

УТВЕРЖДЕНА

Приказом Росздравнадзора

от _____ № _____

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»



Е.Н.Схолль-Энгбертс

2011 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению набора реагентов для определения процентного содержания гликозилированного гемоглобина (HbA1) в цельной крови бесколоночным ионообменным методом

(Гликозилированный гемоглобин - Витал)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов Гликозилированный гемоглобин - Витал предназначен для определения процентного содержания гликозилированного гемоглобина (HbA1) в цельной крови человека бесколоночным ионообменным методом в клинико-диагностических и биохимических лабораториях и научно-исследовательской практике.

Формирование гликозилированного гемоглобина (HbA1) происходит в эритроцитах необратимо в течение 120-дневного периода их жизни. Процентное содержание HbA1 отражает среднюю концентрацию глюкозы в крови за последние 2-3 месяца и может использоваться для контроля состояния больных диабетом. Высокий уровень гликозилированного гемоглобина свидетельствует о недостаточной коррекции содержания глюкозы в крови. Содержание HbA1 обычно выражают в процентах от общей концентрации гемоглобина.

Набор рассчитан для проведения 20 или 40 определений при расходе 0,5 мл реагента 1 и 2,5 мл реагента 2 на один анализ.

2. ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

2.1. Принцип метода

Цельная кровь смешивается с лизирующим реагентом, содержащим детергент и борат-ионы. В процессе гемолиза достигается устранение лабильных оснований Шиффа. Затем гемолизат в течение 5 минут смешивается с катионообменной смолой. За это время негликозилированный гемоглобин (HbA0) связывается с сорбентом в отличие от гликозилированного гемоглобина (HbA1). Для отделения смолы от супернатанта, в котором содержится HbA1, используется специальный сепаратор. Процентное содержание гликозилированного гемоглобина в общем гемоглобине крови рассчитывается относительно калибровочного раствора HbA1 после измерения оптических плотностей гликогемоглобиновой фракции (супернатанта) и общего гемоглобина в разведенном гемолизате.

2.2. Состав набора:

- реагент 1: буфер [борная кислота, 100 ммоль/л; имидазол, 100 ммоль/л; натрия азид, 0,95 г/л]; готов к использованию - 1 флакон (12 мл) или 1 флакон (24 мл);

- реагент 2: буфер [борная кислота, 150 ммоль/л; имидазол, 100 ммоль/л; натрия азид, 0,95 г/л]; ионообменный сорбент, 500 мг; готов к использованию - 20 флаконов (по 2,5 мл) или 40 флаконов (по 2,5 мл);

- калибратор: калибровочный образец гликозилированного гемоглобина лиофилизированный (точная концентрация HbA1 указана на этикетке флакона и в паспорте набора) – 1 флакон (0,5 мл).

- сепараторы для отделения ионообменной смолы – 20 или 40 шт.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Чувствительность – не более 4,5%.

Линейная область определения процентного содержания HbA1 – в диапазоне от 4,5 до 14,5%, отклонение от «линейности» - не более 7 %.

Коэффициент вариации результатов определений - не более 7 %.

Качество набора может проверяться по отечественным или зарубежным контрольным сывороткам, аттестованным данным методом.

Процентное содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1) в общем гемоглобине крови, определенное данным методом, составляет: у здоровых людей и лиц с компенсированным диабетом от 4 до 7%, у больных диабетом $\geq 8,5\%$.

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон нормальных величин содержания HbA1 в цельной крови для обследуемого контингента людей.

4. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Потенциальный риск применения набора – класс 1

Все компоненты набора в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Реагенты содержат токсичный компонент - натрия азид. При работе с ними следует соблюдать осторожность и не допускать попадания на кожу и слизистые. В случае из попадания на кожу и слизистые следует промыть пораженное место большим количеством проточной воды. При проглатывании следует выпить 0,5 л теплой воды и вызвать рвоту.

Меры предосторожности - соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г).

При работе с набором необходимо надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. кровь человека является потенциально инфицированным материалом, способным длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирусы гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

5. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ:

- спектрофотометр, длина волны 415 (405) нм, термостатируемая кювета с длиной оптического пути 10 мм или полуавтоматический биохимический анализатор открытого типа, длина волны 415 (405) нм;
- секундомер;
- пипетки полуавтоматические одноканальные, со сменными наконечниками, позволяющие отмерять объемы жидкости 5-40 мкл, 5-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пробирки стеклянные вместимостью 3,0-5,0 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- ротационный перемешиватель для пробирок.

6. АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Свежая цельная кровь человека, антикоагулянт – ЭДТА.

Образцы цельной крови можно хранить при температуре 2-8°C не более 7 суток; не замораживать.

7. ПОДГОТОВКА К АНАЛИЗУ

Компоненты набора выдержать при комнатной температуре (18-25°C) в течение времени не менее 2 часов.

Реагент 1 и реагент 2 готовы к использованию.

Приготовление калибратора.

Во флакон с лиофилизированным калибратором внести 0,5 мл дистиллированной воды, выдержать 30 мин при комнатной температуре и тщательно перемешать до полного растворения. Процентное содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1) в полученном растворе указано на этикетке флакона и в паспорте набора.

Приготовленный раствор калибратора можно хранить при температуре +2-8°C не более 7 дней или при температуре минус 18°C не более 1 мес. Повторное замораживание не допускается.

8. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Приготовление гемолизата.

Приготовить одну пробирку вместимостью 3,0 мл для опытной пробы и одну пробирку вместимостью 3,0 мл для калибровочной пробы. Во все пробирки внести по 0,5 мл реагента 1. В пробирку для опытной пробы добавить 100 мкл анализируемого образца цельной крови человека, содержащего HbA1, в пробирку для калибровочной пробы – 100 мкл приготовленного раствора калибратора. Тщательно перемешать содержимое пробирок и инкубировать одновременно при температуре 18-25°C в течение времени не менее 5 мин до полного завершения гемолиза (гемолизат).

Определение гликозилированного гемоглобина.

Перемешать содержимое двух пробирок с реагентом 2 до состояния гомогенной суспензии. Затем открыть крышки пробирок и добавить в одну пробирку с реагентом 2 100 мкл гемолизата, полученного из анализируемого образца; во вторую пробирку добавить 100 мкл гемолизата, полученного из калибровочной пробы. Каждую пробу гемолизата необходимо вносить новым сухим наконечником. При внесении необходимо дважды ополаскивать наконечник дозатора в пробирке с реагентом 2.

Плотно закрыть пробирки с внесенным гемолизатом крышками и перемешивать содержимое пробирок на ротационном перемешивателе одновременно в течение времени не менее 5 минут. После окончания перемешивания открыть крышки на пробирках, вставить в каждую пробирку сепаратор и подвинуть в пробирку до упора так, чтобы ионообменная смола была плотно упакована. Образовавшиеся супернатанты перелить в соответствующие подготовленные пробирки и измерить оптическую плотность опытной и калибровочной пробы против дистиллированной воды при длине волны 415 (405) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Оптическая плотность опытной пробы обозначается как «ОП HbA1 пробы», оптическая плотность калибровочной пробы обозначается как «ОП HbA1 кал».

Определение общего гемоглобина.

Приготовить одну пробирку вместимостью 5,0 мл для опытной пробы и одну пробирку для калибровочной пробы. Во все пробирки внести по 5 мл дистиллированной воды. В пробирку для опытной пробы внести 20 мкл гемолизата, полученного из анализируемого образца; в пробирку для калибровочной пробы внести 20 мкл гемолизата, полученного из калибровочной пробы. Каждую пробу гемолизата необходимо вносить новым сухим наконечником. При внесении необходимо дважды ополаскивать наконечник дозатора в пробирке с дистиллированной водой. Тщательно перемешать содержимое пробирок.

Измерить оптическую плотность опытной и калибровочной пробы против дистиллированной воды при длине волны 415 (405) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм. Оптическая плотность опытной пробы обозначается как «ОП общий Hb пробы», оптическая плотность калибровочной пробы обозначается как ОП общий Hb кал»

Определение гликозилированного гемоглобина рекомендуется проводить аналитическими сериями не более 3 проб для точного соблюдения времени инкубации для каждой пробы с целью получения достоверного результата.

9. РАСЧЕТЫ

Расчет фактора (F) по калибратору произвести по формуле (1):

$$F = C_{\text{кал}} \times \frac{\text{ОП общий Hb}_{\text{кал}}}{\text{ОП HbA1}_{\text{кал}}}$$

где: $C_{\text{кал}}$ – процентное содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1) в калибраторе, указанное на этикетке флакона, %;

ОП общий Hb_{кал} – оптическая плотность калибровочной пробы с общим гемоглобином, ед. опт. плотн.;

ОП HbA1_{кал} – оптическая плотность калибровочной пробы с гликозилированным гемоглобином, ед. опт. плотн.

Расчет процентного содержания гликозилированного гемоглобина (HbA1) в опытных пробах произвести по формуле (2):

$$C = F \times \frac{\text{ОП HbA1}_{\text{пробы}}}{\text{ОП общий Hb}_{\text{пробы}}}$$

где: C – процентное содержание гликозилированного гемоглобина (HbA1) в опытной пробе, %;

ОП HbA1_{пробы} – оптическая плотность опытной пробы с гликозилированным гемоглобином, ед. опт. плотн.;

ОП общий Hb_{пробы} – оптическая плотность опытной пробы с общим гемоглобином, ед. опт. плотн.;

F – фактор.

10. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

Набор должен храниться при температуре 2-8°C в упаковке предприятия-изготовителя в сухом месте в течение всего срока годности. Допускается хранение набора при температуре до 25°C не более 5 сут. Замораживание компонентов набора не допускается.

Срок годности набора – 1 год.

Реагент 1 после вскрытия флаконов можно хранить при температуре 2-8°C в плотно закрытом виде не более 1 года.

Разведенный калибратор можно хранить при температуре 2-8°C в плотно закрытом виде в течение 7 дней или при температуре минус 18°C в течение 1 месяца. Повторное замораживание реагента не допускается.

Для отбора и добавления анализируемых проб и компонентов набора рекомендуется использовать полуавтоматические одноканальные пипетки, аттестованные на точность по значению средней дозы и сходимости результатов пипетирования.

Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению набора.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн» по адресу:

194 156, Санкт-Петербург, пр. Энгельса, д.27.

Тел/факс: (812) 326-61-98.

и на кафедру КЛД ГБОУ ДПО РМАПО Минздравсоцразвития России по адресу:
116000, Москва, 2-й Боткинский пр, д. 5.

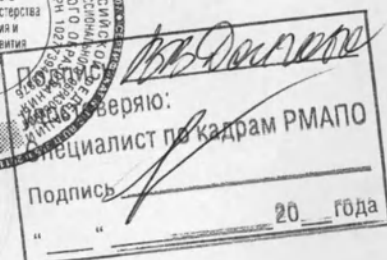
Тел.: (495) 945-82-22.

Генеральный директор
ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн»

Е.Н. Схолль-Энгбертс

Зав. кафедрой клинической лабораторной
диагностики ГБОУ ДПО РМАПО
Минздравсоцразвития России,
доктор мед. наук, профессор

В.В. Долгов



20.10.11