

КОД 13044 1 x 50 мл
Хранить при 2-8°C
Реактив для измерения концентрации гемоглобина А1с. Только для определения <i>in vitro</i> в условиях клинической лаборатории.

HEMOGLOBIN A1C-TURBI
(HbA1C-TURBI)



ГЕМОГЛОБИН А1С
Турбидиметрия

ПРИНЦИП МЕТОДА

После приготовления гемолизата с использованием Тетрадецилтриметиламмония бромид (ТТАВ) в качестве детергента, концентрация гемоглобина А1с (HbA1c) может быть измерена количественно турбидиметрическим методом иммуноингибции. На первом этапе реакции образец, добавленный к реагенту с антителами против специфических сайтов HbA1c формирует растворимые комплексы путем связи двух молекул. На втором этапе, при добавлении в реакционную смесь второго реагента, образующего полиаггентами, в присутствии избытка антител против HbA1c, образуются нерастворимые комплексы антитело-полиаггента, которые могут быть определены турбидиметрически. Расчет процентного содержания HbA1c делается после измерения концентрации общего гемоглобина спектрофотометрически¹.

СОСТАВ

- А. Реагент: 2 x 95 мл. ТТАВ 9 г/л.
 В. Реагент: 1 x 40 мл. Фосфатный буфер 20 ммоль/л, pH 7.4.
 С. Реагент: 1 x 40 мл. Буфер MES 25 ммоль/л, буфер TRIS 15 ммоль/л, антитела козы против HbA1c, pH 6.2.
 D. Реагент: 1 x 10 мл. Буфер MES 25 ммоль/л, буфер TRIS 15 ммоль/л, полиантисен HbA1c ≥ 8 μг/мл, pH 6.2.

Использовать только реагенты В, С и D, помеченные одним и тем же номером партии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ РЕАГЕНТЫ

- S. Стандарт HbA1c (BioSystems Cod. 13045): Кровь человека и овечья кровь, ТТАВ 80 г/л. Концентрация HbA1c и гемоглобина указана на этикетке ампулы. Значение концентрации HbA1c совпадает со стандартным методом, сертифицированным Международной федерацией по клинической химии (IFCC)².

Кровь человека, используемая для стандарта, показала отрицательный результат при тестировании на антитела к вирусу гепатита С и на антитела к ВИЧ. Тем не менее, со стандартами следует обращаться как с потенциально инфицированными.

Раздражающее вещество (X1): R36/38: Раздражает глаза и кожу. S24/25: Избегать попадания на кожу и глаза.

Развести лиофилизат 2,00 мл дистиллированной воды. Стабилен в течение 8 ч при 15-25°C, 2 дня при 2-8°C и 3 месяца при -20°C. Можно замораживать только один раз.

Калибровочная кривая: Разбавить стандарт с помощью физраствора 9 г/л в качестве разбавителя. Умножить концентрацию стандарта HbA1c на соответствующий коэффициент, указанный в таблице, чтобы получить концентрацию HbA1c разбавленного раствора.

РАЗБАВЛЕННЫЙ Р-Р	1	2	3	4	5
Стандарт HbA1c (мкл)	30	60	120	180	240
Физраствор (мкл)	210	180	120	60	—
Коэффициент	0.125	0.25	0.5	0.75	1.0

ХРАНИЕНИЕ

Хранить при 2-8°C.

Реагенты и стандарт стабильны до срока годности, указанного на этикетке. Хранить плотно закрытыми, избегать контаминации при использовании.

Признаки порчи:

- Реагент А: Присутствие взвешенных частиц, помутнение.
- Реагент В: Абсорбция бланка общего гемоглобина выше 0.035 - 560 нм.
- Реагент С и D: Абсорбция бланка гемоглобина HbA1c ниже 0.850 - 340 нм.

Открытые реактивы стабильны в течение 2 месяца при хранении в холодильнике анализатора.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

Реагенты (А), (В), (С) и (D) готовы к использованию.

ОБРАЗЦЫ

Капиллярная или венозная кровь, собранная по стандартной процедуре. В качестве антикоагулянта использовать гепарин или ЭДТА.

Стабильность HbA1c в крови составляет 3 дня при 15-20°C, 7 дней при 2-8°C и 6 месяцев при -20°C. Замораживать однократно!

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для оценки степени насыщения глюкозой крови при контроле у пациентов с диабетом^{3,4} и в референсной популяции (без диабета) Научно-Исследовательской Группой по Контролю за Диабетом (DCCT) были установлены и согласованы со многими государствами следующие граничные значения:

NGSP-DCCT %	IFCC (ммоль/моль)	Нормальные значения / Уровень контроля
4.0 - 6.5	20 - 48	Нет диабета
6.0 - 7.0	42 - 53	Риск возникновения
7.0 - 8.0	53 - 64	Необходим контроль
> 8.0	> 64	Необходимо лечение

КАЛИБРОВКА

Гемоглобин:

- Бланк: Подготовить бланк реагента с помощью физраствора 9 г/л.

- Калибратор: Разбавленный раствор 5 стандарта HbA1c.

HbA1c:

- Бланк: Подготовить бланк реагента с помощью физраствора 9 г/л.

- Калибровочная кривая: Графически представить значения абсорбции каждого калибратора по отношению к соответствующим концентрациям HbA1c. Использовать бланк в качестве калибратора концентрации 0. Концентрация HbA1c образца рассчитывается путем интерполяции абсорбции на калибровочную кривую.

Рекомендуется производить измерение бланка ежедневно, а калибровку не реже одного раза каждые 2 месяца, после замены набора реактивов и если того требует процесс контроля качества.

ПРОЦЕДУРА

Приготовление гемолизата.

Калибраторы не требуют предварительной обработки.

1. Выдержать реагент А при комнатной температуре
2. Внести в пробирки:

Кровь	10 мкл
Реагент А	1000 мкл

3. Тщательно перемешать, избегая образования пены. Гемолизат готов к использованию, как только раствор поменяет окраску с красной на коричнево-зеленую (около 3 мин).

Гемолизат стабилен 4 часа при 15-20°C и 6 месяцев при -20°C.

Параметры исследования (примечание 1)

Реагент 1: Реагент В.

		A25	A15
ОБЩИЕ	Название	Нв свыше	Нв свыше
	Способ измерения	монор. кон. точка	монор. кон. точка
	Тип пробы	WBL	WBL
	Единицы	ммоль/л	ммоль/л
	Тип реакции	нарастающая	нарастающая
	Турбидиметрический тест	нет	нет
ПРОЦЕДУРА	Десятичные знаки	3	3
	Кол-во повторов	1	1
	Название теста в отчете для пациента	-	-
	Считывание	бихром.	бихром.
	Проба	30	30
	Реагент 1	170	170
Фильтры	Реагент 2	-	-
	Промывка	1.2	1.2
	Фактор предразведения	-	-
	Фактор постразведения	1.2	1.2
	Основной	560	560
	Референсный	670	670
Время	Считывание 1	300 s	312 s
	Считывание 2	-	-
КАЛИБРОВКА	Реагент 2	-	-
	Тип калибратора	специфический	специфический
	Кол-во калибраторов	1	1
	Повтор калибратора	3	3
	Повтор бланка	3	3
ОПЦИ	Калибровочная кривая	-	-
	Образец с соляным раствором	да	да
	Предел абс. бланка	-	-
	Предел бланка кинетики	-	-
	Предел линейности	-	-

Реагент 1: Reactivo C; Реагент 2: Reactivo D.

		A25	A15
ОБЩИЕ	Название	НвА1с	НвА1с
	Способ измерения	биреаг. диффер. WBL	биреаг. диффер. WBL
	Тип пробы	ммоль/л	ммоль/л
	Единицы	нарастающая	нарастающая
	Тип реакции	да	да
	Турбидиметрический тест	3	3
ПРОЦЕДУРА	Десятичные знаки	1	1
	Кол-во повторов	-	-
	Название теста в отчете для пациента	-	-
	Считывание	монохр.	монохр.
	Проба	8	8
	Реагент 1	200	200
Время	Реагент 2	40	40
	Промывка	1.2	1.2

Фильтры	Фактор предразведения	-	-
	Фактор постразведения	2	2
Время	Основной	340	340
	Референсный	-	-
	Считывание 1	180 s	168 s
	Считывание 2	480 s	480 s
КАЛИБРОВКА	Реагент 2	195 s	192 s
	Тип калибратора	специфический	специфический
	Кол-во калибраторов	5	5
	Повтор калибратора	3	3
	Повтор бланка	3	3
Калибровочная кривая	уменьшающаяся полигональная	уменьшающаяся полигональная	
ОПЦИ	Образец с соляным раствором	да	да
	Предел абс. бланка	-	-
	Предел бланка кинетики	-	-
	Предел линейности	-	-

РАСЧЕТЫ

Концентрация HbA_{1c} в образце рассчитывается по следующей формуле. Полученные значения совпадают со стандартным методом, описанным IFCC:

$$\text{HbA}_{1c} - \text{IFCC (ммоль/моль)} = \frac{\text{HbA}_{1c} (\text{ммоль/л})}{\text{Hb} (\text{ммоль/л})} \times 1000$$

Значения, совпадающие со стандартным методом, описанным в Национальной программе по стандартизации исследований гликозилированного гемоглобина (NGSP), были получены по следующей формуле⁵:

$$\text{HbA}_{1c} - \text{NGSP-DCCT (\%)} = 0.0915 \times \text{HbA}_{1c} - \text{IFCC (ммоль/моль)} + 2.15$$

Исследование рассчитано для измерения HbA_{1c} в ммоль/моль (IFCC) и в % (DCCT/NGSP). Не использовать для измерения содержания общего гемоглобина или HbA_{1c}.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для проведения контроля качества теста и процедуры исследования рекомендуется использовать Контроль HbA_{1c} нормальный (код 18001) и повышенный (код 18002).

Каждая лаборатория должна выработать собственную схему внутреннего контроля качества и процедуры для коррекции действий в случае, если контроль качества не укладывается в приемлемые диапазоны.

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Следующие данные были получены с помощью анализатора A25. Результаты сходны с результатами измерений, произведенных с помощью A15. Подробная информация об испытании высылается по запросу.

– Предел детекции:

Hb: 0.48 ммоль/л.
HbA_{1c}: 0.06 ммоль/л.

– Диапазон измерений:

Hb: 0.48-24.8 ммоль/л.

HbA_{1c}: (приблизительное значение в зависимости от более высокой концентрации калибратора): 0.06-1.61 ммоль/л. Для более высоких значений развести образец в пропорции 1/2 реагентом А и повторить измерение Hb и HbA_{1c}. Полученный результат в процентах можно использовать без конверсии.

– Воспроизводимость (внутрисерийная):

Средняя концентрация HbA _{1c} -IFCC	CV	n
39 ммоль/л	1.2 %	20
77 ммоль/л	1.0 %	20

Средняя концентрация HbA _{1c} -NGSP	CV	n
5.7 %	0.8 %	20
9.2 %	0.8 %	20

– Воспроизводимость (межсерийная):

Средняя концентрация HbA _{1c} -IFCC	CV	n
39 ммоль/л	3.7 %	25
77 ммоль/л	2.5 %	25

Средняя концентрация HbA _{1c} -NGSP	CV	n
5.7 %	2.3 %	25
9.2 %	1.9 %	25

– Достоверность: Результаты, полученные с данными реагентами не показывали систематических отличий при сравнении с референсным методом, описанным IFCC и сертифицированным методом NGSP. Детали исследования доступны по запросу.

– Интерференция: Липемические образцы (триглицериды 6 г/л), Ревматоидный фактор (до 750 МЕ/мл) и билирубин (60 мг/дл) не влияют на результаты. Некоторые вещества и лекарства могут искажать результат⁶.

Не существует перекрестного реагирования с HbA₀, HbA_{1s}, HbA_{1b}, ацетилованный гемоглобин, карбамилгемоглобин, гликозированный альбумин, лабильный HbA_{1c} и HbA_{1d} были протестированы на интерференцию с антителами к HbA_{1c}, входящими в наборы. Варианты гемоглобинов HbS и HbC не оказывают влияния на результат. Очень высокие концентрации HbF могут обуславливать низкие значения HbA_{1c}^{7,8}.

При гемолитической анемии, железодефицитной анемии и переливании крови, средний возраст жизни эритроцита изменяется. Данный факт должен учитываться при интерпретации результатов HbA_{1c} у пациентов с соответствующим диагнозом.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Гемоглобин A_{1c} представляет собой продукт необратимой конденсации глюкозы с N-концевым остатком β-цепи гемоглобина А.

Концентрация HbA_{1c} в крови прямо пропорциональна средней концентрации глюкозы в течение 6-8 недель, что соответствует средней жизни эритроцитов², и предполагаемое среднее значение глюкозы (eAG) может быть рассчитано по следующим формулам⁹:

$$\text{eAG (мг/дл)} = 28.7 \times \text{HbA}_{1c} - \text{NGSP-DCCT (\%)} - 46.7$$

$$\text{eAG (ммоль/л)} = 1.59 \times \text{HbA}_{1c} - \text{NGSP-DCCT (\%)} - 2.59$$

$$\text{eAG (мг/дл)} = 2.64 \times \text{HbA}_{1c} - \text{IFCC (ммоль/моль)} + 15.0$$

$$\text{eAG (ммоль/л)} = 0.146 \times \text{HbA}_{1c} - \text{IFCC (ммоль/моль)} + 0.843$$

Определение уровня HbA_{1c} является ценным дополнением к определению глюкозы в крови при оценке контроля гликемии для наблюдения за больными диабетом, что дает более достоверную информацию, чем концентрация глюкозы. Существуют исследования, которые указывают, что количество осложнений, связанных с диабетом, может быть снижено вследствие строгого контроля содержания глюкозы в крови. Измерение концентрации HbA_{1c} также может служить в диагностике диабета¹⁰.

Клинический диагноз не должен быть поставлен только на основании одного теста и должен включать клинические и лабораторные данные.

ПРИМЕЧАНИЕ

1. Для избежания возможных интерференций с другими методиками лучше проводить определение общего гемоглобина и HbA_{1c} в отдельной рабочей сессии.

БИБЛИОГРАФИЯ

- Karl J et al. Development and standardization of a new immunoturbidimetric HbA_{1c} assay. *Klin Lab* 1993;39:991-996.
- Jeppson JO, Kodold U, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umamoto M, Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
- Hoelzel W et al. IFCC reference systems for measurement of hemoglobin A_{1c} in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004;50:166-174
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACCC Press, 2000.
- Bry L, Chen P, Sacks D. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;41:153-163.
- Roberts WL, De BK, Brown D, Hanbury MC, Hoyer JD, John WG, Lambert TL, Lundell RB, Rohlfing C, Little RR. Effects of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. *Clin Chem* 2002;48:383-385.
- Nathan DM, et al. Translating the A_{1c} assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008; 31: 1473-1478.
- Nathan DM, et al. International Expert Committee report on the role of the HbA_{1c} assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes care* 2009; 32: 1327-1334.