце более 1500 Е/л (изменение оптической плотности пробы в минуту ΔА/мин не должно превышать 0,3) анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором (0,9% NaCl) в 10 раз, повторить анализ и полученный результат умножить на 10.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов рекомендуем проводить измерения контрольной сыворотки «Норма» (TruLab N), 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.

Для калибровки автоматических фотометрических систем и уточнения фактора пересчета для полуавтоматических биохимических анализаторов рекомендуем использовать мультикалибратор TruCal U производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия). Значение креатинкиназы в TruCal U прослеживается до коэффициента молярной экстинкции в соответствии с оригинальной процедурой IFCC.

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 нового набора.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для диагностики *in vitro*.
2. В реагенте 1 и реагенте 2 содержится токсичный компонент – азид натрия. При работе с ними соблюдайте осторожность и не допускайте 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. При необходимости обратитесь к врачу.
3. Предпринимать стандартные при работе с лабораторными реактивами меры предосторожности.
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 выдерживать 20–30 мин при комнатной температуре (15–25°C). Рабочий реагент можно хранить в темном месте при температуре 2–8°C в течение 3 недель и при комнатной температуре (15–25°C) не более 2 суток при условии достаточной герметичности флакона 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) готовить согласно прилагаемой к каждому лоту инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Адаптации к автоматизированным системам запрашивайте дополнительно.

Перед проведением анализа рабочий реагент следует прогреть при температуре 37±1,0°C в течение 10 минут.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблицах.

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом.

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Дистиллированная вода	50	–	–
Мультикалибратор	–	50	–
Образец	–	–	50

Реагент 1	1000	1000	1000
Перемешать, инкубировать 3 минуты, затем добавить:			
Реагент 2	250	250	250
Перемешать. Через 2 минуты измерить оптическую плотность (A_1) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A_2) через 1, 2 и 3 минуты при длине волны 340 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	Опытная проба
Дистиллированная вода	40	–	–
Мультикалибратор	–	40	–
Образец	–	–	40
Рабочий реагент	1000	1000	1000
Пробу и рабочий реагент перемешать. Через 3 минуты измерить оптическую плотность (A_1) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A_2) через 1, 2 и 3 минуты при длине волны 340 нм, при 37°C, относительно холостой пробы, в кюветках с длиной оптического пути 1 см.			

Вычислить среднее значение $\Delta A/\text{мин}$ образца/мультикалибратора

Примечание: Количество реагентов и анализируемых образцов может быть пропорционально изменено в зависимости от объема используемой кюветы и типа используемого биохимического анализатора (соотношение образца к **рабочему реагенту** составляет 1:25).

РАСЧЕТЫ

По мультикалибратору:

Активность КФК [Е/л] = $\frac{\Delta A / \text{мин}_{\text{оп}}}{\Delta A / \text{мин}_{\text{кал}}} \times$
 \times Активность КФК 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 30 мг/дл, билирубин до 40 мг/дл, гемоглобин до 200 мг/дл и липемия до 2000 мг/дл триглицеридов не влияют на точность анализа. Дополнительных веществ (АЛФ), устраняющих липемичность сыворотки, не требуется.

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.

Изделия, транспортированные и хранившиеся с нарушением температурного режима, применению не подлежат.

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 при температуре 2-8°C не более 3 недель и при комнатной температуре (15-25°C) не более 2 суток при условии хранения в темноте, достаточной герметичности флакона и отсутствии загрязнения.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение инструкции по применению



ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор КРЕАТИНКИНАЗА 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

Креатинкиназа (креатинфосфокиназа) — это фермент, катализирующий образование из АТФ и креатина высокоэнергетического соединения креатинфосфата, который расходуется организмом при увеличенных физических нагрузках. Содержится в клетках сердечной мышцы, скелетной мускулатуры, головного мозга, щитовидной железы, легких. Наибольшее клиническое значение имеют фракции креатинкиназы КК-МВ (сердечный изофермент), КК-ВВ (мозговой изофермент) и КК-ММ (мышечный изофермент).

Набор реагентов (КРЕАТИНКИНАЗА 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

Наиболее часто значительное увеличение активности креатинкиназы в крови отмечается при остром инфаркте миокарда (через 2–4 часа после приступа). Повышение активности креатинкиназы нередко наблюдается также при острых миокардитах, при травматических повреждениях и заболеваниях скелетных мышц (например, при прогрессирующей мышечной дистрофии, миопатии, дерматомиозите), а также при некоторых заболеваниях головного мозга, после хирургических операций, при любых видах шока, гипотиреозе. Снижение уровня креатинкиназы часто выявляется при тиреотоксикозе (повышенный выброс гормонов щитовидной железы).

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Состав набора, мл	Общий объем, мл
DV 782 001	Реагент 1: 2x68 Реагент 2: 2x17	170
DV 782 002	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 многократного 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 крышечкой.

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 (оптимально - в течение первых 30 минут) после забора материала, так как содержащее эритроцитов ингибирует активность фермента. Если исследование не может быть произведено немедленно, сыворотку необходимо заморозить.

Кровь в стеклянных пробирках, 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 крови.

Стабильность:

2 дня	при 15–25°C
7 дней	при 2–8°C
4 недели (в темноте)	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 4M 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 реagentной смеси, и нарушение соотношения реagent/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, Ед/л
Собаки	40,0-254
Кошки	59,0-527
Лошади	113-333
Крупный рогатый скот (КРС)	12,0-107
Свиньи	43,5-88,0
Овцы	47,0-4212
Куры	49,0-9609

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

Возможные причины изменения уровня креатинкиназы:

Повышение уровня креатинкиназы:

- Повреждение скелетных мышц (травмы, мышечные дистрофии, полимиозиты и др.);
- Инфаркт миокарда, миокардит;
- Гипотиреоз;
- Гиперкортицизм;
- Злокачественные опухоли.

Понижение уровня креатинкиназы диагностического значения не имеет.

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 реagentов «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

