

Набор биохимических реагентов для ветеринарии

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА ДиаВетТест



НАЗНАЧЕНИЕ

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для определения общей активности лактатдегидрогеназы 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 DGKC (Германского Общества Клинической Химии).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Лактатдегидрогеназа катализирует реакцию образования лактата из пирувата с одновременным окислением НАДН. Количество образовавшегося НАД можно измерить фотометрически при длине волны 340 нм. Снижение оптической плотности в процессе реакции прямо пропорционально активности лактатдегидрогеназы.

ЛДГ

Пируват + НАДН + H⁺ ↔ Лактат + НАД⁺

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1	Буферно-субстратный раствор, pH 7,5, содержащий пируват натрия ≥0,6 ммоль/л азид натрия 0,095%
Реагент 2	Буферный раствор, pH 9,6, содержащий НАДН ≥1,0 ммоль/л азид натрия 0,095%

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Параметр	Значение
Линейность	40–1200 Е/л
Отклонение от линейности	не более 5%
Чувствительность	не более 40 Е/л
Коэффициент вариации	не более 4%

Примечание. Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. При активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови более 1200 Е/л (изменение оптической плотности пробы в минуту ΔЕ/мин не должно превышать 0,15) анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором (0,9% NaCl) в 5 раз, повторить анализ и полученный результат умножить на 5.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов рекомендуем проводить измерения контрольной сыворотки «Норма» (TruLab N) (метод DGKC) и контрольной сыворотки «Патология» (TruLab P) (метод DGKC) 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 (метод DGKC) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия). Концентрация ЛДГ в TruCal U прослеживается до коэффициента молярной экстинкции в соответствии с оригинальной процедурой DGKC.

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 реагентах 1 и 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.

Все компоненты набора, в используемых концентрациях для *in vitro* диагностики, являются нетоксичными.

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

4. Не использовать реагенты, калибраторы 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 хранить при температуре 2–8°C в течение 2 недель или при комнатной температуре (15–25°C) в течение 2 суток, при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения, в защищенном от света месте.

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.

При наличии системы идентификации набора реагентов активировать анализатор с помощью Идентификационной метки способом, предусмотренным производителем анализатора.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Адаптации к автоматизированным системам запрашивайте дополнительно.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблицах.

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Мультикалибратор	–	10	–
Образец	–	–	10
Реагент 1	–	1000	1000
Перемешать, инкубировать примерно 1-5 мин при 37°C, затем добавить:			
Реагент 2	–	250	250
Перемешать. Через 1 мин измерить оптическую плотность (A ₁) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A ₂) через 1, 2 и 3 мин при длине волны 340 нм, при 37°C, относительно холостой пробы в кюветах с длиной оптического пути 1 см.			

Монореагентная схема – запуск реакции образцом

Перед проведением анализа рабочий реагент следует прогреть при температуре 37±1,0°C в течение 5 мин.



Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Мультикалибратор	–	10	–
Образец	–	–	10
Рабочий реагент	–	1000	1000

Пробы тщательно перемешать. Через 1 мин измерить оптическую плотность (A₁) и включить секундомер. Измерить оптическую плотность (A₂) через 1, 2 и 3 мин при длине волны 340 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 образца к рабочему реагенту составляет 1:100).

РАСЧЕТЫ

По мультикалибратору:

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

× Активность ЛДГ в мультикалибраторе [Е/л],

где: ΔA/мин_{оп} – изменение оптической плотности в минуту опытной пробы, ед.опт.пл.;

ΔA/мин_{кал} – изменение оптической плотности в минуту калибровочной пробы, ед.опт.пл.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Аскорбиновая кислота до 300 мкг/мл (30 мг/дл), билирубин до 684 мкмоль/л (40 мг/дл) и липемия до 22,52 ммоль/л (2000 мг/дл) триглицеридов не влияют на точность анализа. Гемолиз влияет сильно, так как уровень ЛДГ в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке. 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 в течение 2 недель или при комнатной температуре (15-25°C) в течение 2 суток, при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения, в защищенном от света месте.

Для получения надежных результатов необходимо строго соблюдать инструкции по применению набора.

ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА ДиаВетТест не содержит взрывоопасных веществ, представляющих угрозу окружающей среде и здоровью медицинского персонала, при соблюдении всех мер безопасности и утилизации набора, рекомендованных производителем.

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

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) — внутриклеточный фермент углеводного обмена, катализирует реакцию взаимопревращения пировиноградной и молочной кислот, т.е. реакцию, завершающую внутренний окислительно-восстановительный цикл гликолиза. Относится к ферментам класса оксидоредуктаз, действующих на группу СН-ОН субстрата, акцептором электронов для которых служат NAD или NADP. Больше всего ЛДГ в сердечной и скелетных мышцах, эритроцитах, почечной и печеночной тканях.

Набор реагентов (ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА 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

Активность ЛДГ в сыворотке крови возрастает в 10—15 раз в первые двое суток после возникновения инфаркта миокарда и возвращается к норме лишь на 10—12-й день. Ценность определения активности ЛДГ в сыворотке крови особенно велика в случаях инфаркта миокарда с нетипичной клинической и электрокардиографической картиной.

При паренхиматозном гепатите активность ЛДГ в сыворотке крови повышается в первые дни желтушного периода. Активность ЛДГ в сыворотке крови возрастает также при прогрессирующей мышечной дистрофии, лимфогранулематозе, лейкозах, пернициозной анемии.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Состав набора, мл	Общий объем, мл
DV 783 001	Реагент 1: 2x68 Реагент 2: 2x17	170
DV 783 002	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 сокращать 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]). Гемолиз должен быть полностью исключен, так как уровень ЛДГ в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке!
- 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.

Негемолизованная сыворотка крови.

Стабильность:

4 дня	при 15–25°C
6 недель	при 2–8°C

Образцы не замораживать!

Хранить в темноте!

Загрязненные образцы хранению не подлежат!

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 заменить 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.

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА ДиаВетТест



- 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, Ед/л
Собаки	25,1-219,9
Кошки	35,1-224,9
Лошади	102,3-340,6
Крупный рогатый скот (КРС)	308,6-938,1
Свиньи	159,6-424,7
Овцы	145,0-2050
Куры	953-2272

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

Возможные причины изменения уровня ЛДГ:

Повышение уровня ЛДГ:

- Повреждение скелетных мышц (травмы, мышечные дистрофии, полимиозиты и др.);
- Инфаркт миокарда;
- Некротическое поражение почек и печени;
- Острый панкреатит;
- Онкологические заболевания;
- Гемолитические анемии;
- Лептоспироз;
- Инфекционный перитонит.

Понижение уровня ЛДГ 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 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

