

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_{1a+b}¹, НвА_{1С} 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.

ХРАНИЕНИЕ

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_{1С} 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_{1С}

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 _{1С} фракцию)
-----------	--------	---

10. Тщательно перемешать и измерить абсорбцию (А) НвА_{1С} при 415 нм против дистиллированной воды (А_{НвА1С}). 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_{Нвообщий})

РАСЧЕТ

$$\frac{A \text{ Hb}_{A1C} \times V \text{ Hb}_{A1C}}{V \text{ Hb}_{\text{общий}}} \times 100 = \% \text{ Hb}_{A1C}$$

Общий объем Hb_{A1C} (V Hb_{A1C}) равен 4 мл, объем Hb_{общий} (V Hb_{общий}) равен 12 мл. для расчета концентрации может использоваться следующая формула:

$\frac{A \text{ Hb}_{A1C}}{A \text{ Hb}_{\text{общий}}}$	$\frac{100}{3} = \% \text{ Hb}_{A1C}$
--	---------------------------------------

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:

$$\% \text{ Hb}_{A1C}\text{-NGSP} = 0.86 \times \% \text{ Hb}_{A1C}\text{-BioSystems} + 0.24$$

$$\% \text{ Hb}_{A1C}\text{-IFCC} = 0.94 \times \% \text{ Hb}_{A1C}\text{-BioSystems} - 2.09$$

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для оценки степени насыщения глюкозой крови при контроле у пациентов с диабетом^{2,3} 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_{A1C} 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:

$$(\% \text{ Hb}_{A1C}\text{-BioSystems}) = 1.17 \times (\% \text{ Hb}_{A1C}\text{-Certified}) - 0.28$$

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 результат⁴.

Методы ионообменной хроматографии в присутствии патологических форма гемоглобина C и S в образце могут изменять свои результаты, но эти различия не будут клинически значимы⁵. Другие варианты патологических гемоглобинов, такие как HbE, HbF, карбамил-Hb и ацетил-Hb могут оказывать влияние на результат^{5,6}. 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_{A1C} является продуктом необратимого связывания глюкозы с N-концом остатка β-цепи HbA.

Концентрация Hb_{A1C} прямо пропорциональна средней концентрации глюкозы крови (MBG), как показано ниже, для длительного периода времени (6 – 8 недель)².

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

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

Определение уровня Hb_{A1C} 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^{2,3}. 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° С). Если рабочая температура выходит за рамки рекомендуемого диапазона, полученные значения необходимо умножить на соответствующий фактор, который показан ниже:

Рабочая температура	Фактор
18 – 20° С	1,15
27 – 30° С	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, 3rd 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, 4th 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.