



## Інструкція

з використання набору реагентів для визначення  
кількості заліза та загальної залізовв'язуючої здатності  
сироватки та плазми крові

### ЗАЛІЗО-3333 СпЛ

IN VITRO

Зберігати при 2-8°C

Набір розрахований на 25 визначень концентрації заліза або 25 визначень 3333 з урахуванням холостих та калібрувальних проб при витраті робочого розчину відповідно цієї методики.

#### Клінічне значення

Залізо є компонентом великої кількості ферментів, а також міоглобіну, м'язового білку та печінки. Залізо необхідне для виробництва гемоглобіну. Загальна залізовв'язуюча здатність (3333) - це кількість заліза, яке може бути пов'язане через трансферин до повного його насичення. Діапазон можливих порушень широкий і включає анемії, нефроз, цироз печінки та гепатит. Обидва показники, рівень заліза та 3333 крові, взаємопов'язані та важливі для правильної постановки діагнозу.

Зниження заліза сироватки відбувається при залізодефіцитній анемії, ахілічній анемії, уремії, гнійних та септичних захворюваннях та інтоксикації, інфаркті міокарду.

Високий вміст заліза спостерігається при первинному гемохроматозі, захворюваннях печінки (хронічному гепатиті, цирозі), анеміях (більшість гемолітичних, сідероахрестинних), при усіх формах жовтільниці, при збільшенні синтезу трансферина.

Клінічний діагноз не повинен базуватися на одному показникові, необхідно враховувати клінічні та інші лабораторні дані.

#### Склад набору

1. **Реагент 1.** Буфер: ацетат рН 4.9 - 100 ммоль/л.
2. **Реагент 2.** Відновник: аскорбінова кислота - 99.7%.
3. **Реагент 3.** Ферозин – 40 ммоль/л.
4. **Стандарт.** Водний розчин заліза – 18 мкмоль/л.
5. **Реагент 4.** Насичуючий розчин. Розчин заліза – 5 мг/л.
6. **Реагент 5.** Осаджувач – карбонат магнію.
7. Інструкція з використання.
8. Паспорт.
9. Ложка.

#### Аналітичні характеристики

1. Лінійність вимірювального діапазону: 0.4 - 180 мкмоль/л.  
Відхилення від лінійності не перевищує 5 %. Якщо отримані результати були більше, ніж межі лінійності, розведіть зразки 1:1 (в два рази) NaCl 9 г/л та помножте результат на два.
3. Чутливість не менш 0.4 мкмоль/л.
4. Коефіцієнт варіації результатів визначень – не більш 5 %.

#### Перелік необхідного устаткування

- Спектрофотометричне або колориметричне обладнання з довжиною хвилі 562 нм.
- Відповідні кювети з товщиною оптичного шару 1 см.
- Центрифуга.
- Загальне лабораторне обладнання.

**Прим:** Адаптації до напівавтоматичних і автоматичних приладів надаються за запитом.

#### Матеріал для дослідження

Сироватка або гепаринізована плазма крові. Досліджувані сироватки або плазми повинні бути ретельно відокремлені від формених елементів крові не пізніше, ніж через 1 годину після взяття крові. Уникайте використання мутних, ліпідних та гемолітичних зразків. Стабільність зразка: Залізо стабільне 7 днів при 2-8°C.

## Визначення концентрації ЗАЛІЗА

### Принцип методу

У кислому середовищі залізо дисоціює на комплекс трансферина з залізом. Звільнене залізо відновлюється до двовалентного під дією аскорбінової кислоти. Іони заліза  $Fe^{2+}$  з ферозином утворюють кольоровий комплекс.

Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації заліза в зразку.

### Підготовка реагентів

Перед використанням набір витримати при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

Приготування робочого реагенту **РР**: розчиніть вміст одного флакону **Р2** (відновник) в одному флаконі **Р1** (буфер). Закрийте флакон і обережно перемішайте вміст.

**Залиште не менш ніж на 30 хв. До використання.**

**РР** стабільний 3 місяці при 2-8°C або 1 місяць при 15-25°C.

### Проведення аналізу

1. Умови вимірювання:

довжина хвилі 562 нм (530-590 нм)

кювета з товщиною оптичного шару 1 см

температура 37°C/ 15-25°C

2. Налаштувати прилад на нуль відносно дистильованої води.

3. Наповнення кювети: компоненти реакційної суміші відібрати та вносити в об'ємах, вказаних в таблиці.

	Холостий зразок	Стандартний зразок	Холостий дослідний зразок	Дослідний зразок
РР, мл	1.0	1.0	1.0	1.0
РЗ, мкл	-	50	-	50
Дист. Вода, мкл	200	-	-	-
Стандарт, мкл	-	200	-	-
Зразок, мкл	-	-	200	200

**Прим.** Об'єми реагентів, стандарту та зразку можуть бути пропорційно змінені відповідно до робочого об'єму кювети використовуваного аналізатора

4. Перемішати, інкубувати протягом 5 хв. При 37° С або 10 хв. при кімнатній температурі.

5. Виміряти оптичну щільність (E) дослідного зразка, холостого дослідного і стандартного зразків проти холостого зразка.

Забарвлення стабільне протягом 30 хв.

### Розрахунок результатів

$$C_{\text{дос}} = \frac{E_{\text{дос}} - E_{\text{хол.дос}}}{E_{\text{ст}}} \times C_{\text{ст}}$$

де:  $C_{\text{дос}}$  - вміст заліза в дослідному зразку, мкмоль/л.

$E_{\text{дос}}$  - оптична щільність дослідного зразка, одиниць оптичної щільності.

$E_{\text{хол.дос}}$  - оптична щільність холостого дослідного зразка, одиниць оптичної щільності.

$E_{\text{ст}}$  - оптична щільність стандартного зразка, одиниць оптичної щільності.

$C_{\text{ст}}$  - вміст заліза в стандарті, 18 мкмоль/л.

## Визначення ЗАГАЛЬНОЇ ЗАЛІЗОЗВ'ЯЗУЮЧОЇ ЗДАТНОСТІ

### Принцип методу

Сироватку насичують іонами тривалентного заліза ( $Fe^{3+}$ ). Надлишок іонів заліза адсорбують на карбонаті магнію і видаляють центрифугуванням. В супернатанті визначають зміст заліза зв'язаного з сироваткою.

### Підготовка реагентів

Перед використанням набір витримати при кімнатній температурі протягом 30 хвилин.

Всі реагенти готові до використання.

## Проведення аналізу

### 1. Внести до пробірки:

Зразок, мл	0.5
P4, мл	1.0
Перемішати та інкубувати 10 хв. При кімнатній температурі	
P5, ложка	3

2. Перемішати та інкубувати 10 хв. При кімнатній температурі.
3. Центрифугувати 15 хв. При 3000 оборотів в хвилину.
4. Обережно зібрати супернатант та виміряти концентрацію заліза

### Розрахунок результатів

Загальну залізов'язуючу здатність сироватки крові визначити по формулі:

$$3333 = C_{\text{заліза супернатант}} \times 3$$

Ненасичену залізов'язуючу здатність сироватки визначити по формулі:

$$H333 = 3333 - C_{\text{заліза сироватки}}$$

Насищення трансферину визначити по формулі:

$$HT = \frac{C_{\text{заліза сироватки}}}{3333} \times 100 \%$$

де: 3333 – загальна залізов'язуюча здатність сироватки крові, мкмоль/л;

C заліза супернатант – вміст заліза в супернатанті, мкмоль/л;

3.0 – коефіцієнт розведення сироватки;

H333 – ненасичена залізов'язуюча здатність сироватки, мкмоль/л;

C заліза сироватки - вміст заліза в сироватці, мкмоль/л;

HT - насичення трансферину, %

### Референтні величини

Грунтуючись на результатах досліджень, проведених лабораторіями, рекомендуємо користуватися нормами, приведеними нижче. Разом з тим, відповідно до правил GLP (Гарної лабораторної практики), кожна лабораторія повинна сама визначити для себе параметри норми, характерні для обстежуваної популяції.

Нормальні рівні в сироватці або плазмі крові становлять:

Заліза чоловіки 11.6 – 31.3 мкмоль/л = 0.65 – 1.75 мг/л

жінки 7.16 – 26.85 мкмоль/л = 0.4 – 1.5 мг/л

3333 36-72 мкмоль/л = 2-4 мг/л

H333 32-46 мкмоль/л = 1.77-2.56 мг/л

Коефіцієнт перерахунку: мг/л x 17.9 = мкмоль/л.

HT чоловіки 20-50 %

жінки 15-50 %

### Відтворюваність:

#### ЗАЛІЗО

Значення, мкг/дл	Внутрисерійна (n=20)		Міжсерійна (n=20)	
	151	177	149	181
SD	1,62	1,79	6,98	9,62
CV, %	0,46	0,42	1,73	1,58

#### 3333

Значення, мкг/дл	Внутрисерійна (n=20)		Міжсерійна (n=20)	
	371	406	359	565
SD	1,79	1,82	7,16	9,46
CV, %	0,49	0,45	1,99	1,67

### Порівняння методів

Точність: результати отримані при використанні реагентів СпайнЛаб (y), при порівнянні з іншими комерційними реагентами (x) систематичних відхилень не виявлено.

Порівняння було проведено на 50 зразках.

Результати:

ЗАЛІЗО

Коефіцієнт кореляції ( $r$ )<sup>2</sup>: 0,89

Рівняння регресії:  $y=0,9816x - 12,80$

3333

Коефіцієнт кореляції ( $r$ )<sup>2</sup>: 0,93

Рівняння регресії:  $y=0,9614x - 14,20$

Результати характеристик точності залежать від аналізатору, що використовується.

### Специфічність

Гемоліз призводить до завищених результатів.

### Контроль якості

Контроль якості рекомендується здійснювати, використовуючи наступний контрольний матеріал: «СпЛ Контроль НОРМА» («Лабораторія Гранум», Україна); «КОНТРОЛЬ НОРМА людська сироватка», «КОНТРОЛЬ ПАТОЛОГІЯ людська сироватка» (Spinreact, S.A. Іспанія) «SPINTROL «Н» Cal» (Іспанія), «ERBA NORM, PATH» (Чехія). Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте апаратуру, реактиви та можливі технічні проблеми. Кожна лабораторія повинна встановити свої власні схеми контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

### Зберігання та стабільність

Усі компоненти набору стабільні до закінчення терміну придатності, зазначеного на етикетці, якщо зберігати його щільно закритим при 2-8°C, в захищеному від світла місці та запобігати забруднення під час його використання.

Не використовувати реактиви після закінчення терміну придатності (12 міс.).

### Транспортування

Набори транспортують всіма видами закритого транспорту при температурі до 25°C.

Допускається транспортування при середньодобовій температурі 37°C не більше 72 годин.

### Ознаки погіршення реагентів

- Присутність осаду і помутніння.
- ОЩ холостого зразка при 562 нм  $\geq 0.02$ .

### Примітки

1. Залізо Стандарт. Працюйте обережно з цим реактивом, оскільки за своєю природою він легко може забруднитися.
2. Рекомендовано використовувати одноразові витратні матеріали. Якщо ви працюєте зі скляним посудом, то його потрібно витримати протягом 6 год в слабкому розчині HCl (20%), а потім ретельно промити дистильованою водою і висушити перед використанням.
3. Калібрування з водним стандартом може призвести до виникнення систематичної помилки в автоматизованих процедурах. У таких випадках, рекомендується використовувати Калібратор-сироватку.
4. Метод вимагає високої чистоти дослідів.