

Набор биохимических реагентов для ветеринарии

ФОСФОР ДиаВетТест



НАЗНАЧЕНИЕ

ФОСФОР ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для количественного определения содержания неорганического фосфора 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 УФ тест с молибдатом аммония.

ПРИНЦИП МЕТОДА

Неорганический фосфор в кислой среде взаимодействует с молибдатом аммония с образованием фосфомолибдатного комплекса, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации фосфора в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 340 нм.

СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1	Раствор, содержащий серную кислоту	≥220 ммоль/л
Реагент 2	Раствор, содержащий молибдат аммония	≥1,5 ммоль/л
Калибратор	Калибровочный раствор неорганического фосфора Азид натрия	1,61 ммоль/л 0,095%

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Параметр	Значение
Линейность	0,25–7,0 ммоль/л
Отклонение от линейности	не более 3%
Чувствительность	не более 0,2 ммоль/л
Коэффициент вариации	не более 3%

Примечание. Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. При содержании неорганического фосфора в образце выше 7,0 ммоль/л анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором (0,9% NaCl) и полученный результат умножить на разведение.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для калибровки фотометрических систем рекомендуем использовать калибратор из набора или мультикалибратор TruCal U производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия).

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов проводите измерения контрольной сыворотки «Норма» (TruLab N) (Молибдат UV), контрольной сыворотки «Патология» (TruLab P) (Молибдат UV) и контрольной мочи TruLab Urine (Уровень 1 и Уровень 2) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия).

Возможно использование других контрольных материалов, аттестованных данным 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. Реагент 1 содержит серную кислоту, Реагент 2 содержит молибдат аммония, в Калибраторе содержится токсичный компонент азид натрия. При работе с ними 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

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом.

Реагент 1, реагент 2 и калибратор готовы к использованию.

Монореагентная схема – запуск реакции образцом.

Приготовление Рабочего реагента: смешать 4 части Реагента 1 с одной частью Реагента 2 (например, 20 мл Реагента 1 + 5,0 мл Реагента 2). Для стабилизации компонентов раствора рабочий реагент перед использованием следует выдержать 20–30 мин при комнатной температуре.

Рабочий реагент можно хранить в темном месте при температуре 2–25°C в течение четырех месяцев.

Калибратор готов к использованию.

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.

Компоненты реакционной смеси отбирать в количествах, указанных в таблицах.

Биреагентная схема – запуск реакции субстратом.

Отмерить, мкл*	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Вода деионизованная	10	–	–
Калибратор/ мультикалибратор	–	10	–
Образец	–	–	10
Реагент 1	1000	1000	1000

Пробы перемешать, через 1 минуту измерить оптическую плотность A1 опытной и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре 37°C или при комнатной температуре (15–25°C). Затем добавить:

Реагент 2	250	250	250
-----------	-----	-----	-----

Пробы перемешать, через 5 минут измерить оптическую плотность A2 опытной и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы при длине волны 340 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм при температуре 37°C или при комнатной температуре (15–25°C). Окраска растворов стабильна в течение 60 минут.

$$\Delta A = (A_2 - A_1) \text{ образца/калибратора.}$$

Монореагентная схема – запуск реакции образцом.

Отмерить, мкл*	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Вода деионизованная	10	–	–
Калибратор/ мультикалибратор	–	10	–
Образец	–	–	10
Рабочий реагент	1000	1000	1000



Пробы перемешать, инкубировать 5 мин при 15–25/37°C и измерить оптическую плотность (А) опытной пробы и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 340 нм.

Окраска растворов стабильна в течение 60 минут.

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

РАСЧЕТЫ

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

$$C = \frac{A_{оп}}{A_{кал}} \times 1,61$$

- где: С – концентрация фосфора в опытной пробе, ммоль/л;
А_{оп} – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. пл.;
А_{кал} – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. пл.;
1,61 – концентрация фосфора в калибраторе, ммоль/л.

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

$$C = \frac{A_{оп} \times V \times 20}{A_{кал}} \times 1,61$$

- где: С – концентрация фосфора в опытной пробе, ммоль/сутки;
А_{оп} – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. пл.;
А_{кал} – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. пл.;
V – количество мочи, собранной за сутки, л
20 – коэффициент разведения мочи
1,61 – концентрация фосфора в калибраторе, ммоль/л.

Фактор пересчета:

Фосфор неорганический [мг/л] × 0,03229 =
= Фосфор неорганический [ммоль/л]

СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ

Аскорбиновая кислота до 300 мкг/мл, билирубин до 1026 мкмоль/л, гемоглобин до 10 г/л и липемия до 22,52 ммоль/л триглицеридов не влияют на точность анализа. В составе набора содержатся вещества (АЛФ), устраняющие липемичность сыворотки.

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.

Замораживание компонентов набора не допускается.

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 хранятся при температуре 2–8°C в течение всего срока годности при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Калибратор после вскрытия флакона хранится при температуре 2–8°C в течение трех месяцев при условии достаточной герметичности флаконов и отсутствии загрязнения.

Рабочий реагент можно хранить при температуре 2–8°C в течение четырех месяцев.

Для работы с набором рекомендуем использовать полуавтоматические пипетки со сменными наконечниками и пластиковую посуду одноразового применения. Недостаточно чистая посуда может явиться источником грубых ошибок при проведении анализа. Для мытья стеклянной посуды нельзя использовать моющие средства, содержащие фосфаты, так как они мешают анализу.

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

ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Набор ФОСФОР 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

Фосфор (Р от лат. Phosphorus) — химический элемент 3-й группы периодической системы, с атомным номером 15. Фосфор - основной внутриклеточный анион, присутствует в живых клетках в виде орто- и пирофосфорной кислот, входит в состав нуклеотидов, нуклеиновых кислот, фосфопротеидов, фосфолипидов, коферментов, ферментов. Кости животных состоят из гидроксилатапата $3Ca_3(PO_4)_2 \cdot Ca(OH)_2$. Составляет зубную эмаль, как фторапатит. Аденозинтрифосфорная кислота и креатинфосфат являются аккумуляторами энергии, обеспечивающими энергозависимые процессы в клетках. Основными регуляторами баланса фосфора в организме являются паратгормон, кальцитонин и витамин Д. Набор реагентов (ФОСФОР 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

Признаками недостаточности фосфора являются недомогание, слабость, физическое истощение, апатичность. Также может возникнуть остеопороз костных тканей, проблемы с дыханием, онемение и дрожь конечностей. При переизбытке фосфора в организме возникает нехватка кальция и фосфор может накапливаться в тканях органов и костях, что может привести к нарушенной работе нервной системы, почек и щитовидной железы. Высок риск образования камней в почках, возникновения железодефицитной анемии.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Состав набора, мл	Общий объем, мл
DV 791 007	Реагент 1: 2x60 Реагент 2: 2x15 Калибратор: 1x3,0	150
DV 791 008	Реагент 1: 4x60 Реагент 2: 4x15 Калибратор: 2x3,0	300

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 многообразового 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 $2,0-8,0^\circ\text{C}$.

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 $37-38^\circ\text{C}$ 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. Получение проб мочи (суточной).

К суточной моче необходимо добавить 10 мл 10% соляной кислоты, чтобы исключить оседание фосфатов. Мочу перед определением следует развести деионизованной водой в 20 раз.

5. Хранение.

Стабильность в сыворотке:

7 дней	при $2-8^\circ\text{C}$
3 месяца	при -20°C

Стабильность в моче:

2 дня	при $15-25^\circ\text{C}$
-------	---------------------------

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 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 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, ммоль/л
Собаки	1,1-3,0
Кошки	1,1-2,3
Лошади	1,3-1,8
Крупный рогатый скот (КРС)	1,4-1,9
Свиньи	1,4-1,9
Овцы	1,6-2,4
Куры	1,13-2,16

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

Возможные причины изменения уровня фосфора:

Повышение уровня фосфора:

- Острая и хроническая почечная недостаточность;
- Распад костной ткани при злокачественных опухолях (особенно при метастазировании), лейкозах;
- Остеопороз;
- Гипопаратиреоз, псевдогипопаратиреоз;
- Ацидоз (кетоацидоз при сахарном диабете, лактоацидоз, респираторный ацидоз);
- Гипервитаминоз D;
- Акромегалия;
- Портальный цирроз;
- Заживление переломов костей.

Понижение уровня фосфора:

- Остеомалация;
- Рахит у молодых животных; семейный рахит;
- Синдром мальабсорбции;
- Гиперпаратиреоз первичный и эктопический синтез гормона злокачественными опухолями;
- Гиперкальциемия гиперкальциемия различной этиологии;
- Острая подагра;
- Гиперинсулинемия (при лечении сахарного диабета);
- Беременность (физиологический дефицит фосфора);
- Дефицит соматотропного гормона (гормона роста).

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. Хлод 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.
6. Д. Мейер, Дж. Харви. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика. Пер. сангл. – 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.