

2 Розрахунок вмісту загального гемоглобіну

Таблиця 2 в мілілітрах

Компоненти	Проби		
	Д	К	Х
Перед визначенням гемоглобіну реактиви витримують при нормальній кімнатній температурі не менш ніж 30 хв			
Гемолізат	0,10	—	—
Калібратор 150 г/л (розведений у 251 раз)	—	5,00	—
Трансформуючий розчин	5,00	—	5,00
Ретельно перемішують. Витримують 15 хв при кімнатній температурі. Вимірюють оптичну густину проб: дослідної, калібрувальної проти холостої проби. Вимірюють при довжині хвилі 540 нм			

Вміст гемоглобіну в гемолізаті розраховують за формулою № 4:

$$C_{\text{гемоглобіну}}, \text{ г/л} = \frac{E_{\text{дослід}} \times 150,0}{E_{\text{калібратору}} \times 4,92}, \text{ де} \quad (4)$$

$C_{\text{гемоглобіну}}$ – вміст гемоглобіну в гемолізаті дослідної проби, г/л;

150,0 – вміст гемоглобіну в калібрувальній пробі, г/л;

$E_{\text{дослід}}$ – оптична густина дослідної проби, од. екстинції;

$E_{\text{калібратору}}$ – оптична густина калібрувальної проби, од. екстинції.

4,92 – коефіцієнт розведення.

3 Розрахунок вмісту глікозильованого гемоглобіну

Вміст глікозильованого гемоглобіну розраховують за формулою № 5:

$$C_{\text{глікогемоглобіну}}, \text{ мкмоль фруктози/г гемоглобіну} = \frac{C_{\text{фруктози}}}{C_{\text{гемоглобіну}}} \quad (5)$$

Референтні значення

(3,5-7,0) мкмоль фруктози/г гемоглобіну

Застережні заходи

1 Використовують тест-набір тільки для діагностики in vitro.

2 Калібрувальний розчин, тіобарбітурова кислота – отруйні речовини. Розчин ТХО, розчин фосфорної кислоти – їдкі реактиви.

3 Необхідно дотримуватись правил техніки безпеки при роботі з біологічним матеріалом, так як зразки крові розглядаються як потенційно інфікованими (ВІЛ, вірус гепатиту В, вірус гепатиту С).

Утилізація відходів

Утилізація відходів повинна здійснюватися в відповідності з правилами безпеки.

Дата останнього перегляду інструкції із застосування 07.01.2026 р.

З питань контролю якості та придбання реактивів звертатися за адресою:

ПрАТ «Реагент», 49019, м. Дніпро, вул Ударників, 27. Факс: (056)372-35-54.
Мобіл.телефони: (050)452-20-76/85; (067)638-11-37; (050)481-75-46; (099)065-32-59
Відділ технічного контролю : (099)545-72-05 ; (050)495-80-78.
E-mail: reagent@ukr.net; reagenttn@ukr.net

“ПОГОДЖЕНО”

Директор ДП «Український
медичний центр сертифікації»
Лебідев М.С.
від 31.03.2016 р.

Технічна документація перевірена
Державним підприємством «Український
медичний центр сертифікації»:
Сертифікат перевірки технічної документації
№ UA.TR.039.137-16 від 31.03.2016 р.

РЕАГЕНТ



ДВ	050
31.03.2016	

ТУ У 24.4-13433137-050:2006

IVD

REF BX 029-04

ІНСТРУКЦІЯ

ДО НАБОРУ РЕАКТИВІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛІКОЗИЛЬОВАНОГО ГЕМОГЛОБІНУ ЗА РЕАКЦІЄЮ З ТІОБАРБІТУРОВОЮ КИСЛОТОЮ «ГЛІКОЗИЛЬОВАНИЙ ГЕМОГЛОБІН»

Призначення

Набір використовують для визначення вмісту глікозильованого гемоглобіну в цільній крові та гемолізаті людини в клініко-діагностичних і біохімічних лабораторіях, науково-дослідницькій практиці.

Термін придатності та умови зберігання тест-набору

Гарантійний термін придатності з моменту виготовлення – 12 місяців при температурі (2 – 8) °С. Не слід використовувати тест-набір після закінчення терміну придатності зазначеного на упаковці. Не допускати перемерзання або витримувати компонентів тест-набору при високих температурах оточуючого повітря.

Кількість проб

Напівмакрровизначенням – 140 проб.

Лабораторія має право робити перерахунок на свій об'єм фотометруемого розчину, співвідношення беруться в тих самих пропорціях. Співвідношення гемолізату : фосфорної кислоти : ТХО (5,7 : 1 : 2); центрифугату : тіобарбітурової кислоти (дистилляту) (2 : 1).

Аналітичні показники

Лінійна область визначення – (0 - 25) мкмоль фруктози/г гемоглобіну.

Коефіцієнт варіації – не більше 6 %.

Склад набору

- | | |
|--|--------------------------------|
| 1 Калібрувальний розчин фруктози (250,0±3,7) мкмоль/л | - 1 флакон з (20,0 ± 0,4) мл |
| 2 Розчин фосфорної кислоти (85,0±1,7) % | - 1 флакон з (50,0 ± 1,0) мл |
| 3 Розчин ТХО (40,0±0,8) % | - 1 флакон з (100,0 ± 2,0) мл |
| 4 Субстрат (2-Тіобарбітурова кислота) | - 2 флакона по (36,0 ± 2,0) мг |
| 5 Реактиви для визначення гемоглобіну ціанідним методом – додаткові реактиви, до складу набору не входять. | |

Обладнання

- 1 Пробірки лабораторні ємністю 10 мл. 2 Пробірки центрифужні. 3 Піпетки ємністю: 1,0 мл або лабораторні медичні дозатори. 4 Мірна колба ємністю 100 мл. 5 Водяна баня для підтримання температури 100 °С. 6 Термостатичне обладнання для підтримання температури 37 °С. 7 Центрифуга (1000 об/хв). 8 Прилад для потенціометричного аналізу. 9 Фотометричне обладнання, кювети з довжиною оптичного шляху 10 (5) мм. Довжина хвилі 443 (430-450) нм.

Приготування робочих розчинів та умови їх зберігання

1 Калібрувальний розчин фруктози з концентрацією 250 мкмоль/л - готовий до застосування. Стабільний після відкупорювання 4 тижня при температурі (2-8) °С.

2 Розчин трихлороцтової кислоти - готовий до застосування. Стабільний після відкупорювання при кімнатній температурі. При відкупорюванні будьте обережними, пробка з флакону іноді вискакує під високим тиском.

3 Розчин фосфорної кислоти - готовий до застосування. Стабільний після відкупорювання при кімнатній температурі.

4 Розчин 2-тіобарбітурової кислоти. При розчиненні наважки в 100 мл дистилату рН приблизно дорівнює 2,8 од рН, тому необхідно його коректувати до (6,0±0,3) од рН. Вміст 1 флакону з 2-тіобарбітуровою кислотою кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл з 80 мл дистильованої води. Розчиняють при нагріванні, охолоджують до 20 °С. Коректують рН 0,1 N розчином гідроксиду натрію по краплям (!), потім доводять до мітки дистильованою водою. Розчин стабільний до 4 тижнів при температурі (15 - 25) °С у темному місці.

Вимоги до аналізованої рідини

1 Цільну кров змішують з антикоагулянтом (ЕДТО, гепарин, оксалат). Стабільність аналіту в цільній крові - (4-7) доби при температурі (2-8) °С. На одне визначення (в 1 повторі) вам необхідно не менш ніж 1,1 мл цільної крові – 4,4 мл гемолізату (4 мл гемолізату знадобиться на визначення вмісту фруктози, 0,1 мл – на визначення гемоглобіну). Рекомендується відбирати кров в об'ємі 2,2-3,0 мл для повторного досліджу, при необхідності.

1.1 Антикоагулянт - розчин натрію оксалату (15 г/л) готується на (бі)дистильованій воді, зберігають при (2-8) °С. Застосовують 1 частину антикоагулянту на 20 частин крові.

1.2 Антикоагулянт - розчин амонію оксалату (10 г/л) готується на (бі)дистильованій воді, кип'ятять, фільтрують, зберігають при (2-8) °С. Застосовують 1 частину антикоагулянту на 20 частин крові.

1.3 Антикоагулянт - розчин ЕДТО (15 г/л) готується на (бі)дистильованій воді. Якщо ЕДТО розчиняється повільно, до порції дистильованої води додають луг (до рН 8,4-8,6), а потім вносять кислоту до встановлення попередньої нейтральної реакції розчину. Застосовують 1 частину антикоагулянту на 20 частин крові.

1.4 Антикоагулянт - розчин гепарину (1000 Од в 1 мл). Застосовують 1 частину антикоагулянту на 500 частин крові або краплю гепарину – на весь об'єм пробірки.

2 Отримання гемолізату з цільної крові: 1 мл цільної крові з антикоагулянтом центрифугують 10 хв (1000 об/хв). Верхній шар (супернатант) відділити відразу після центрифугування. До осаду еритроцитів додають 3 мл фізіологічного розчину, перемішують скляною паличкою і знову центрифугують. Після віддалення центрифугату, до осаду еритроцитів додають 3,0 мл дистильованої води. Інтенсивно струшують і залишають на 10 хв при кімнатній температурі. Для подальшого аналізу використовують надосадову рідину (гемолізат).

3 Розчин ТХО перед аналізом охолоджують до температури (2-8) °С.

Принцип методу

Стійка форма глікозилизованого гемоглобіну містить 1-дезоксид-1(N-валіл)-фруктозу. При нагріванні з фосфорною кислотою вуглеводний залишок гідролізується до 5-оксиметил-2-фуральдегіду, який при взаємодії з 2-тіобарбітуратом дає забарвлення, інтенсивність якого визначають фотометрично.

Проведення аналізу

Таблиця 1

в мілілітрах

Компоненти	Напівмакро			
	Д	X ₁	К	X ₂
Гемолізат	2,0	2,0	—	—
Калібрувальний розчин	—	—	2,0	—
Дистильована вода	—	—	—	2,00
Фосфорна кислота	0,35	0,35	0,35	0,35
Перемішують і струшують. Пробірки закривають конічними пробірками, вставляючи їх зверху у дослідні. Занурюють дослідні пробірки так, щоб рівень води у бані на 1 см перевищував рівень розчину в пробірках. Після 10 хв інкубації при 100 °С знімають конічні пробірки. Інкують ще 20 хв. Охолоджують під проточною водою або на льодяній бані 10 хв				
ТХО	0,7	0,7	0,7	0,7
Перемішують і струшують. Центрифугують 30 хв (1000 об/хв). При каламутті центрифугування повторюють				
Центрифугат	2,0	2,0	2,0	2,0
Тіобарбітурова кислота	1,0	—	1,0	1,0
Дистильована вода	—	1,0	—	—
Перемішують і струшують. Інкують точно 40 хв при 37 °С. Вимірюють оптичну густину проб: дослідної, калібрувальної, холостих проти дистилату				

Холості проби № 1, № 2 та калібрувальну пробу готують по одній для серії аналізуємих проб. Для холостої проби № 1 можна використовувати будь який гемолізат або їх суміш.

Примітки

У наданій інструкції прийняті скорочення: Д – дослідна проба; К – калібрувальна проба; X₁ – холоста проба № 1; X₂ – холоста проба № 2; ЕДТО - етилендіамінтетраоцтова кислота; ТХО – трихлороцтова кислота.

Розрахунок

1 Розрахунок вмісту фруктози

Результативну екстинцію дослідної проби фруктози розраховують за формулою № 1

$$E_{\text{д-фруктози}} = E_{\text{дослід}} - (E_{\text{хол1}} + E_{\text{хол2}}) \quad (1)$$

Результативну екстинцію калібрувальної проби фруктози розраховують за формулою № 2

$$E_{\text{к-фруктози}} = E_{\text{калібратору}} - E_{\text{хол2}} \quad (2)$$

Вміст фруктози у дослідній пробі розраховують за формулою № 3:

$$C_{\text{фруктози, мкмоль/л}} = \frac{E_{\text{д-фруктози}}}{E_{\text{к-фруктози}}} \times 250,0, \text{ де} \quad (3)$$

C_{фруктози} – вміст фруктози у дослідній пробі, мкмоль/л;

250 – вміст фруктози у калібрувальній пробі, мкмоль/л;

E_{дослід} – екстинція дослідної проби, од. екстинції;

E_{хол1} (E_{хол2}) - екстинція холостої проби № 1 (№2), од. екстинції;

E_{калібратору} – екстинція калібрувальної проби, од. екстинції;

E_{д-фруктози} – результативна екстинція дослідної проби фруктози, од. екстинції;

E_{к-фруктози} – результативна екстинція калібрувальної проби, од. екстинції.