

Код за НК 024:2019 – 30168 REF № HP037.01 ТУ У 20.5-24607793-025:2019  
ІНСТРУКЦІЯ ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ  
ГЛІКОЛІЗОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ У КРОВІ

IVD

### ПРИЗНАЧЕННЯ

Набір застосовують для визначення концентрації гліколізованого гемоглобіну **HbA<sub>1c</sub>** у крові людини в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях і науково-дослідницькій практиці.

Набір розрахований на **140 напівмікрровизначень** гліколізованого гемоглобіну (з урахуванням холостих і калібрувальних проб) (Див. *Примітку*)

Діапазон визначаємих концентрацій - від 0 до 25,0 мкмоль фруктози/г гемоглобіну.

Коефіцієнт варіації визначення - не більше 6 %.

Зберігання набору - при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

Гарантійний термін придатності набору - 12 місяців від дня виготовлення.

Набір призначений для застосування *in vitro* тільки кваліфікованим лабораторним персоналом.

### ПРИНЦИП МЕТОДІВ

Стійка форма гліколізованого гемоглобіну **HbA<sub>1c</sub>** містить вуглеводний залишок - 1-дезоксид-1-(N-валіл)-фруктозу. При нагріванні гемолізату еритроцитів крові в кислому середовищі з **Гідролізуючим реагентом** вона частково зневоднюється, утворюючи 5-гідроксиметилфурфурол. Після осадження білків розчином трихлороцтової кислоти та послідовним центрифугуванням, 5-гідроксиметилфурфурол, що залишається в супернатанті, при нагріванні з **Кольороутворюючим реагентом** утворює забарвлені сполуки жовтого кольору. Інтенсивність забарвлення розчину пропорційна концентрації вуглеводного залишку в дослідній пробі і вимірюється фотометрично при довжині хвилі **443 нм**.

Визначенню не заважають ні лабільна форма гліколізованого гемоглобіну, ні фетальний гемоглобін.

По формулі 4 розраховується вміст гліколізованого гемоглобіну у пробі крові.

### СКЛАД НАБОРУ

1. **Гідролізуючий реагент** - 1 флакон з (50 ± 2) мл;  
- фосфорна кислота (85 ± 2) %
2. **Кольороутворюючий реагент** - 2 флакони;  
- 2-тіобарбітурова кислота (250 ± 5) мкмоль
3. **Калібрувальний розчин фруктози** - 1 флакон з (20 ± 1) мл;  
(250 ± 5) мкмоль/л
4. **Розчин трихлороцтової кислоти** (2,45 ± 0,05) моль/л - 1 флакон з (100 ± 2) мл;
5. Додаткові реактиви для визначення загального гемоглобіну, до складу набору не входять.

### ЗРАЗОК ДЛЯ АНАЛІЗУ

Цільна кров (застосовувати К ЕДТО (етилендіамінтетрацтову кислоту), гепарин). Стабільність – 48 годин при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.

**Приготування гемолізату** \*. Кров відбирають в пробірку з антикоагулянтом. **1 мл** крові, що не згорнулася, центрифугують (приблизно **10 хв** при 1000 g (1000 об/хв)), плазму зливають або відсмоктують піпеткою Пастера.

До еритроцитів додають **3 мл** фізіологічного розчину, суміш обережно перемішують скляною паличкою і центрифугують (приблизно 10 хв при 1000 g (1000 об/хв)). Надосадову рідину зливають або відсмоктують піпеткою Пастера. Повторюють 2-3 рази (центрифугують приблизно по 5 хв при 1000 g (1000 об/хв)) для найбільш повного видалення фруктози плазми крові.

Після відсмоктування надосадової рідини до осаду еритроцитів додають **3 мл** дистильованої води, суміш інтенсивно струшують, залишають стояти **10 хв** і центрифугують (приблизно **5 хв** при 1000 g (1000 об/хв)). Для подальшої роботи використовують надосадову рідину (**гемолізат**).

Гемолізат залишається стабільним 24 години при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С або **70 діб** - при температурі мінус 20 °С.

#### **\* Примітки до підготовки зразка:**

На одне визначення (в 1 повторі **з холостою пробую**) вам необхідно не менш ніж **1,5 мл** цільної крові з розрахунку отримання 4,8 мл гемолізату (4 мл гемолізату знадобиться на визначення вуглеводного залишку **з холостою пробую**, 0,02 мл - 0,1 мл – на визначення гемоглобіну). Рекомендується відбирати кров в об'ємі **3,0 мл** для повторного дослідження, при необхідності.

#### **ОБЛАДНАННЯ**

1. Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжинах хвиль **443 (430-450)** нм в діапазоні (0-1,0) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм.
2. Піпетки місткістю 0,02, 0,1 та 5 мл (ДСТУ EN ISO 835:2018).
3. Пробірки місткістю 10 мл та скляні центрифужні (згідно з чинними нормативними документами).
4. Мірна колба ємністю 100 мл (згідно з чинними нормативними документами).
5. Водяний термостат або автоматична водяна баня, які здатні підтримувати температуру (плюс 100 ± 2) °С та (плюс 37 ± 1) °С.
6. Центрифуга для пробірок (швидкість від 1000 об/хв до 3500 об/хв.).

#### **ПРИГОТУВАННЯ РОБОЧИХ РОЗЧИНІВ**

1. **Гідролізуючий реагент** готовий до застосування і стабільний до закінчення терміну придатності при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.
2. **Калібрувальний розчин фруктози** з концентрацією **250,0 мкмоль/л** готовий до роботи і стабільний до закінчення терміну придатності і не менше **14 діб** після відкриття флакону за умови збереження при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.
3. **Розчин трихлороцтової кислоти** - готовий до застосування і стабільний до закінчення терміну придатності при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С.
4. **Кольороутворюючий реактив**. Вміст одного флакону з **Кольороутворюючим реагентом** розчиняють в **80 мл** охолодженої кип'яченої дистильованої води, кількісно переносять у мірну колбу на **100 мл** та доводять до мітки охолодженою кип'яченою дистильованою водою. Розчин переносять до флакону з темного скла. Розчин стабільний до 4 тижнів при температурі від плюс 2 °С до плюс 8 °С у темряві.

#### **ДІАГНОСТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Переваги дослідження гліколізованого гемоглобіну (HbA<sub>1c</sub>) для діагностики цукрового діабету (ЦД) і преддіабету:

- Відображає рівень глікемії за тривалий проміжок часу, тобто характеризує стан хронічної гіперглікемії.
- Не потрібно здійснення дослідження натще, тому скринінг можна проводити в будь-який час.
- Краща стабільність аналіту в процесі зберігання і транспортування в порівнянні з глюкозою.
- Менша варіабельність значень в різні дні, так як не залежить від аліментарних або емоційних чинників, прийому лікарських препаратів, стресів.

#### **КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ**

Достовірність одержуваних результатів контролюють за допомогою контрольних розчинів гліколізованого гемоглобіну, атестованих даним методом.

Якщо значення контролю виходять за межі встановленого діапазону, перевірте обладнання, реактиви та можливі технічні проблеми.

Кожна лабораторія повинна встановити власну внутрішню систему контролю якості та коригуючі дії, якщо контроль не відповідає допустимим нормам.

## ПРОВЕДЕННЯ АНАЛІЗУ

### 1. Загальний гемоглобін

Для визначення концентрації загального гемоглобіну у **гемолізаті** використовують набори з геміглобінціанідним (наприклад: REF № HP008.01) або геміхромним методом (наприклад: REF № HP008.02).

### 2. Вуглеводний залишок гліколізованого гемоглобіну

Аналіз проводиться у відповідності зі схемою, наведеною у таблиці 1

Таблиця 1

Відміряти у центрифужну пробірку, мл	Макро аналіз				Напівмікро аналіз				Мікро аналіз			
	Дослід. проба	Холоста проба	Калібр. проба	Проба порівняння	Дослід. проба	Холоста проба	Калібр. проба	Проба порівняння	Дослід. проба	Холоста проба	Калібр. проба	Проба порівняння
Гемолізат крові <i>Калібрувальний розчин фруктози</i> Дистильована вода Гідролізуючий реагент					2,00 -	2,00 -	- 2,00	- -				
Гідролізуючий реагент додають повільно, ретельно перемішати струшуванням. Пробірки закривають <u>гумовими пробками для антибіотиків, що проткнуті ін'єкційними голками</u> . (Занурюють дослідні пробірки так, щоб рівень води у бані на 1 см перевищував рівень розчину в пробірках.) Після 10 хв інкубації при температурі 100 °С ( <u>у бурхливо киплячій</u> водяній бані) ін'єкційні голки з пробок виймають. Інкують ще 20 хв. Після закінчення інкубації пробірки одразу охолоджують під проточною водою або на крижаній бані протягом 10 хв. Перемішують струшуванням. <b>Розчин трихлороцтової кислоти перед аналізом охолоджують до температури від плюс 2 °С до плюс 8 °С.</b> Додати реагент повільно, ретельно перемішати струшуванням.												
Розчин трихлороцтової кислоти					0,70	0,70	0,70	0,70				
Центрифугувати <b>20 хв</b> при <b>3000-3500 об/хв</b> . Прозорий центрифугат використовувати для подальшого визначення. Відібрати необхідну кількість відповідного центрифугату.												
Центрифугат Кольороутворюючий реактив Дистильована вода					2,0 1,0	2,0 -	2,0 1,0	2,0 1,0				
Вміст пробірок ретельно перемішати. Інкують точно <b>40 хв</b> при температурі <b>37 °С</b> . Після закінчення інкубації пробірки одразу охолоджують під проточною водою. Виміряти оптичну щільність дослідної проби (E <sub>д</sub> ), холостої проби (E <sub>х</sub> ), калібрувальної проби (E <sub>к</sub> ), проби порівняння (E <sub>п</sub> ) <b>проти дистильованої води</b> . Забарвлення стабільне протягом <b>5 хв</b> . Фотометрування – див. розділ «Обладнання».												

### РОЗРАХУНОК КОНЦЕНТРАЦІЇ ВУГЛЕВОДНОГО ЗАЛИШКУ

$$E_{\text{досл}} = E_{\text{д}} - E_{\text{х}} - E_{\text{п}} \quad (1),$$

$$E_{\text{кал}} = E_{\text{к}} - E_{\text{п}} \quad (2),$$

$$C_{\text{ВЗ}} = \frac{E_{\text{досл}}}{E_{\text{кал}}} \times 250 \quad \text{мкмоль/л, де:} \quad (3),$$

C<sub>ВЗ</sub> - концентрація вуглеводного залишку в гемолізаті крові, мкмоль/л;

E<sub>досл.</sub> - розрахункова оптична щільність дослідної проби, од. оптичної щільності;

250 - концентрація **фруктози** в калібрувальній пробі, мкмоль/л;

E<sub>кал</sub> - розрахункова оптична щільність калібрувальної проби, од. оптичної щільності.

Концентрацію гліколізованого гемоглобіну розраховують за формулою (4):

$$C_{\text{ГГ}} = \frac{C_{\text{ВЗ}}}{C_{\text{гем}}} \quad (\text{мкмоль/г}), \text{ де} \quad (4)$$

C<sub>ГГ</sub> - концентрація гліколізованого гемоглобіну, **мкмоль фруктози/г гемоглобіну**;

C<sub>гем</sub> - концентрація загального гемоглобіну у **гемолізаті**, г/л.

### ІНТЕРФЕРЕНЦІЯ

Не знайдено <sup>3</sup>.

## Фактори, що впливають на рівень HbA<sub>1c</sub> та його вимір

Фактори	↑ HbA <sub>1c</sub>	↓ HbA <sub>1c</sub>
Еритропоез	Дефіцит вітаміну B12 і заліза, знижений еритропоез	Прийом еритропоетину, заліза, вітаміну B12, ретикулоцитоз, хронічні захворювання печінки
Змінений гемоглобін	Генетичні або хімічні зміни в гемоглобіні: гемоглобінопатії, HbF, метгемоглобін - можуть збільшувати або зменшувати рівень HbA <sub>1c</sub>	
Неферментативне глікозилювання	Алкоголізм, хронічна ниркова недостатність, зниження рН в еритроциті	Аспірин, вітаміни С і Е, деякі гемоглобінопатії, підвищення рН в еритроциті
Руйнування еритроцитів	Збільшення тривалості життя еритроцитів: спленектомія	Зниження тривалості життя еритроцитів: гемоглобінопатії, спленомегалія, ревматоїдний артрит або прийом деяких лікарських препаратів (антиретровірусні препарати, рибавірин, дапсон)
Аналізи	Гіпербілірубінемія, карбогемоглобін, великі дози аспірину, хронічне вживання опіатів, гемоглобінопатії	Гіпертригліцеридемія, гемоглобінопатії

**HbA<sub>1c</sub>** є тестом скринінгу, діагностики, довгострокового моніторингу рівня глюкози у хворих на ЦД. Він також грає прогностичну роль щодо ризику макро- і мікросудинних ускладнень ЦД.

### НОРМАЛЬНІ ВЕЛИЧИНИ:

(3,5-7,0) мкмоль фруктози/г гемоглобіну <sup>1,2</sup>.

Дані величини орієнтовні, відповідно до правил GLP (*Належної Лабораторної Практики*) рекомендується визначення власних нормальних величин в кожній лабораторії, характерних для обстежуваного контингенту.

### УТИЛІЗАЦІЯ

Всі зразки для аналізу вважають за матеріал, який може бути інфікований, і разом з можливими залишками реактивів підлягає знищенню відповідно до затверджених внутрішньолікарняних правил.

Паперову упаковку здайте в макулатуру, виполоскану тару - в сортоване сміття.

### ПРИМІТКА

Холосту пробу, пробу порівняння та калібрувальну пробу готують **по одній для серії аналізуємих проб**. Для холостої проби можна використовувати **будь який гемолізат або їх суміш**.

### ЗАСТЕРЕЖНІ ЗАХОДИ

1. При роботі використовувати гумові рукавички, заборонено їсти, пити, курити.
  2. Калібрувальний розчин, Кольороутворюючий реагент (тіобарбітурова кислота) - отруйні речовини.
  3. Розчин трихлороцтової кислоти, Гідролізуючий реагент (фосфорна кислота) - їдкі речовини.
- При влученні робочих розчинів або реакційних сумішей на поверхню шкіри їх необхідно змити великою кількістю води.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Gabbay, K. H. a spol.: Diabetes 28, 337 (1979)
2. Chromý, V., Konečná, H., Jedličková, R., Horní, J., Kamarýt, J.: Biochem. clin. bohemoslov. 15, 327 (1986)
3. Энциклопедия клинических лабораторных тестов, под редакцией Н.У. Тица, стр. 135, «Лабинформ», Москва, 1997.



**ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика»,**

Україна, 49051 м.Дніпро, вул. Каштанова, 32

Тел./факс: (056) 747-47-76, 747-45-34

Тел.:(093) 573-75-35, (067) 535-15-73, (095) 168-36-54

E-mail: felicit@ukr.net      http://www.felicit.com.ua