

Набор биохимических реагентов для ветеринарии

БИЛИРУБИН ОБЩИЙ ДиаВетТест



НАЗНАЧЕНИЕ

БИЛИРУБИН ОБЩИЙ ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для количественного определения содержания общего билирубина дихлоранилиновым 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

Фотометрический тест с 2,4-дихлоранилином (ДСА/ДХА).

ПРИНЦИП МЕТОДА

В кислой среде, в присутствии диазотированного 2,4-дихлоранилина, билирубин образует азосоединение красного цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна содержанию билирубина в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 546 (540–560) нм.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1	Буферный раствор, pH 0,8, содержащий калий фосфорнокислый	50 ммоль/л
	однозамещенный хлорид натрия	154 ммоль/л
Реагент 2	Раствор, содержащий 2,4-дихлоранилин	5 ммоль/л
	нитрит натрия	5 ммоль/л
	соляную кислоту	130 ммоль/л

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Параметр	Значение
Линейность	1,7–510 мкмоль/л
Отклонение от линейности	не более 5%
Чувствительность	не более 1,2 мкмоль/л
Коэффициент вариации	не более 5%

Примечание. Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. Если значение превосходит верхнюю границу диапазона, образец должен быть разведен 1 + 1 изотоническим раствором NaCl (9,0 г/л) и полученный результат должен быть умножен на 2.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для калибровки автоматизированных фотометрических систем рекомендуется мультикалибратор TruCal U, фирмы DiaSys, Германия.

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов необходимо проводить измерения контрольных сывороток TruLab N и P, DiaSys, Германия.

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

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Только для диагностики *in vitro*.
2. **ВНИМАНИЕ!** Реагент 2 содержит соляную кислоту. При работе с ним следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые; при попадании немедленно промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.
3. Предпринимать стандартные при работе с лабораторными реактивами меры предосторожности.
4. Не использовать реагенты и контроли после истечения срока годности.

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Запуск реакции субстратом.

Реагенты 1 и 2 готовы к использованию.

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.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблицах.

Отмерить, мкл*	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Образец	-	-	25
Мультикалибратор	-	25	-
Деионизованная вода	25	-	-
Реагент 1	1000	1000	1000
Перемешать, инкубировать 5 мин при 37°C или 10 мин при 15–25°C, измерить оптическую плотность A1 при длине волны 546 (540–560), затем добавить:			
Реагент 2	250	250	250
Перемешать, инкубировать 5 мин при 37°C или 10 мин при 15–25°C. Измерить оптическую плотность A2 при длине волны 546 (540–560) нм.			

*Количество реагентов и анализируемых образцов может быть пропорционально изменено в зависимости от объема используемой кюветы и типа используемого биохимического анализатора.

$\Delta A = (A2 - A1)$ образца или мультикалибратора - $(A2 - A1)$ холостой пробы

РАСЧЕТЫ

По мультикалибратору

$$\text{Билирубин [мкмоль/л]} = \frac{\Delta A_{\text{образца}}}{\Delta A_{\text{мультикалибратора}}} \times$$

x Концентрация мультикалибратора [мкмоль/л].

Фактор пересчета

Билирубин [мкмоль/л] / 17,1 = Билирубин [мг/дл].

ТРАНСПОРТИРОВКА, УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Транспортирование и хранение наборов должно производиться при температуре 2–8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности. Допускается транспортирование и хранение наборов при температуре до 25°C не более 5 суток.

Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора – 18 месяцев.

Прекратить применение серии изделия по истечению срока ее годности.

Реагенты стабильны до конца месяца, указанного в сроке годности, при хранении при температуре 2–8°C, в защищенном от света месте.

Не допускать загрязнения. Не замораживать реагенты!

Реагент 2 хранить в темноте.

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

ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор БИЛИРУБИН ОБЩИЙ ДиаВетТест не содержит взрывоопасных веществ, представляющих угрозу окружающей среде и здоровью медицинского персонала.



In vitro solutions



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

Билирубин - пигмент желто-коричневого цвета, один из главных компонентов желчи. Образуется в результате распада гема при расщеплении гемсодержащих белков: гемоглобина, миоглобина и цитохрома. Ежедневно в норме образуется около 250–350 мг билирубина, из которых 85% получается из разрушенных эритроцитов. Почти весь билирубин захватывается альбумином крови, транспортируется в печень, где соединяется с глюкуроновой кислотой и выводится через желчные протоки. В крови билирубин содержится в виде двух фракций: свободной (непрямой) и связанной (прямой). Общий билирубин — это сумма содержащихся в сыворотке крови непрямой и прямого билирубина. Определение количества общего билирубина используется для оценки функции печени, а также интенсивности гемолитических процессов в организме.

Набор реагентов (БИЛИРУБИН ОБЩИЙ 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

Гипербилирубинемия может быть результатом повышенного гемолиза эритроцитов (гемолитическая анемия), пониженной способности к метаболизму и транспорту против градиента в желчь билирубина гепатоцитами (заболевания печени, внутрипеченочный холестаз), а также следствием механических затруднений желчевыделения.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Состав набора, мл	Общий объем, мл
DV 775 001	Реагент 1: 2x68 Реагент 2: 2x17	170
DV 775 002	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 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 анализаторов.

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.

Сыворотка и гепаринизированная плазма крови.

Очень важно избежать попадания света на образцы.

Стабильность:

1 день	при 15–25°C
7 дней	при 2–8°C
6 месяцев	при -20°C (при условии немедленного замораживания)

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 реагентной смеси, и нарушение соотношения реагент/образец (при работе на полуавтомате).



тических биохимических анализаторах). *Необходимо повторить смешивание.*

- *недостовверные результаты при проведении контроля качества. Необходимо провести калибровку прибора в соответствии с инструкцией по эксплуатации анализатора.*

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ*

Образец	Нормальный диапазон, мкмоль/л
Собаки	3,0-13,5
Кошки	3,0-12,0
Лошади	5,4-51,1
Крупный рогатый скот (КРС)	1,8-10,0
Свиньи	1,7-3,4
Овцы	1,7-6,84
Куры	2,0-27,0

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

Возможные причины изменения уровня общего билирубина:

Повышение уровня общего билирубина:

- Гипербилирубинемии гемолитические;
- Гипербилирубинемии печёночные паренхиматозные: острые и хронические диффузные заболевания печени, первичный и метастатический рак печени, вторичные дистрофические поражения печени при различных заболеваниях внутренних органов и правожелудочковой сердечной недостаточности, холестатический гепатит, первичный билиарный цирроз печени;
- Гипербилирубинемии печёночные холестатические: желчнокаменная болезнь, новообразования поджелудочной железы, гельминтозы;
- Токсическое повреждение печени.

Понижение уровня общего билирубина:

- Заболевания костного мозга;
- Анемия;
- Гипоплазия;
- Фиброз.

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

Рекомендовано Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией

