

**ГЕМОГЛОБИН А1С**  
**Хроматография – спектрофотометрия**  
**ИОННО-ОБМЕННАЯ - ТЕМПЕРАТУРНО НЕЗАВИСИМАЯ**

КОД 11044 20 определений	КОД 11045 100 определений
Хранить при 15-30° С	
Реагенты для измерения концентрации гемоглобина А1С. Использовать только для работы «in vitro» в клинической лаборатории	

**ПРИНЦИП МЕТОДА**

После приготовления гемолизата, в котором отсутствует лабильная фракция, гемоглобины задерживаются катионнообменной смолой. После удаления промыванием фракции НвА<sub>1a+b</sub><sup>1</sup>, НвА<sub>1С</sub> элюируется и определяется количественно с помощью прямого фотометрического измерения при 415 нм.

**СОСТАВ**

	КОД 11044	КОД 11045
1. Реагент	1 x 30 мл	1 x 30 мл
2. Реагент	1 x 50 мл	1 x 240 мл
3. Реагент	1 x 450 мл	4 x 450 мл
4. Микроколонки	1 x 20	1 x 100

**НАБОРЫ**

**Реагент.** Фталат Калия 50 ммоль/л, детергент, рН 5,0, азид натрия 0,95 г/л

**Реагент.** Фосфатный буфер 30 ммоль/л, рН 6,5, азид натрия 0,95 г/л.

**Реагент.** Фосфатный буфер 72 ммоль/л, рН 6,5, азид натрия 0,95г/л.

**Микроколонки.** Содержат предварительно взвешенное количество смолы, уравновешенной фосфатным буфером 72 ммоль/л, рН 6,5, азид натрия 0,95г/л.

Использовать микроколонки (4) и реагенты 2 и 3 только одной серии.

**ХРАНЕНИЕ**

Хранить при 15-30°С

Реагенты и микроколонки стабильны до срока годности, указанного на этикетке. Хранить плотно закрытыми, предотвращая загрязнение во время пользования

**Показатели ухудшения свойств:**

- Реагент: присутствие взвешенных частиц, мутность
- Микроколонки: Отсутствие буфера, покрывающего смолу, высыхание смолы

**НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ**

- Спектрофотометр или фотометр с фильтром 415 (405 – 425 нм).

**ОБРАЗЦЫ**

Цельная кровь, собранная по стандартной процедуре. Стабильность НвА<sub>1С</sub> составляет не менее 8 дней при 2-8° С. В качестве антикоагулянта использовать гепарин или ЭДТА.

**ПРОЦЕДУРА**

**Приготовление гемолизата и удаление лабильной фракции**

1. Выдержать колонки и реагенты при комнатной температуре (21 – 26° С) (прим. 1) в течение нескольких минут.
2. Внести в пробирки:

Кровь	50 мкл
Реагент 1	200 мкл

3. Тщательно перемешать и оставить при комнатной температуре на 10-15 минут. Этот гемолизат будет использован в 6 и 11 шаге.

**Приготовление колонок (примечание 2 и 3)**

4. Снимите верхнюю крышку с колонки, а затем нижнюю.
5. Пользуясь закругленным концом пипетки, протолкните диск вниз к поверхности смолы, стараясь не давить на него. Дайте колонке полностью стечь.

**Выделение и Определение фракции НвА<sub>1С</sub>**

6. Осторожно нанесите на фильтр:

Гемолизат	50 мкл	Дайте колонке полностью стечь
-----------	--------	-------------------------------

7. Для того, чтобы на диске не оставалось пробы, внести:

Реагент 2	200 мкл	Дайте колонке полностью стечь
-----------	---------	-------------------------------

8. Нанести:

Реагент 2	2,0 мл	Дайте колонке полностью стечь
-----------	--------	-------------------------------

9. Поместить колонку над пробиркой и добавить:

Реагент 3	4,0 мл	Собрать элюат (НвА <sub>1С</sub> фракцию)
-----------	--------	---

10. Тщательно перемешать и измерить абсорбцию (А) НвА<sub>1С</sub> при 415 нм против дистиллированной воды (А<sub>НвА1С</sub>). абсорбция стабильна не менее 1 часа.

- 11.

**Определение общего гемоглобина (Нв общий)**

12. Внести в пробирку:

Реагент 3	12,0 мл
Гемолизат	50 мкл

13. Тщательно перемешать и измерить абсорбцию (А) при 415 нм против дистиллированной воды (А<sub>Нвообщий</sub>)

### РАСЧЕТ

$$\frac{A_{Hb_{A1C}} \times V_{Hb_{A1C}}}{V_{Hb_{общий}}} \times 100 = \% Hb_{A1C}$$

Общий объем Hb<sub>A1C</sub> (V Hb<sub>A1C</sub>) равен 4 мл, объем Hb<sub>общий</sub> (V Hb<sub>общий</sub>) равен 12 мл. для расчета концентрации может использоваться следующая формула:

$\frac{A_{Hb_{A1C}}}{A_{Hb_{общий}}}$	$\frac{100}{3} = \% Hb_{A1C}$
---------------------------------------	-------------------------------

Результаты полученные данным методом могут быть пересчитаны в соответствии с методом, сертифицированным Программой Стандартизации Гликозилированного гемоглобина США (NGSP) или стандартизированным методом Международной Федерации Клинической Химии (IFCC) по следующим формулам:

$$\% Hb_{A1C-NGSP} = 0.86 \times \% Hb_{A1C-BioSystems} + 0.24$$

$$\% Hb_{A1C-IFCC} = 0.94 \times \% Hb_{A1C-BioSystems} - 2.09$$

### НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для оценки степени насыщения глюкозой крови при контроле у пациентов с диабетом<sup>2,3</sup> Научно-Исследовательской Группой по Контролю за Диабетом (DCCT) были установлены и согласованы со многими государствами следующие граничные значения:

DCCT/NGSP	IFCC	BioSystems	Степень контроля
4.0 – 6.0	2.0 – 4.2	4.4 – 6.7	Нет диабета
6.0 – 6.5	4.2 – 4.8	6.7 – 7.3	Эффективное лечение (цель)
6.5 – 8.0	4.8 – 6.4	7,3 – 9.1	Удовлетворительно
более 8.0	более 6.4	более 9.1	Необходима коррекция

### КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для проведения контроля качества теста и процедуры исследования рекомендуется использовать Контроль Hb<sub>A1C</sub> 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

- Сходимость (внутри серии):

Средняя концентрация	CV	n
7,2%	5,4%	25
9,9%	6,3%	25

- Воспроизводимость (между сериями):

Средняя концентрация	CV	n
7,2%	7,3%	25
9,9%	5,9%	25

- Достоверность: При сравнении с сертифицированным методом NGSP была получена следующая корреляция:

$$(\% Hb_{A1C-BioSystems}) = 1.17 \times (\% Hb_{A1C-Certified}) - 0.28$$

Детали исследования доступны по запросу.

- Интерференция: Липемические образцы (триглицериды 10 г/л) и билирубин (20 мг/дл) не влияют на результаты. Некоторые вещества и лекарства могут исказить результат<sup>4</sup>.

Методы ионообменной хроматографии в присутствии патологических форма гемоглобина C и S в образце могут изменять свои результаты, но эти различия не будут клинически значимы<sup>5</sup>. Другие варианты патологических гемоглобинов, такие как HbE, HbF, карбамил-Hb и ацетил-Hb могут оказывать влияние на результат<sup>5,6</sup>. Инкубация с реагентом (1) устраняет влияние лабильных форм HbA1C.

При гемолитической анемии, железодефицитной анемии и переливании крови, средний возраст жизни эритроцита изменяется. Данный факт должен учитываться при интерпретации результатов HbA1C у пациентов с соответствующим диагнозом.

### ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Hb<sub>A1C</sub> является продуктом необратимого связывания глюкозы с N-концом остатка β-цепи HbA.

Концентрация Hb<sub>A1C</sub> прямо пропорциональна средней концентрации глюкозы крови (MBG), как показано ниже, для длительного периода времени (6 – 8 недель)<sup>2</sup>.

$$MBG \text{ (мг/дл)} = 31,7 \times \% Hb_{A1C} - 66,1$$

$$MBG \text{ (ммоль/л)} = 1,76 \times \% Hb_{A1C} - 3,67$$

Определение уровня Hb<sub>A1C</sub> является дополнительным к определению общей глюкозы крови тестом для оценки контроля гликемии при индивидуальном мониторинге сахарного диабета. Однако, он не может служить непосредственным тестом для диагностики диабета<sup>2,3</sup>. Клинический диагноз не должен основываться на результатах отдельного теста, он должен согласовываться с результатами клинических и лабораторных данных.

### ПРИМЕЧАНИЕ

1. Получаемые результаты не зависят от температуры, если при работе соблюдается рекомендуемый температурный режим (21 – 26° C). Если рабочая температура выходит за рамки рекомендуемого диапазона, полученные значения необходимо умножить на соответствующий фактор, который показан ниже:

Рабочая температура	Фактор
18 – 20° C	1,15
27 – 30° C	0,90

2. Длительное хранение колонок ведет к чрезмерному уплотнению смолы, уменьшающему скорость протекания и удлиняющему время элюции. Для восстановления скорости элюции рекомендуется – за 10 минут до начала работы –

перевернуть колонку для ресуспендирования смолы и затем поставить ее в вертикальное положение для осаждения смолы в течение нескольких минут.

3. Иногда внутри смолы могут появляться пузыри воздуха. Их присутствие не влияет на результаты теста.

#### **БИБЛИОГРАФИЯ**

1. Bisse E, Abracham EC. J Chromatog 1985; 344: 81-91
2. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3<sup>rd</sup> ed. Saunders Co, 1999
3. 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
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4<sup>th</sup> ed. AACC Press, 1995
5. Roberts WL et al. effect of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. Clin Chem 2002; 48: 383-385
6. Bry L, Chen PC, sacks DB, Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 2001; 47: 153-163.