

# Набор биохимических реагентов для ветеринарии

## ЖЕЛЕЗО ДиаВетТест



### НАЗНАЧЕНИЕ

ЖЕЛЕЗО ДиаВетТест – это набор жидких, готовых к употреблению реагентов для количественного определения содержания железа колориметрическим методом (без депротеинизации) 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 метод с феррозином без депротеинизации.

### ПРИНЦИП МЕТОДА

Связанное с трансферрином железо отщепляется в кислой среде в виде трёхвалентного железа и затем восстанавливается до двухвалентного в присутствии аскорбиновой кислоты. Двухвалентное железо образует с феррозином окрашенный комплекс фиолетового цвета, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации железа в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 560 (540–600) нм.

### СОСТАВ НАБОРА

Реагент 1	Буферный раствор, pH 4,5, содержащий	
	Ацетат натрия	≥140 ммоль/л
	Тиомочевину	≥80 ммоль/л
	Гуанидина гидрохлорид	≥4,0 ммоль/л
	Азид натрия	0,095%
Реагент 2	Раствор, содержащий	
	Аскорбиновую кислоту	≥100 ммоль/л
	Феррозин	≥2,0 ммоль/л
	Тиомочевину	≥50 ммоль/л
Калибратор	Калибровочный раствор	
	двухвалентного железа содержащий азид натрия	17,9 мкмоль/л 0,095%

Реагенты и калибраторы ДиаВетТест поставляются жидкими и готовыми к использованию.

### АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Параметр	Значение
Линейность	3,0–400 мкмоль/л
Отклонение от линейности	не более 5%
Чувствительность	не более 2,0 мкмоль/л
Коэффициент вариации	не более 5%

**Примечание.** Нормальные показатели для разных животных могут варьировать в широких пределах. При содержании железа в сыворотке крови выше 400 мкмоль/л анализируемую пробу следует развести физиологическим раствором (NaCl 0,9%) и полученный результат умножить на разведение.

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для калибровки фотометрических систем рекомендуется использовать мультикалибратор TruCal U (ферреновый метод) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия), данные аттестации которого соответствуют феррозиновому методу.

Для внутреннего контроля качества с каждой серией образцов проводите измерения контрольной сыворотки «Норма» (TruLab N) (ферреновый метод) и контрольной сыворотки «Патология» (TruLab P) (ферреновый метод) производства «DiaSys Diagnostic Systems GmbH» (Германия), данные аттестации которых соответствуют феррозиновому методу.

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 содержат токсичный компонент - тиомочевину, Реагент 1 и Калибратор содержит 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.

Реагенты 1 и 2 готовы к использованию для определения железа при запуске реакции субстратом. Тщательно закрывать флаконы с Реагентами 1 и 2 непосредственно после каждого использования.

#### Монореагентная схема - запуск реакции образцом.

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

Рабочий реагент должен храниться в защищенном от света месте при температуре 2 – 8°C не более одного месяца или при комнатной температуре (15 – 25°C) – не более одной недели.

Калибратор готов 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.

Таблица 1

#### Запуск реакции субстратом

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Реагент 1	1000	1000	1000
Вода деионизованная	200	–	–
Калибратор/ мультикалибратор	–	200	–
Сыворотка крови	–	–	200

Пробы перемешать, через 1 минуту измерить оптическую плотность  $A_1$  опытной и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы при длине волны 560 (540 – 600) 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 10 минут измерить оптическую плотность  $A_2$  опытной и калибровочной пробы против контрольной (холостой) пробы при длине волны 560 (540 – 600) 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 30 минут.

$$A_{оп.} \text{ или } A_{кал.} = (A_2 - A_1) \text{ опытной или калибровочной пробы}$$



Таблица 2

**Запуск реакции образцом (калиброваться только по сывороточному калибратору)**

Отмерить, мкл	Контрольная (холостая) проба	Калибровочная проба	Опытная проба
Образец	–	–	200
Вода деионизованная	200	–	–
Мультикалибратор	–	200	–
Рабочий реагент	1000	1000	1000

Пробы перемешать и инкубировать при температуре 37°C или при комнатной температуре (15–25°C) в течение 10 минут. Измерить оптическую плотность опытной ( $A_{оп.}$ ) и калибровочной ( $A_{кал.}$ ) проб против контрольной (холостой) пробы при двух длинах волн;  $\lambda_1 = 578$  нм и  $\lambda_2 = 630$  нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Окраска растворов стабильна в течение 30 минут.

**Примечание.** При использовании автоматических или полуавтоматических биохимических анализаторов количество реагентов и анализируемых образцов в зависимости от объема используемой кюветы может быть пропорционально изменено.

**РАСЧЕТЫ**

Содержание железа в сыворотке крови (в мкмоль/л) определить по формуле:

$$C = \frac{A_{оп}}{A_{кал}} \times C_{кал}$$

где:  $C$  – концентрация железа в опытной пробе, мкмоль/л;

$A_{оп.}$  – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. пл.;

$A_{кал.}$  – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. пл.;

$C_{кал}$  – концентрация железа в калибраторе/мультикалибраторе, мкмоль/л.

**СПЕЦИФИЧНОСТЬ/ПОМЕХОУСТОЙЧИВОСТЬ**

Билирубин в концентрации вплоть до 15 мг/дл и медь в концентрации до 500 мкг/дл не влияют на результат. Липемические пробы обычно образуют мутность в реакционной смеси, что ведет к ложнозавышенным результатам. При использовании данного набора это явление устраняется благодаря использованию входящего в набор липид-просветляющего фактора (АЛФ). Этот фактор полностью устраняет мутность, вызванную липемическими сыворотками.

На определение железа в сыворотке крови влияет недостаточно чистая посуда. Шприцы и иглы не должны отдавать железо в раствор. Следует избегать гемолиза. Сыворотка не должна содержать гемоглобин.

К уменьшению содержанию железа приводит применение ЭДТА, фторида натрия, оксалата калия, цитрата натрия.

**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.**

Рабочий реагент должен храниться в защищенном от света месте при температуре 2 – 8°C не более одного месяца или при комнатной температуре (15 – 25°C) – не более одной недели. Калибратор после вскрытия флакона можно хранить при температуре 2–8°C не более 3 месяцев при условии достаточной герметичности флакона.

Причиной грубых ошибок может быть недостаточно чистая посуда. Посуду следует мыть хромовой смесью или раствором 4 М соляной кислоты в деионизованной воде, затем тщательно ополоснуть деионизованной водой. Так же следует использовать только специально подготовленную воду (дистиллированную или деионизованную), не содержащую ионов железа.

При соблюдении условий хранения все компоненты набора стабильны в течение всего срока годности.

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

**ТРЕБОВАНИЯ ОХРАНЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ**

Набор ЖЕЛЕЗО 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

В живых организмах железо (Fe от лат. Ferrum) является важным микроэлементом и участвует во множестве биологических процессов. Примерно 70% железа входит в состав гемсодержащих белков (гемоглобина, миоглобина, цитохромов) и участвует в процессах газового обмена (дыхания), запасании кислорода в тканях, окислительно-восстановительных реакциях при производстве энергии в митохондриях, связывании свободных радикалов и т.д. Негемовое железо входит в состав более 100 ферментов, контролирующих: обмен холестерина, синтез ДНК, качество иммунного ответа на инфекцию, энергетический обмен клеток, реакции образования свободных радикалов в тканях организма. В организм железо поступает только с пищей. В связи с исключительной важностью железа для организма и для компенсации его недостатка или избытка, почти четверть всего железа запасается в виде комплексов с белком ферритином с преимущественным отложением в печени, селезенке и мышцах.

Набор реагентов (ЖЕЛЕЗО 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

Основной признак дефицита железа у всех видов животных — микроцитарная гипохромная анемия, возникающая вследствие недостаточности синтеза гемоглобина и сопровождающаяся отставанием в росте. Вследствие этого заболевания клетки организма перестают получать достаточное количество кислорода, что приводит к потере массы тела и жировой дистрофии печени, почек, сердца и других органов. Наиболее распространенная причина железодефицитной анемии у животных — нарушение рациона питания. Результатом недостаточного снабжения железом бывают следующие признаки и следствия:

- Вялость, безразличие, сонливость; отказ от пищи, устойчивое снижение массы тела, осветление слизистых оболочек, учащенное дыхание и сердцебиение, потеря сознания при физической активности; угнетение клеточного и гуморального иммунитета; повышение общей заболеваемости (простудные и инфекционные болезни, гнойничковые поражения кожи, энтеропатии); увеличение риска развития опухолевых заболеваний.

При умеренном регулярном избытке железа в рационе происходит насыщение им печени с последующим отложением в виде коллоидальной формы окиси железа — гемосидерина, вредного для организма. При избытке железа ухудшается усвоение фосфора и меди, уменьшается отложение витамина А в печени молодняка, ухудшается усвоение протеинов. В случае значительного избытка минерального железа в корме у животного может развиваться токсический энтерит.

### ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Кат. №	Состав набора, мл	Общий объем, мл
DV 779 003	Реагент 1: 2x68 Реагент 2: 2x17 Калибратор: 1x3,0	170
DV 779 004	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 многоразового 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 цели 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  $180^\circ$  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].
- 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:**

3 дня	при 15–25°C
1 неделя	при 2–8°C

**Загрязненные образцы хранению не подлежат!**

**Хранить в темноте!**

**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 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 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, мкмоль/л
Собаки	20,0-30,0
Кошки	15,0-40,0
Лошади	20,0-23,0
Крупный рогатый скот (КРС)	27,0-40,0
Свиньи	16,0-36,0
Овцы	29,7-39,7
Куры	19,7-35,8

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

## Возможные причины изменения уровня железа:

### Повышение уровня железа:

- Несбалансированный рацион питания;
- Избыточное парентеральное введение препаратов железа;
- Острое отравление препаратами железа;
- Повторные гемотрансфузии;
- Гемохроматоз;
- Гемолитическая анемия, гипо- и апластическая анемия;
- Фолиево-дефицитная гиперхромная анемия;
- Талассемия;
- Нефрит;
- Гепатит острый и хронический;
- Острая лейкемия;
- Свинцовая интоксикация.

### Понижение уровня железа:

- Железодефицитная анемия;
- Острые и хронические инфекционные заболевания, сепсис;
- Коллагеноз; острый и хронический лейкозы, миелома;
- Острые и хронические кровопотери;
- Молочно-растительная диета;
- Синдром мальабсорбции, патологии желудка и кишечника;
- Повышенное потребление железа организмом (беременность, кормление, период быстрого роста, повышенные физические нагрузки);
- Ремиссия пернициозной анемии (авитаминоз B12);
- Гипотиреоз;
- Нефротический синдром;
- Хронические заболевания печени (гепатит, цирроз).

**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](mailto:info@diakonvet.ru)

Рекомендовано Центральной научно-методической ветеринарной лабораторией

