

«ПОГОДЖЕНО»

Перший заступник голови Державної
служби України з лікарських засобів

09 листопада 2012 р.

І.Б. Демченко

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар клінічної лікарні „Феофанія”
Державного управління справами

30 жовтня 2012 р.

І.П. Семенів

Код за НК 024:2019 – **54758**

REF № **HP012.01**

ТУ У 24.4-24607793-019-2003

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАЛІЗА ТА ЗАГАЛЬНОЇ ЗАЛІЗОЗВ'ЯЗУЮЧОЇ ЗДАТНОСТІ (ЗЗЗЗ) СИРОВАТКИ КРОВІ

ПРИЗНАЧЕННЯ**IVD**

Набір призначений для визначення концентрацій заліза та загальної залізозв'язуючої здатності (ЗЗЗЗ) сироватки крові людини в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях та науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **25 визначень** (фотометруємий об'єм 1,12 мл) заліза **чи** таку ж саму кількість визначень ЗЗЗЗ (з урахуванням холостих та калібрувальних проб) (Див. *Примітку 8*).

Діапазон визначаємих концентрацій заліза (чи ЗЗЗЗ) - від 4 мкмоль/л до 200 мкмоль/л.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 5 %.

Чутливість¹⁷ на 0,001 од. оптичної щільності – не більше 0,2 мкмоль/л (562 нм).

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 16 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1. Буферний розчин | - 1 флакон з (100 ± 4) мл; |
| 2. Кольорореагент (феррозин (20 ± 2) г/л) | - 1 пробірка з (2,0 ± 0,1) мл; |
| 3. Калібрувальний розчин заліза (20,0 ± 0,5) мкмоль/л або (112 ± 3) мкг% | - 1 флакон з (8,0 ± 0,5) мл; |
| 4. Насичуючий розчин заліза (90 ± 10) мкмоль/л | - 1 флакон з (50 ± 2) мл; |
| 5. Сорбент (лужний карбонат магнію) | - 1 флакон з (10 ± 1) г; |
| 6. Деіонізована вода | - 1 флакон з (8,0 ± 0,5) мл. |

ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ

Сироватка, гепаринізована плазма.

Не застосовувати ЕДТО (ЕДТО – етилендіамінтетраоцтова кислота), оксалатну та цитратну плазму. **Не застосовувати** мутну (ліпемічну) чи гемолітичну сироватки – можливо отримання завищених результатів. Концентрація заліза стабільна на протязі 7 діб при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, що забезпечує вимір оптичної щільності розчинів при довжині хвилі **562 (530-590)** нм у діапазоні (0 - 1) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм або 5 мм.
2. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
3. Піпетки місткістю 1; 0,1 та 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).
4. Центрифуга для пробірок (швидкість від 2000 об/хв до 5000 об/хв).

ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ЗАЛІЗА В СИРОВАТЦІ (ПЛАЗМІ) КРОВІ**ПРИНЦИП МЕТОДУ¹⁻⁶**

Залізо звільняється з залізозв'язуючих пептидів сироватки крові та відновлюється завдяки дії гуанідину та гідроксиламіну. Натрієва сіль 3-(2-піриділ)-5,6-біс(4-сульфофеніл)-1,2,4-триазину (феррозин) дає з іонами Fe⁺² комплекс фіолетового кольору. Оптична щільність дослідного розчину пропорційна концентрації заліза в пробі.

СКЛАД РЕАКЦІЙНОГО РОЗЧИНУ В ПРОБІ

Феррозин > 1,10 ммоль/л; тіосечовина – 11,90 ммоль/л; гуанідину гідрохлорид – 3,75 ммоль/л; гідроксиламіну гідрохлорид >60 ммоль/л; гліцин*HCl – 0,2 ммоль/л.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

Розчини готові та придатні до використання після відкупорювання флаконів на протязі місяця при зберіганні від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводиться згідно зі схемою, наведеною у таблиці 1

Таблиця 1

| Відміряємий об'єм, мл | Дослідна проба | | Калібрувальна проба | | Холоста проба | |
|-----------------------|--------------------|-------------------|---------------------|------------------|---------------|------|
| | 1' | 1 | 2' | 2 | 3' | 3 |
| Буферний розчин | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Сироватка (плазма) | 0,25 | 0,25 | - | - | - | - |
| Калібр. розчин | - | - | 0,25 | 0,25 | - | - |
| Деіонізована вода | - | 0,02 | - | 0,02 | 0,25 | 0,27 |
| Кольорореагент | 0,02 | - | 0,02 | - | 0,02 | - |
| Вимір. опт. щільність | Е _{досл'} | Е _{досл} | Е _{кал'} | Е _{кал} | | |

Витримують **30 хв** при кімнатній температурі, виміряють оптичну щільність дослідної (Е_{досл}) і калібрувальної (Е_{кал}) проб **проти холостої (пробірка №3)**, а оптичну щільність дослідної (Е_{досл'}) і калібрувальної (Е_{кал'}) проб **проти холостої з кольорореагентом (пробірка №3')**. Забарвлення стійке протягом **(30 ± 5) хв**. Фотометрування – див. розділ “Обладнання”.

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

$$C_{\text{ЗАЛІЗА}} = C_{\text{КАЛІБРАТОРА}} \times (E_{\text{ДОСЛ}' - E_{\text{ДОСЛ}}) / (E_{\text{КАЛ}' - E_{\text{КАЛ}}}) \quad (1)$$

де: $C_{\text{ЗАЛІЗА}}$ – концентрація заліза в пробі (мкмоль/л чи мкг);

$C_{\text{КАЛІБРАТОРА}}$ – концентрація заліза в калібрувальному розчині (20 мкмоль/л чи 112 мкг);

$E_{\text{ДОСЛ}}$, $E_{\text{ДОСЛ}'}$, $E_{\text{КАЛ}}$, $E_{\text{КАЛ}'}$ – оптичні щільності розчинів, од. опт. щільності (див. таблицю 1).

НОРМАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ВМІСТУ ЗАЛІЗА В СИРОВАТЦІ

- Чоловіки ⁷: (9,5 – 29,9) мкмоль/л чи (53 – 167) мкг%;
- Жінки ⁷: (8,8 – 27,0) мкмоль/л чи (49 – 151) мкг%;
- Новонародженні ⁸: (17,8 – 44,8) мкмоль/л чи (100 – 250) мкг%;
- Немовлята ⁸: (7,2 – 17,9) мкмоль/л чи (40 – 100) мкг%;
- Діти віком до 14 років ⁸: (9,0 – 21,5) мкмоль/л чи (50 – 120) мкг%;
- Діти з інтоксикацією ⁹: (50,1 – 456,5) мкмоль/л чи (280 – 2550) мкг%;
- Смертельно отруєні діти ⁹: >322,2 мкмоль/л чи (>1800) мкг%;

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (Належної Лабораторної Практики) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Залізо розподілене в організмі у вигляді наступних речовин: гемоглобін, міоглобін, тканини (в основному печінка, селезінка, кістковий мозок). Лише 0,1 % від загальної кількості в організмі присутнє в плазмі крові.

Сироваткова концентрація заліза порушується при багатьох фізіологічних і патологічних станах. У здорових людей можуть спостерігатися щоденні коливання концентрації заліза.

Дефіцит заліза і перевантаження залізом є основною патологією метаболізму заліза. Однак порушення метаболізму заліза зустрічається і при низці інших захворювань.

Гіперсидероз асоційований з такими патологіями як:

Перніціозні, апластичні і гемолітичні анемії, гемохроматоз, гостра лейкемія, отруєння свинцем, гострий гепатит, дефіцит вітаміну В6, таласемія, надлишкове лікування залізом, повторні переливання крові, гостре отруєння залізом (діти), нефрит.

Гіпосидероз характерний для таких станів: залізодефіцитна анемія, ремісія перніціозної анемії, гострі і хронічні інфекції, рак, нефроз, гіпотиреоїдизм, стан після оперативного втручання, квашиоркор.

Клінічний діагноз повинен встановлюватися на основі інтеграції клінічних і лабораторних даних.

ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОЇ ЗАЛІЗОЗВ'ЯЗУЮЧОЇ ЗДАТНОСТІ СИРОВАТКИ КРОВІ (ЗЗЗЗ)

ПРИНЦИП МЕТОДУ ¹⁰

Трансферин в непатологічних сироватках зв'язує іони заліза до 1/3 свого об'єму. Для насичення трансферину сироватку обробляють надлишковою кількістю іонів Fe⁺³. Від не зв'язаних іонів заліза розчин звільняють за допомогою карбонату магнію. Визначаючи концентрацію заліза в насиченій

сироватці, знаходять її загальну залізовв'язуючу здатність (ЗЗЗЗ) чи (ТІВС). Різниця між ЗЗЗЗ та залізом в сироватці крові - це ненасичена залізовв'язуюча здатність, НЗЗЗ, сироватки (UІВС).

$ЗЗЗЗ \text{ (чи ТІВС)} = \text{концентрація заліза у сироватці} + \text{НЗЗЗ (чи UІВС)}$.

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводиться згідно зі схемою, наведеною у таблиці 2.

Таблиця 2

| Відміряти у пробірку, мл | Напівмікроаналіз | Макроаналіз |
|---|---------------------------------|---------------------------------|
| Насичуючий розчин заліза | 1,0 | 2,0 |
| Сироватка (плазма) | 0,5 | 1,0 |
| Перемішують вміст пробірок та витримують їх (5-6) хв при кімнатній температурі (від плюс 20 до плюс 25 °С). | | |
| Сорбент | (0,1-0,2) г (близько 0,5 мл) | (0,2-0,4) г (близько 1,0 мл) |
| На шпателі або скальпелі внести у пробірку сорбент в приблизній кількості згідно з таблицею. Тримують (5-10) хв при кімнатній температурі від плюс 20 °С до плюс 25 °С, збовтуючи кожні (2-3) хв. Центрифугують (9-10) хв (2000 об/хв –5000 об/хв) та проводять визначення концентрації заліза у супернатанті. Визначення проводять згідно з таблицями 1 та 2, з супернатантом замість сироватки. | | |

РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Концентрацію заліза в супернатанті (знайдено за формулою 1) необхідно помножити на коефіцієнт розведення – 3. Отриманий результат - це ЗЗЗЗ (ТІВС). Для розрахунку ненасиченої залізовв'язуючої здатності, НЗЗЗ, сироватки (UІВС), із знайденого значення ЗЗЗЗ віднімають концентрацію заліза в сироватці чи плазмі крові.

$$\% \text{ Насичення трансферину} = \text{Залізо у сироватці} \times 100 / \text{ЗЗЗЗ} \quad (2)$$

НОРМАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ ЗЗЗЗ ¹¹:

- Дорослі: 250 – 425 мкг% чи 44,8 – 76,1 мкмоль/л.

НОРМАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ НЗЗЗ ¹¹

- Дорослі: 180 – 260 мкг або 32-46 мкмоль/л.

НОРМАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ НАСИЧЕННЯ ТРАНСФЕРИНУ ¹²:

- Чоловіки: 20 – 50 %;

- Жінки: 15 – 50 %.

ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Гемоліз (тригліцериди < 100 мг/л) та білірубін (< 200 мг/л) не впливають на хід визначення.

Медикаментозні субстанції, що підвищують результати визначення: хлорамфенікол, цисплатин, естроген, етанол, декстран заліза, свинець, метотрексат, пероральні контрацептиви.

Медикаментозні субстанції, що знижують результати визначення: алопуринол, стероїди анаболізму, аспірин (великі дози), кортикотропін, кортизон, метформін.

На хід визначення також можуть робити вплив ліпемія, ліки та інші речовини ¹³.

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Для контролю ходу реакції та процедури вимірювання рекомендується використовувати контрольні сироватки із значеннями концентрації, визначеними даним методом. Наприклад: «Ліонорм» (Чехія), «Біоконт С» (Росія), "ФілоНорм" або „ФілоПат” (Україна).

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

ПРИМІТКИ

1. Кювети та лабораторний посуд, що використовується, повинні бути цілком чистими та призначеними тільки для аналізу заліза. Мити використаний посуд слід в 20% розчині соляної або азотної кислоти (хч чи чда) або хромовою рідиною. Вимитий посуд ретельно полощуть деіонізованою чи бідистильованою водою, сушать.

2. Сироваткова концентрація заліза понижена у багатьох, але не у всіх пацієнтів із залізодефіцитною анемією і при хронічних запальних захворюваннях. Вимірювання сироваткового заліза не повинно використовуватися як тест для встановлення залізодефіцитних станів^{15,16}.
3. У здорових людей добові зміни вмісту заліза в сироватці несуттєві, зазвичай найбільш високі значення спостерігаються вранці.
4. Рівні заліза у хворих можуть піддаватися широким коливанням як протягом дня, так і день у день.
5. Дослідження вмісту заліза в сироватці слід відкласти на декілька днів, якщо пацієнту було проведено переливання крові.
6. Позбавлення сну і стрес викликають втрату добового ритму (рівні заліза знижуються).
7. У новонароджених відбувається падіння вмісту заліза протягом декількох годин після пологів.
8. **Розраховано при витраті розчину реагенту 1,0 мл (мікро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:**

Буферний розчин : Аналізуємий розчин : Кольорореагент = 50 : 5 : 1.

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Буферний розчин - включає похідні гідроксиламіну (подрозносяча речовина). До складу набору (буферний розчин та розчини заліза) входять небезпечні хімічні компоненти. При попаданні розчинів на шкіру або слизову оболонку – треба негайно змити їх великою кількістю води.

УТИЛІЗАЦІЯ


Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

ЛІТЕРАТУРА

1. L.L. Stookey, Anal. Chem., 42, 779-781 (1970).
2. H.L. Williams, D.J. Johnson, M.J. Haut, Clin. Chem., 23, 237-240 (1977).
3. F. Cenotti, G. Canotti, Clin. Chem., 26, 327 (1980).
4. R. Rooto, Clin. Chim. Acta, 61, 229 (1975).
5. H.G. Eisenwiener, P. Rietz, P.J. Schläepfer, Clin. Chem. Clin. Biochem, 17, 149 (1979).
6. J.R. Duffy, J. Gardin, Clin. Biochem, 10, 122 (1977).
7. M.A. Viollier, H. Gaschwind, P. Schläepfer, Laboratoriums-medizin, 11, 240-244 (1980).
8. R.D. Eastham, Biochemical Values in Clinical Medicine, 7th ed. Bristol, England, John Wright and Sons, Ltd (1985).
9. R.C. Baselt, Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology, 2nd ed. Littleton, MA, PSG Publishing Co., Inc. (1987).
10. W.N.M. Ramsay, Clin. Chim. Acta 2, 221-226 (1957).
11. SmithKline Beecham Clinical Laboratories: Directory of Services. King of Prussia, PA (1993).
12. J.B. Henry, Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 18th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Co. (1991).
13. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Co., 1999.
14. Энциклопедия клинических лабораторных тестов, под редакцией Н.У.Тица, стр. 570-571, «Лабинформ», Москва, 1997.
15. Artiss JD, Vinigarov S, Zak B. Spectrophotometric study of several reagents for serum iron Clin Biochim 1981; 14: 311-15.
16. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 3th ed. AACCC Press, 1997.
17. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).



 **ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,**
 Україна, 49051 м. Дніпро, вул. Каштанова, 32
 Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34
 Тел.: (093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54
 E-mail: felicit@ukr.net <http://www.felicity.com.ua>