

ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ

МЕТГЕМОГЛОБІНУ

ПРИЗНАЧЕННЯ



Набір призначений для визначення метгемоглобіну у крові людини спектрофотометричним методом в клініко-діагностичних, біохімічних та патолого-анатомічних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **200 напівмікро-, 400 мікрровизначень** метгемоглобіну (Див. *Примітку 2*) та на **200 макро-, 400 напівмікрровизначень** загального гемоглобіну (Див. *Примітку 3*).

Діапазон визначаємих концентрацій загального гемоглобіну - від 20 г/л до 250 г/л.

Діапазон визначення метгемоглобіну - від 0 до 100 %.

Коефіцієнт варіації визначення загального гемоглобіну — не більше 2 %.

Коефіцієнт варіації визначення метгемоглобіну — не більше 6 %.

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

Уникати влучення прямих сонячних променів.

Гарантійний строк придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

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

ПРИНЦИПИ МЕТОДІВ

Метгемоглобін (MetHb, геміглобін, Hi) є похідним гемоглобіну (Hb), в якому окислюється двовалентне залізо, переходячи від двовалентного до тривалентного стану, роблячи молекулу нездатною транспортувати кисень. Накопичення MetHb в еритроцитах може відбуватися внаслідок придбаних або успадкованих причин. Метод визначення заснований на зчитуванні поглинання метгемоглобіну при 630 нм.

Загальний гемоглобін (Hb) крові під дією розчину поверхнево-активної речовини переходить у низкоспинову окислену форму - геміхром, інтенсивність забарвлення якого пропорційна концентрації гемоглобіну в крові і вимірюється фотометрично при довжині хвилі 540 (520-560) нм.

СКЛАД НАБОРУ

- | | |
|--|---|
| 1. Лізуючий реагент | - 1 флакон з (100 ± 2) мл; |
| 2. Трансформуючий реагент | - 2 флакони по (20 ± 1) мл або
1 флакон з (40 ± 2) мл; |
| 3. Окислювальний реагент | - 1 флакон з (20 ± 1) мл; |
| 4. Концентрат шифт-реагенту
(безбарвний прозорий розчин, злегка піниться) | - 1 флакон з (25 ± 1) мл; |
| 5. Калібрувальний розчин геміхрому
(відповідає пробі крові з концентрацією гемоглобіну А г/л)
(точне значення концентрації гемоглобіну
зазначено на ампулі з калібрувальним розчином) | - 1 ампула з (5,0 ± 0,5)мл. |

ОБЛАДНАННЯ

1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвиль **540 (520-560) нм** та **630 (620-640) нм** у діапазоні (0 - 1,0) од. оптичної щільності та довжині оптичного шляху 10 мм.
2. Таймер механічний.
3. Пробірки місткістю 10 мл (згідно з чинними нормативними документами).
4. Колба мірна місткістю 1000 мл (згідно з чинними нормативними документами).
5. Піпетки місткістю 0,1; 1; 5 та 10 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).

ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ

Цільна кров. В якості антикоагулянту використовують: ЕДТО- етилендіамінтетраоцтову кислоту, гепарин.

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

Процедура підготовки гемолізату

Відміряти у, мл	напівмікро	мікро		
Прокип'ячена дистильована вода	7,4	3,70	1,85 мл	1,48 мл
Зразок для аналізу	0,1	0,05	0,025 мл	0,02 мл
Лізуючий реагент	0,5	0,25	0,125 мл	0,10 мл

Змішайте, 2 або 3 рази перевернувши пробірку. Витримати 5 хв для повного лізису клітин.

ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ

1. **Робочий розчин.** Вміст флакону Концентрату шифт-реагенту кількісно перенести в мірну колбу місткістю 1000 мл з ~ 950 мл дистильованої води, довести об'єм дистильованою водою до мітки і ретельно

перемішати. Можливе деяке спінення розчину. Розчин стабільний при кімнатній температурі від плюс 18 °С до плюс 25 °С в темному місці протягом 6 місяців.

2. **Калібрувальний розчин геміхрому** - готовий до застосування. Після розкриття ампули розчин стабільний протягом 6 місяців, при збереженні в холодильнику від плюс 2 °С до плюс 8 °С (у закритому стані). Перед аналізом калібрувальний розчин необхідно підігріти до кімнатної температури.

3. **Лізуючий реагент, Трансформуючий реагент та Окислювальний реагент** - готові до застосування.

Розчини стабільні після першого розкриття протягом 6 місяців, при збереженні в холодильнику від плюс 2 °С до плюс 8 °С (у закритому стані).

ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБІНУ

Вимірювання проводять при довжині хвилі **540 (520-560) нм** при кімнатній температурі (від плюс 18 °С до плюс 25 °С).

Дослідна проба 1. 0,02 мл крові ретельно перемішують з 5 мл **Робочого розчину**, можливо спінення, витримують **(15 - 20) хв** і фотометрують проти **Робочого розчину** ($E_{\text{досл}}$). Забарвлення стійке протягом **4 годин**.

Калібрувальна проба. Вимірюють оптичну щільність калібрувального розчину геміхрому $E_{\text{кал}}$ проти **Робочого розчину** при довжині хвилі **540 (520-560) нм** (оптична щільність відповідає пробі крові з концентрацією гемоглобіну **A** г/л).

РОЗРАХУНОК ведуть за формулою (1):

$$C_{\text{Hb}} = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times A \text{ г/л, де} \quad (1)$$

C_{Hb} - концентрація гемоглобіну у крові, г/л;

A - концентрація загального гемоглобіну у калібрувальному розчині, г/л;

$E_{\text{досл}}$ - оптична щільність дослідної проби 1, од. опт. щільності;

$E_{\text{кал}}$ - оптична щільність калібрувальної проби, од. опт. щільності.

ВИЗНАЧЕННЯ МЕТГЕМОГЛОБІНУ

Вимірювання проводять при довжині хвилі **630 (620-640) нм** при постійній температурі (від плюс 18 °С до плюс 25 °С). **Вимірювання** при довжині хвилі **630 нм** більш точніші.

Дослідна проба 2 (напівмікро).

1. Відмірюють у кювету **3 мл** гемолізату (Див. **ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ**) та безпосередньо фотометрують проти **дистильованої води** - (E_1).

2. Додають до цієї кювети **0,1 мл Трансформуючого реагенту**. Ретельно перемішують, витримують **1 хв**. Вимірюють оптичну щільність - (E_2) проти **дистильованої води**. Забарвлення стабільне протягом **60 хв**.

Дослідна проба 3 (напівмікро).

1. Відмірюють у кювету **3 мл** того ж гемолізату (Див. **ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ**) додають до цієї кювети **0,1 мл Окислювального реагенту**, ретельно перемішують, витримують **2 хв** та фотометрують проти **дистильованої води** - (E_3).

2. Додають до цієї кювети **0,1 мл Трансформуючого реагенту**. Ретельно перемішують, витримують **1 хв**. Вимірюють оптичну щільність - (E_4) проти **дистильованої води**. Забарвлення стабільне протягом **60 хв**.

РОЗРАХУНОК ведуть за формулами (2) та (3):

$$\% \text{MetHb} = \frac{(E_1 - E_2)}{(E_3 - E_4)} \times 100 \text{ \%, де} \quad (2)$$

$$C_{\text{MetHb}} = \frac{C_{\text{Hb}} \times \% \text{MetHb}}{100} \text{ г/л, де} \quad (3)$$

- % MetHb – відносна концентрація метгемоглобіну у крові відносно загального гемоглобіну, %;
- C_{MetHb} - концентрація метгемоглобіну у крові, г/л;
- E_1 та E_2 - оптичні щільності дослідної проби 2, од. опт. щільності;
- E_3 та E_4 - оптичні щільності дослідної проби 3, од. опт. щільності.

РЕФЕРЕНТНІ ВЕЛИЧИНИ

1-2% від вмісту загального гемоглобіну ²

Новонароджені	6,22 % ⁸	3-6 місяця	1,47 % ⁸
Діти: 1-7 діб	2,93 % ⁸	1-3 років	1,13 % ⁸
8-21 діб	2,86 % ⁸	3-7 років	1,1 % ⁸
1-3 місяця	2,21 % ⁸	7-14 років	1,08 % ⁸

Метгемоглобін: у дорослих до 1% загального гемоглобіну ⁷; у дітей до року - до 1,5%. Значення, що перевищують 1,5% загального гемоглобіну, вважаються патологічними.

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

Виробник залишає за собою право вносити зміни без попереднього повідомлення. Дата останньої перевірки **16.01.2024**

ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Метгемоглобін є продуктом окислення Fe^{2+} в складі гем у до Fe^{3+} , при цьому залізо втрачає здатність зв'язувати і транспортувати кисень. В організмі людини постійно з'являються можливості для ендogenous окислення заліза гем у з утворенням **MetHb**; основною причиною окислення є сам кисень. Накопичення метгемоглобіну в організмі зазвичай не відбувається, оскільки здатність еритроцитів відновлювати окислений гем у багато разів перевищує швидкість його спонтанного окислення. Відновлення **MetHb** в **Hb** здійснюється за допомогою спеціальних систем, головним компонентом яких є цитохром b5-редуктаза (НАД - Н-метгемоглобінредуктаза) - на її частку припадає близько 70% відновленого гемоглобіну, а також аскорбінова кислота (12-16%) і глутатіон (9 -12%). Ще один шлях відновлення **MetHb** пов'язаний з ферментом НАДФ Н-метгемоглобінредуктазою, яка активується екзогенними акцепторами електронів, наприклад, рибофлавіном і метиленовим синім. На частку НАДФ Н-метгемоглобінредуктази припадає 5-6% відновленого гемоглобіну ³.

При абсолютній або відносній недостатності відновлюючих систем в еритроцитах розвиваються метгемоглобінемії - зумовлені різними факторами захворювання, при яких вміст **MetHb** в крові перевищує фізіологічну норму. Виділяють первинні (спадкові) метгемоглобінемії, пов'язані з нестачею ферментів відновлення **MetHb** або з присутністю аномальних гемоглобінів, а також вторинні (придбані, токсичні) метгемоглобінемії екзогенного і ендogenous походження. Збільшення рівня **MetHb** в крові при цих станах призводить до порушення оксигенації крові і тканин з розвитком гіпоксії і, як правило, ціанозу.

При вроджених метгемоглобінеміях венозна кров у пацієнтів має шоколадно-коричневий відтінок і не червоніє при контакті з повітрям; загальний і біохімічний аналізи крові - без великих відхилень від норми. Ціаноз шкіри і видимих слизових оболонок проявляється від народження; забарвлення шкірних покривів варіює від сіроземлистого до темно-фіолетового. Однак в легких випадках тривалість життя пацієнтів не страждає; в основному пацієнти, скоріше, «сині», ніж «хворі» ⁴. У важких випадках захворювання проявляється розлитим ціанозом, затримкою психомоторного розвитку, мікроцефалією і призводить до смерті хворих в перші роки життя.

До токсичних метгемоглобінемій ендogenous походження відноситься так званий ентерогенний ціаноз - рідкісна патологія, пов'язана з ураженням кишечника і висмоктуванням надлишково утворюючихся в ньому речовин - метгемоглобінутворювачам. Зустрічається він переважно у дітей і має багатофакторне походження: можливо, грає роль надмірна колонізація кишечника бактеріями, що виробляють нітрати та інші речовини-окислювачі, а також прискорене аутоокислення гемоглобіну в умовах ацидозу і гіперхлоремії ⁴.

Токсичні метгемоглобінемії екзогенного походження розвиваються під впливом хімічних і деяких лікарських засобів. Основними метгемоглобінутворювачі є нітросполуки (нітрити та нітрати, в тому числі нітрогліцерин, нітрофеноли, нітроанілін і ін.); аміносполуки (анілін і його похідні в складі барвників, чорнил, фарб; амінофеноли, р-амінобензойна кислота та ін.); окислювачі (хлорати, перманганати, галогеніди, хінони та ін.); деякі барвники (метиленова синь); хімічні агенти (добрива, бутіл нітрит, хлорбензол, ізобутіл нітрит, нафтален, нітрофенол, нітрат срібла, тринітротолуол, толуол, бензол, карбамати, харчові продукти і питна вода з високим вмістом нітратів); лікарські речовини (Дапсон, нітрогліцерин, нітропрусид, Фенацетин, Феназопірідин, Метоклопрамід, сульфонаміди, основний субнітрат вісмуту, фурадонін, новокаїн, бензокаїн, лідокаїн та інші місцеві анестетики, сульфаніламід, антибіотики, ПАСК, парацетамол, фенацетин - анальгетики; аспірин, фенотіазин, амлінітрит - антидот при отруєнні ціанідами та ін.) ⁵. Потрапивши в організм, ці сполуки безпосередньо окислюють Fe^{2+} в складі гемоглобіну або метаболізуються з утворенням продуктів, які володіють цією властивістю.

В основі токсичного впливу метгемоглобінутворювачів лежать різке зниження кисневої ємності крові (артеріальна гіпоксемія), зменшення артеріовенозної різниці по кисню внаслідок погіршення дисоціації оксигемоглобіну, гіпокапнія і респіраторний алкалоз.

Ступінь вираженості клінічних проявів залежить від швидкості розвитку метгемоглобінемії і компенсаторних можливостей організму, а не тільки від кількості **MetHb**. Підвищення **MetHb** до 10%-15% частіше за все не дає клінічно виражених проявів.

Однак при рівні **MetHb** в межах 10%-20% може з'являтися ціаноз слизових і шкірних покривів, виникають загальна слабкість, нездужання, ослаблення пам'яті, дратівливість, головні болі.

При вмісті **MetHb** в межах 30%-50% до вищеперелічених симптомів приєднуються болі в серці різного характеру, задишка, запаморочення, різко виражений ціаноз. Виникають занепокоєння, тахікардія, слабкість, стан оглушення; Можлива поява неврологічної симптоматики, пов'язаної з порушенням процесів десатурації і елонгації ненасичених жирних кислот в нейронах; до 55-70 % - пригнічення свідомості, ступор, судоми, кома, брадикардія, аритмії; понад 70 % - серцева недостатність і смерть. Виразність симптомів визначається дозою і швидкістю надходження токсиканту в еритроцити, швидкістю елімінації, окислювально-відновним потенціалом клітин. У важких випадках отруєння, при концентрації **MetHb** до 60-70 %, розвивається різко виражене сіро-синє (аж до синьо-чорного) забарвлення губ, носа, вушних раковин, нігтів і видимих слизових оболонок.

Кров має характерний шоколадний відтінок; характерним є утворення в еритроцитах тілець Гейнца - продуктів денатурації гемоглобіну. При токсичній метгемоглобінемії оксигенотерапія не призводить до усунення ціанозу. Більш того, призначення кисню може супроводжуватися підвищенням рівня метгемоглобіну в крові.

Виробник залишає за собою право вносити зміни без попереднього повідомлення. Дата останньої перевірки 16.01.2024

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

КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Достовірність одержуваних результатів контролюють за допомогою контрольних розчинів гемоглобіну, атестованих даним методом.

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. Метгемоглобін в крові утворюється в перші години після смерті, причому в різних органах по-різному. Швидше він утворюється і досягає максимальних величин в печінці і легенях, повільніше-у лівому шлуночку серця і дуже повільно - в поздовжньому синусі твердої мозкової оболонки. Судово-медичне значення отриманих даних полягає в тому, що спонтанне утворення метгемоглобіну в крові, особливо в пізні терміни розкриття, може імітувати отруєння метгемоглобінутворючими отрутами, а спостережувані процеси редукції і розпаду його при смерті від дії цих отрут завжди потрібно враховувати при дослідженні крові. Кров з трупів на вміст метгемоглобіну рекомендується брати з поздовжнього синуса твердої мозкової оболонки ⁶.

2. Розраховано при витраті розчинів реагентів 1,5 мл (мікро-), 3,0 мл (напівмікро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:

Дистильована вода : Зразок для аналізу : Лізуючий реагент = 74 : 1 : 5

Трансформуючий реагент (Окислювальний реагент) : Гемолізат = 1 : 30

3. Розраховано при витраті розчину реагенту: 2,5 мл (напівмікро-), 5,0 мл (макро-). Витрату реактивів можна масштабувати, відповідно до аспіраційного об'єму кювети аналізатора, виходячи з постійного співвідношення:

Робочий розчин : Зразок для аналізу = 250 : 1

ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
2. Розчини, які входять в набір, отруйні !!! При потраплянні робочих розчинів або реакційних сумішей на поверхню шкіри або слизові оболонки, їх необхідно змити великою кількістю води. Постраждалому має бути надана кваліфікована медична допомога.
3. Забороняється змішувати робочі розчини з кислотами - виділяються летючі кислоти (отруйні речовини).

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, 17-18
2. К.В. Фаткуллин, А.Ж. Гильманов, Д.В. Костюков. Клиническое значение и современные методологические аспекты определения уровня карбокси- и метгемоглобина в крови. - Практическая Медицина. 2014, '3(79), 17-21
3. Герман С.В. Метгемоглобинемии: особенности патогенеза и клиники // Клиническая медицина. — 1999. — Т. 77, № 4. — С. 9-12.
4. Казанец Е.Г. Метгемоглобинемии // Дет. больница. — 2009. — № 1. — С. 38-42.
5. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина (этиология, патогенез, спектрофотометрические и биохимические методы исследования, диагностика, лечение). Л.:Медицина, 1968,с 18-21.
6. Черкавский Н.Б. К вопросу об образовании метгемоглобина в крови трупа // Судебно-медицинская экспертиза. — М., 1964 — №4. — С. 3-8.
7. Лифшиц В.М., Сидельникова В.И. - Биохимические анализы в клинике. Справочник 2-е изд., - Москва, 2001, «Медицинское информационное агенство», с.31.
8. 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 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: filicit@ukr.net **http://www.felicit.com.ua**