

**ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ
КАРБОКСИГЕМОГЛОБІНУ У КРОВІ****IVD****ПРИЗНАЧЕННЯ**

Набір призначений для визначення % карбоксигемоглобіну у крові людини в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **50 макровизначень** (Див. *Примітку 2*).

Діапазон визначаємих концентрацій — від 0,5 % до 100 %.

Коефіцієнт варіації визначення — не більше 10 %.

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Уникати влучення прямих сонячних променів.

Гарантійний строк придатності набору - 12 місяців від дати виготовлення.

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

ПРИНЦИП МЕТОДУ

Карбоксигемоглобін (COHb) в слабкокислому середовищі при підвищеній температурі проявляє стійкість, коли решта форм гемоглобіну осаджуються і виводяться з розчину. Під дією Трансформуючого розчину всі форми гемоглобіну переходять у форму оксигемоглобіну, максимум поглинання якого вимірюють при довжині хвилі 550 нм.

По розрахунковій формулі (1) визначається % карбоксигемоглобіну у крові людини.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|--------------------------------------|--|
| 1. Буферний розчин | - 2 флакони по (100 ± 2) мл |
| 2. Трансформуючий розчин | - 1 флакон з (50 ± 2) мл |
| 3. Концентрат стабілізуючого розчину | - 1 флакон з (20 ± 1) мл
або 2 флакони по (10,0±0,2) мл |

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі **550** нм у діапазоні (0-1,0) од. оптичної щільності та довжині оптичного шляху 10 мм.
2. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
3. Колби мірні місткістю 100 мл та 500 мл (згідно з чинними нормативними документами).
4. Піпетки місткістю 1,0 та 5,0 (ДСТУ EN ISO 835:2018).
5. Водяний термостат або баня, які здатні термостатувати пробірки при температурі від плюс 57 °С до плюс 60 °С (згідно з чинними нормативними документами).
6. Фільтрувальний папір „синя стрічка”.

ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ

Цільна кров. В якості антикоагулянту використовують: цитрат натрію. Оксалати в якості антикоагулянтів не рекомендуються. Використовують свіжий зразок крові, який зберігають у герметичному посуді.

Зразок для визначення карбоксигемоглобіну стабільний протягом 12 годин при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Процедура підготовки зразку

Зразок для аналізу. До 4 мл **Стабілізуючого розчину** додають 1 мл цільної венозної крові. Розчин готують безпосередньо перед проведенням аналізу, при взятті крові у лабораторії.

*У випадках коли кров постачається у лабораторію з інших відділень цільну венозну кров стабілізують антикоагулянтом цитратом натрію 3,8 % у співвідношенні 9:1. Потім в лабораторії готують **Зразок для аналізу** - цитратну кров (1 мл) розводять **Стабілізуючим розчином** (4 мл), співвідношення 1:4. При розрахунку карбоксигемоглобіну перемножують отриманий результат на коефіцієнт 1,1 (розведення крові цитратом натрію 3,8 %).*

Не рекомендується **Стабілізуючий розчин** використовувати в якості антикоагулянту при відборі крові у відділеннях через нестабільність розчину.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

- 1 **Буферний розчин** - готовий до застосування. Розчин стійкий при зберіганні в холодильнику протягом місяця при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.
- 2 **Трансформуючий реагент.** Вміст флакону з **Трансформуючим розчином** розводять у (100 - 200) мл прокип'яченої дистильованої воді у мірній колбі місткістю 500 мл та доводять прокип'яченою дистильованою водою до мітки. Розчин стійкий при зберіганні в холодильнику протягом місяця у темряві

(від плюс 2 °С до плюс 8 °С). Після використання реактиву для аналізу НЕГАЙНО закрийте флакон, щоб уникнути випаровування або контамінації реактиву.

3 Стабілізуючий розчин. Вміст 1 флакону з 10 мл або 10 мл **Концентрату стабілізуючого розчину** кількісно переносять у мірну колбу місткістю 100 мл та доводять прокип'яченою дистильованою водою до мітки. Розчин стійкий при зберіганні в холодильнику протягом місяця у темряві (від плюс 2 °С до плюс 8 °С).

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

Аналіз проводять у відповідності зі схемою:

Дослідна проба 1 (Макро).

Відміряють у пробірку **0,2 мл Зразку для аналізу** та **4,8 мл Трансформуючого реагенту**. Ретельно перемішують, *витримують 1 хв*. Вимірюють оптичну щільність - (**E₁**) проти *дистильованої води*. Забарвлення стабільне протягом **10 хв** після закінчення інкубації за умови запобігання від дії прямого сонячного світла.

Дослідна проба 2 (Макро).

1. Відміряють у пробірку **4 мл Буферного розчину** та **1 мл Зразку для аналізу**, ретельно перемішують, витримують **рівно 5 хв** при температурі від плюс 57 °С до плюс 60 °С. Одразу охолоджують під проточною водою до кімнатної температури. Фільтрують крізь папір «синя стрічка». Фільтрат не повинен бути каламутним.

2. Відбирають у пробірку **1 мл Фільтрату**, додають **4,0 мл Трансформуючого реагенту**. Ретельно перемішують, *витримують 1 хв*. Вимірюють оптичну щільність - (**E₂**) проти *дистильованої води*. Забарвлення стабільне протягом **10 хв** після закінчення інкубації за умови запобігання від дії прямого сонячного світла.

Фотометрування - див. розділ «Обладнання»

РОЗРАХУНОК ведуть за формулою (1):

$$\%COHb = \frac{E_2}{E_1} \times 100 \times K \quad , \text{ де} \quad (1)$$

- %COHb- вміст карбоксигемоглобіну у крові, %;
- E₁ – оптична щільність дослідної проби 1, од. опт. щільності;
- E₂ - оптична щільність дослідної проби 2, од. опт. щільності;
- K – коефіцієнт перерахунку. **K=1,1** - у випадку попередньої стабілізації цільної крові цитратом натрію 3,8 % у співвідношенні **9 : 1**. **K=1** - у випадку безпосереднього проведення аналізу.

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ

Новонароджені	1,5 % ⁴	3-6 місяця	1,38 % ⁴
Діти: 1-7 діб	1,65 % ⁴	1-3 років	1,27 % ⁴
8-21 діб	1,6 % ⁴	3-7 років	1,21 % ⁴
1-3 місяця	1,5 % ⁴	7-14 років	1,17 % ⁴

Курці 1,8 - 10 %

Некурящі 0,2 – 0,4%

Симптоми пов'язані із зміною рівнів отруєння чадним газом²

COHb у крові (%)	Фізіологічні і суб'єктивні симптоми
10	Немає помітного впливу, окрім стислості дихання при сильному навантаженні; можлива напруга у передній частині голови; розширення шкірних кровоносних судин
20	Стислість дихання при помірному навантаженні; випадковий головний біль з пульсацією у скронях
30	Сильний головний біль; дратівливість; легка втомленість; порушення свідомості; можливе запаморочення; неясність зору
40–50	Головний біль, замішання[безлад]; непритомність, слабкість при навантаженні
60–70	Безпам'ятність; переривиста конвульсія; дихальна недостатність, при довготривалому впливі - смерть
80	Швидка смерть

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Монооксид вуглецю (CO)- безбарвний без запаху газ, ендогенно утворюється при нормальному метаболізмі. Більше декілька десятків років тому було вперше продемонстровано утворення монооксиду вуглецю при катаболізмі гем-вмістних протеїнів, наприклад гемоглобіну. Катаболізм гема з інших гем-вмістних протеїнів, наприклад, з міоглобіну і цитохромів, також вносить внесок в ендогенне утворення монооксиду вуглецю. Крім цього, джерелом ендогенного утворення монооксиду вуглецю є перекисне окислення ліпідів. Біологічний вплив ендогенно утвореного монооксиду вуглецю визначається його високим афінітетом до гем- вмістних протеїнів, особливо до гемоглобіну. Проте важливо усвідомлювати, що

монооксид вуглецю є не просто потенційно токсичним продуктом метаболізму, а також регулюючим чинником таких фізіологічних процесів, як дихання, нейром'язова трансмісія, регуляція артеріального тиску, регуляція скоротливості матки протягом вагітності. Ендогенно утворюється монооксид вуглецю, зв'язуючись з гемоглобіном, забезпечує утримання 0,5-1,0% СОНб в крові в нормі. При гемолітичних процесах можливе підвищення фракції СОНб до 10%.

На додаток до ендогенно утвореному СО, ми вдихаємо СО, що утворюється в основному в результаті неповного згоряння вуглеводнів. Вихлопні гази автомобілів, що містять до 10% СО, відповідальні за екологічне неблагополуччя у великих мегаполісах. Одною з найбільш розповсюджених причин хронічної інтоксикації угарним газом є куріння. Тютюновий дим містить близько 4% СО. Тому у курців рівень СОНб може становити 3-5%, досягаючи 15-22%³ у злісних курців. Найбільш серйозні випадки гострого або хронічного отруєння СО пов'язані з проблемами в домашніх опалювальних системах, печах, застосуванні вугілля в брикетах і та ін.

Найбільш несподіваною причиною карбоксигемоглобінемії виявилось вдихання парів дихлорметана. Цей розчинник широко використовується в чистячих агентах, аерозольних пропелентах та інших складових. Вдихувані пари дихлорметана метаболізуються різними оксидазами до СО₂ і СО. При цьому рівень СОНб досягає 5-15%, а в окремих випадках зареєстровано підвищення до 40-50%.

Механізми токсичності монооксиду вуглецю

Монооксид вуглецю має спорідненість до гемоглобіну в 200-250 разів вище, ніж кисень (О₂). Крім витіснення О₂ з О₂Нб, СО змінює аллостеричну структуру гемоглобіну, збільшуючи афінитет гемоглобіну до кисню, тобто ускладнюючи віддачу кисню в тканинах. Внаслідок цього знижується як кисень-транспортна функція крові, так і екстракція кисню тканинами. В результаті розвивається прогресуюча гіпоксія, до якої схильні більшою мірою органи з високим рівнем метаболізму (мозок, серце, печінка, нирки). Монооксид вуглецю чинить також пряму токсичну дію на тканини, конкуруючи за О₂ в таких тканинних гемопротеїнах, як міоглобін, пероксидаза, каталаза, цитохроми. Наприклад, зв'язування СО з міоглобіном серцевого м'яза призводить до депресії міокарда і гіпотензії, посилюють ішемію і гіпоксію інших органів.

Кількість СОНб в крові визначається концентрацією СО у вдихуваному повітрі і тривалістю експозиції. При вдиханні фіксованої концентрації СО рівень СОНб підвищується протягом перших двох годин, потім виходить на плато протягом 3-х годин, досягаючи рівноваги до 4-6 години експозиції.

Основними клінічними симптомами гострого отруєння СО є головний біль, нудота, порушення свідомості аж до коми. Головний біль, нудота, блювота, слабкість є також ознаками хронічного отруєння, для якого характерні зниження інтелектуальних можливостей, утруднення концентрації уваги і зниження пам'яті. У більш, ніж 1/3 пацієнтів неврологічні порушення зберігаються протягом 3-х років після хронічної експозиції СО. Стан досить важко діагностується і корисним може бути визначення рівня СОНб в крові. Щодо діагностичного та прогностичного значення рівня СОНб при гострих отруєннях СО існує досить багато суперечливих даних. Наприклад, часто проба крові на СОНб відправляється в лабораторію вже на фоні терапії 100% О₂. При цьому СО витісняється із зв'язку з гемоглобіном і рівень СОНб не відображає рівня СО в тканинах. Представляється важливим відзначити, що СО не зв'язується з гемоглобіном досить швидко. Наприклад, в експерименті було показано, що перемішування еритроцитів в середовищі зі 100% вмістом СО вимагає для насичення близько 20 хв, а після 5 хв експозиції тільки 25% гемоглобіну конвертується в СОНб. Внаслідок цього значна кількість вдихуваного СО, фізично розчиненого в плазмі крові, до зв'язування з гемоглобіном має можливість досягти життєво важливі органи з ризиком пошкодження клітинних ензимів (каталази, пероксидази, цитохромів). СО зберігається в клітинах після нормалізації рівня СОНб протягом тривалого часу і фактично є причиною пошкодження клітини. Вищесказане аргументує думку прихильників необхідності проведення **гіпербаричної оксигенації (ГБО)**, що значно прискорює елімінацію СОНб. ГБО також збільшує кількість О₂, розчиненого в плазмі крові, здатного витіснити СО з тканин. Період напіврозпаду СОНб у пацієнта, дихаючого атмосферним повітрям, становить 230-320 хв. При диханні чистим О₂ період напіврозпаду скорочується до 90 хв. На тлі ГБО з тиском О₂ в 3 АТА період напіврозпаду СОНб скорочується до 22 хв. При цьому швидше звільняється від зв'язку з СО не тільки гемоглобін, а й клітинні ензими, що дозволяє досягти основну мету терапії: профілактику відстрочених неврологічних порушень. Показаннями для ГБО, прийнятими в ряді країн (наприклад, в Данії) в разі експозиції СО, є:

- Будь-які неврологічні порушення (крім головного болю).
- Ознаки порушення серцевої діяльності.
- Порушення свідомості аж до коми.
- Наявність вагітності.
- Рівень фракції СОНб > 25% після 2 годин дихання 100% О₂.

Незважаючи на те, що не існує жорсткої кореляції між рівнем СОНб і клінікою, проте зі зростанням рівня фракції СОНб чітко наростає тяжкість клінічних проявів гострого отруєння СО. Дані представлені в таблиці 1.

СОНб у крові (%)	Фізіологічні і суб'єктивні симптоми
0—2	Нормальний рівень серед некурящих
5—6	Нормальний рівень для курців. Можливо порушення навичок водіння автомобіля і зниження толерантності до фізичного навантаження у некурящих
10—20	Головний біль, слабкість
20—30	Сильний головний біль, нудота, блювота, запаморочення, порушення зору.
30—40	Нудота, блювота, непритомність, тахікардія і тахіпное, неврологічна симптоматика.
40—50	Кома, судоми, порушення дихання і серцево-судинної діяльності.
50—60	Кома, судоми, глибоке пригнічення дихання та серцевої діяльності.
60—70	Кома, судоми, артеріальна гіпотензія, брадикардія, пригнічення дихання.
>70%	Дихальна недостатність. Смерть.

Вимірювання FСОНб найчастіше використовується для діагностики гострого отруєння монооксидом вуглецю.

Іншими показаннями є:

- підтвердження рівня гемолізу у новонароджених;
- вивчення впливу хронічної експозиції СО на здоров'я (наприклад, на робочих місцях);
- судово-медичне визначення рівня СОНб в трупній крові жертв експозиції СО (наприклад, при пожежах, суїцидах та ін.).

При судово-медичному дослідженні трупної крові рівень FСОНб понад 50% підтверджує отруєння СО як основну причину смерті. Рівень 10-50% показує, що вдихання СО внесло свій вклад в механізм загибелі і безсумнівно загиблий був живий на момент початку пожежі. Рівень FСОНб нижче 10% означає, що потерпілий або був мертвий до початку пожежі, або помер незабаром після загоряння. Судово-медичне дослідження рівня СОНб допомагає в оцінці фатальних авто- і авіакатастроф, що супроводжувалися загорянням.

ПРИМІТКИ

1. Ліпіди (до 1,3 г/л) майже не впливають на результат.
2. Розраховано при витраті розчинів реагентів згідно приведеної методики (макро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:

<u>Дослідна проба 1</u>	Трансформуючий реагент : Зразок для аналізу = 24 : 1
<u>Дослідна проба 2</u>	Буферний розчин : Зразок для аналізу = 4 : 1 Трансформуючий реагент : Фільтрат = 4 : 1.

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Якщо реактив потрапив в очі, на шкіру або слизові оболонки, його необхідно змити великою кількістю води. Постраждалому має бути надана кваліфікована медична допомога.

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. Торшин В.А. Клинически значимые дисгемоглобины. Карбоксигемоглобин // Лаборатория. — 2007. — № 1. — С. 17-18
2. Winter PM & Miller JN (1976) Carbon monoxide poisoning. J Am Med Assoc, 236: 1503
3. Тиунов Л.А., Кустов В.В. Токсикология окиси углерода. — М.: Медицина, 1980. — С. 142.
4. Данилова Л.А.. Анализы крови, мочи и других биологических жидкостей человека в различные возрастные периоды. Санкт-Петербург, СпецЛит, 2014, с.18.



ТОВ НВП «Філіцит-Діагностика»,
Україна, 49051 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: filicit@ukr.net <http://www.felicit.com.ua>