

**ГЕМОГЛОБИН А2
ИОННО-ОБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ
СВОБОДНАЯ ОТ ВЛИЯНИЯ HbS**

КОД 11077 20 определений	КОД 11078 100 определений
Хранить при 15-30° С	
Реагенты для измерения концентрации гемоглобина А2. Использовать только для работы «in vitro» в клинической лаборатории	

ПРИНЦИП МЕТОДА

Образец подвергается гемолизу и гемолизат наносится на колонку с анионнообменной смолой. Гемоглобин А₂ элюируется при тщательно контролируемом рН и ионной силе. Затем HbA₂ определяется количественно с помощью прямого фотометрического измерения при 415 нм¹.

НАБОРЫ

КОД 11077 КОД 11078

1. Реагент	80 мл	400 мл
2. Микроколонки	1 x 20 мл	1 x 100 мл

СОСТАВ

1 Реагент. Биологический буфер 15 ммоль/л, детергент 0,1 г/л, рН 7,6.

Микроколонки. Содержат предварительно взвешенное количество забуференной анионно-обменной смолы.

Использовать микроколонки и реагент 1 только с одинаковым номером партии

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 HbA₂ составляет не менее 8 дней при 2-8° С. В качестве антикоагулянта использовать гепарин или ЭДТА.

ПРОЦЕДУРА

Приготовление гемолизата

1. Внести в пробирку:

Кровь	50 мкл
Дистиллированная вода	200 мкл

Тщательно перемешать. Этот гемолизат будет использован в 3 и 7 шаге.

Выделение и Измерение фракции HbA₂ (примечание 1 и 2)

2. Снять верхнюю крышку с колонки, затем нижнюю. Пользуясь закругленным концом пипетки, протолкнуть верхний диск и осторожно положить его на поверхность смолы (без давления не нее). Дайте колонке полностью стечь
3. Осторожно нанести на диск:

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

4. Для того, чтобы остатки пробы смыть с диска полностью, внести:

Реагент (1)	200 мкл	Дайте колонке полностью стечь
-------------	---------	-------------------------------

5. Поместить колонку над пробиркой (16x160 мм) и добавить:

Реагент (1)	3,0 мл	Собрать элюат (HbA ₂ – фракция)
-------------	--------	--

6. Тщательно встряхнуть и считать абсорбцию (А) фракции HbA₂ при 415 нм против дистиллированной воды (А_{HbA2}). Показатели абсорбции стабильны не менее 6 часов.

Определение общего гемоглобина

7. Внести в пробирку (16x160 мм) (примечание 3):

Дистиллированная вода	12,0 мл
Гемолизат	50 мкл

8. Тщательно перемешать и считать абсорбцию (А) при 415 нм против дистиллированной воды (А_{Hb общий})

РАСЧЕТ

$$\frac{A_{HbA2} \times V_{HbA2}}{A_{Hb\text{ общий}} \times V_{Hb\text{ общий}}} \times \frac{100}{REC} = \% HbA2$$

Где объем гемоглобина А2 (V_{HbA2}) 3 мл, объем гемоглобина общий (V_{Hbобщий}) 12 мл а средняя воспроизводимость (REC) 0,82. Получаем следующую формулу:

$$\frac{A_{\text{HbA}_2}}{A_{\text{Hb общий}}} \times 30,5 = \% \text{ HbA}_2$$

НОРМАЛЬНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Нормальные значения: 1,3 - 3,7 %

β-Талассемия: 4,0 – 10,0 %

Данные величины² ориентировочны, каждая лаборатория должна устанавливать свои диапазоны нормальных значений.

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

Для проведения контроля качества теста и процедуры исследования рекомендуется использовать Контроль HbA₂ нормальный (код 10000) и повышенный (код 10011).

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
2,5	4,1	25
5,3	5,2	25

- Воспроизводимость (между сериями):

Средняя концентрация	CV	n
2,5	5,7	25
5,3	5,4	25

- Достоверность: Результаты, полученные с данными реагентами не показывали значительных отличий при сравнении с результатами, полученными методом HPLC. Были получены следующие результаты:

$$y (\% \text{HbA}_2\text{-BioSystems}) = 0,950 \times (\% \text{HbA}_2\text{-HPLC}) + 0,11$$

Результаты полученные данным методом не выявляли систематической ошибки при сравнении с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC).

Детали исследования доступны по запросу.

- Интерференция: Варианты Гемоглобина S и F не влияют на результат. Липемические образцы (триглицериды 10 г/л) и билирубин (20 мг/дл) не влияют на результаты. Некоторые вещества и лекарства могут исказить результат³.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

β-Талассемия является наследственной гемоглинопатией, характеризующейся снижением продукции β-цепей. Эти цепи являются частью структуры Гемоглобина А (α₂β₂).

При β-Талассемии характерной чертой является возрастание в крови концентрации Гемоглобина А₂ (α₂δ₂), так как возрастает синтез гемоглобина без β-цепей.

В диагностике β-Талассемии лабораторные данные о возрастании концентрации уровня HbA₂ должны связываться с данными истории семьи, а также с другими лабораторными данными включающими сывороточное железо, железосвязывающую

способность, морфологию клеток красной крови, гемоглобин, гематокрит и средний объем клетки.

Клинический диагноз не должен основываться на результатах отдельного теста, он должен согласовываться с результатами клинических и лабораторных данных.

ПРИМЕЧАНИЕ

1. Длительное хранение микроколонок приводит к чрезмерному уплотнению смолы, снижению скорости потока и удлинению времени элюции. Для восстановления эффективности элюции рекомендуется перевернуть микроколону на 10 минут, затем вернуть в исходное положение и дать смоле осесть перед использованием колонки.
2. Внутри колонки могут образовываться пузыри воздуха. Их присутствие не оказывает влияния на результаты теста

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Abraham EC et al. Hemoglobin 1976-77; 1:27-44.
2. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests, 3rd ed. Saunders Co, 1999
3. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995