

Набор биохимических реагентов для ветеринарии

КАЛЬЦИЙ ДиаВетТест



НАЗНАЧЕНИЕ

КАЛЬЦИЙ ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для количественного определения содержания кальция о-крезолфталеиновым методом в сыворотке крови и моче 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 метод с о-крезолфталеином (ОКФ).

ПРИНЦИП МЕТОДА

Ионы кальция в щелочной среде взаимодействуют с о-крезолфталеиновым комплексом с образованием окрашенного соединения, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации кальция в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 570 (550–590) нм. Наличие 8-оксихинолина в реакционной смеси исключает влияние ионов магния на интенсивность окраски.

Калибровка проводится по водному стандарту. Тип реакции – конечная точка.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1	Буферный раствор, pH 10,7, содержащий этаноламин 1,0 моль/л
Реагент 2	Раствор, содержащий о-крезолфталеиновый комплексон 0,3 ммоль/л 8-оксихинолин 35 ммоль/л
Калибратор	Калибровочный раствор хлористого кальция в растворе NaN ₃ 2,5 ммоль/л 0,095%

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Параметр	Значение
Линейность	0,5–5,0 ммоль/л
Отклонение от линейности	не более 3%
Чувствительность	не более 0,25 ммоль/л
Коэффициент вариации	не более 3%

Примечание. Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. При содержании кальция в сыворотке крови или моче выше 5,0 ммоль/л анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором, повторить анализ и полученный результат умножить на разведение.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для калибровки фотометрических систем и уточнения фактора пересчета для полуавтоматических биохимических анализаторов рекомендуем использовать мультикалибратор TruCal U, DiaSys, Германия.

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов проводите измерения контрольных сывороток TruLab N и P (ОКФ), DiaSys, Германия; контрольной мочи TruLab Urine Level 1 и 2, DiaSys, Германия. Возможно использование других контрольных сывороток, аттестованных феррозиновым методом и не уступающих по своим свойствам рекомендуемому.

Калибровку рекомендуется проводить в следующих случаях: при нестабильности результатов 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. Реагенты 1 и 2 едкие. Не допускать их попадания в глаза и на кожу, так как они вызывают раздражения. В случае попадания в глаза, немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу.

В Калибраторе содержится токсичный компонент – азид натрия. 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 реагентами меры предосторожности.

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

ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Реагенты 1, 2 и Калибратор готовы к использованию.

Для приготовления Рабочего реагента: смешать 4 объема Реагента 1 и один объем Реагента 2. Тщательно закрыть флаконы с Реагентами 1 и 2 после отбора аликвот. Оставить свежеприготовленный рабочий реагент на 20–30 мин при комнатной температуре (15–25°C) для уравнивания компонентов смеси.

Тщательно закрывать флаконы с Реагентами 1 и 2 сразу после каждого использования.

Рабочий реагент можно хранить при температуре 2–25°C не более 3 дней.

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.

Монореагентная схема — запуск реакции образцом.

Таблица 1.

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка крови или моча	10	–	–
Вода дистиллированная	–	–	10
Калибратор	–	10	–
Рабочий реагент	1000	1000	1000

Пробы тщательно перемешать и выдержать 5 мин при температуре 37°C или 10 мин при комнатной температуре (15–25°C). Измерить оптическую плотность (A) опытной пробы и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 570 (550–590) нм.

Окраска растворов стабильна в течение 30 минут.

$$\Delta A = A_{оп/кал} - A_{контр}$$

Биреагентная схема — запуск реакции субстратом (в случае интенсивно окрашенных образцов или образцов с высоким содержанием липидов).



Таблица 2.

Отмерить, мкл	Опытная проба	Калибровочная проба	Контрольная (холостая) проба
Сыворотка крови или моча	10	–	–
Вода дистиллированная	–	–	10
Калибратор	–	10	–
Реагент 1	1000	1000	1000
Тщательно перемешать и выдержать 5 мин при температуре 37°C или 10 мин при комнатной температуре (15–25°C). Затем измерить оптическую плотность (A1) опытной пробы и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 570 (550–590) нм. Добавить:			
Реагент 2	250	250	250
Пробы тщательно перемешать и выдержать 5 мин при температуре 37°C или 10 мин при комнатной температуре (15–25°C). Измерить оптическую плотность (A2) опытной пробы и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 570 (550–590) нм. Окраска растворов стабильна в течение 30 минут.			

$$\Delta A = (A_2 - A_1) \text{ оп/ккл}$$

Примечание. При использовании автоматических или полуавтоматических биохимических анализаторов количество реагентов и анализируемых образцов в зависимости от объема используемой кюветы может быть пропорционально изменено (соотношение сыворотки крови или мочи к рабочему реагенту составляет 1:100).

РАСЧЕТЫ

Содержание кальция в сыворотке крови (в ммоль/л) определить по формуле:

$$C = \frac{A_{оп.}}{A_{ккл.}} \times 2,5$$

- где: C - концентрация кальция в опытной пробе, ммоль/л;
 A_{оп.} - оптическая плотность опытной пробы, ед. оп. плотн.;
 A_{ккл.} - оптическая плотность калибровочной пробы, ед. оп. плотн.;
 2,5 - содержание кальция в калибраторе, ммоль/л.

Содержание кальция в моче (в ммоль/сутки) определить по формуле:

$$C = \frac{A_{оп.} \times V}{A_{ккл.}} \times 2,5$$

- где: C - концентрация кальция в опытной пробе, ммоль/сутки;
 A_{оп.} - оптическая плотность опытной пробы, ед. оп. плотн.;
 A_{ккл.} - оптическая плотность калибровочной пробы, ед. оп. плотн.;
 V - количество мочи, собранной за сутки, л;
 2,5 - содержание кальция в калибраторе, ммоль/л.

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 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 1 и 2 после вскрытия флаконов могут храниться при температуре 2–8°C в течение всего срока годности набора при условии достаточной герметичности флаконов. Не оставлять открытым на воздухе, так как pH может уменьшиться вследствие поглощения углекислого газа из воздуха.

Рабочий реагент можно хранить при температуре 2–25°C не более 3 дней.

Калибратор после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2–8°C не более 3 месяцев при условии достаточной герметичности флакона.

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

Для работы с набором рекомендуется использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками и пластиковую посуду одноразового применения. Недостаточно чистая посуда может явиться источником грубых ошибок при проведении анализа, в связи с чем, необходимо тщательно мыть посуду и ополаскивать ее деионизованной водой.

ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор КАЛЬЦИЙ ДиаВетТест не является источником опасных излучений и выделений в окружающую среду, не содержит токсичных и 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

Кальций (Ca от лат. Calcium) — элемент второй группы периодической таблицы элементов, с атомным номером 20. В организме позвоночных большая его часть находится в скелете и зубах в виде гидроксиапатита. В организме животных кальций выполняет следующие функции: создает основу и обеспечивает прочность костей и зубов; участвует в процессах нейромышечной возбудимости (как антагонист ионов калия) и сокращения мышц; регулирует проницаемость клеточных мембран и ферментативную активность; участвует в процессе свертывания крови (активирует VII, IX и X факторы свертывания). Кальций также участвует в регуляции кислотно-щелочного состояния и осмотического давления.

Набор реагентов (КАЛЬЦИЙ 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

Нарушение минерального обмена сопровождается сдвигами кислотно-щелочного равновесия и изменениями в обмене белков, углеводов и жиров, что влечет за собой нарушение функций внутренних органов, их перерождение и развитие различных заболеваний. В случае недостатка кальция в организме, у животных может развиваться ряд заболеваний, в том числе рахит, остеомалация, при которых нарушена минерализация костной ткани. Конечности искривляются, животные хромают, движения их скованны, кости размягчаются и легко ломаются. Особенно чувствительны к дефициту кальция высокопродуктивные животные, крупный рогатый скот. У сельскохозяйственной птицы при кальциевой недостаточности скорлупа яиц становится тонкой, увеличивается насечка яиц. Снижается интенсивность роста молодняка и продуктивность взрослой птицы.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Состав набора, мл	Общий объем, мл
DV 780 003	Реагент 1: 2x68 Реагент 2: 2x17 Калибратор: 1x3,0	170
DV 780 004	Реагент 1: 6x68 Реагент 2: 6x17 Калибратор: 2x3,0	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 термомониторных хладагентах 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 аналитов.

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.

4.3. Подготовка проб мочи (суточной).

К суточной моче следует добавить 10 мл концентрированной соляной кислоты и подогреть для растворения оксалата кальция.

5. Хранение.

Негемоллизированная сыворотка крови и плазма.

Стабильность:

7 дней	при 15–25°C
3 недели	при 2–8°C
8 месяцев	при –20°C

Моча.

Стабильность:

2 дня	при 15–25°C
4 дня	при 2–8°C
3 недели	при –20°C

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 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.*

- ошибки при приготовлении реагентной смеси, и нарушения 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.*

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



НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ*

Образец	Нормальный диапазон, ммоль/л	
	сыворотка	моча
Собаки	2,2-3,3	0,2-2,5
Кошки	2,0-2,7	0,2-2,5
Лошади	2,5-3,5	0,5-2,5
Крупный рогатый скот (КРС)	2,5-3,3	0,3-2,3
Свиньи	2,5-3,5	0,3-2,4
Овцы	2,6-3,25	
Куры	3,75-6,75	

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

Возможные причины изменения уровня кальция:

Повышение уровня кальция:

- Первичный гиперпаратиреоз (гиперплазия, аденома или карцинома паращитовидных желез);
- Злокачественные опухоли;
- Гемобластозы (миеломная болезнь, лимфомы, лейкозы - при распаде костной ткани в очагах гиперплазии);
- Саркоидоз и другие гранулематозные заболевания;
- Тиреотоксикоз;
- Иммобилизационная гиперкальциемия;
- Гипервитаминоз D;
- Недостаточность надпочечников;
- Ятрогенная гиперкальциемия;
- Молочно-щелочной синдром;
- Заболевания почек (третичный гиперпаратиреоз);
- Передозировка тиазидных диуретиков.

Понижение уровня кальция:

- Гипопаратиреоз; гипомагниемия; псевдогипопаратиреоз;
- Гиповитаминоз D при рахите у молодняка и остеомаляции;
- Гипоальбуминемия при нефротическом синдроме и патологии печени;
- Острый панкреатит с панкреонекрозом;
- Хроническая почечная недостаточность;
- Печеночная недостаточность;
- Прием противоопухолевых средств, противосудорожных препаратов, ЭДТА, неомицина, секвестрация ионов кальция (острый алкалоз, повышение фосфатов, переливание большого количества цитратной крови).

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. Gunder W.G., Zawta B. et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001.