

BIO-LA-TEST®

GLYCATED HEMOGLOBIN**(GHB 100)**

Cat. No. 10003170

Store at
(+2 to +25)°C

Reagent Set for the preparation of 100 ml of working solutions for the determination of glycated hemoglobin in blood.

Principle

A stable form of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) contains 1-deoxy-1(N-valyl)fructose, which can be dehydrated by phosphoric acid to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde which forms with 2-thiobarbituric acid a colour complex absorbing at 443 nm. An unstable form of glycated hemoglobin and fetal hemoglobin do not interfere with HbA_{1c} determination.

References

Gabbay, K. H., at al.: Diabetes 28, 337 (1979)
Chromý, V., Konečná, H., Jedličková, R., Horní, J., Kamaryt, J.: Biochem. clin. bohemoslov. 15, 327 (1986)

Reagents

- 1 Trichloroacetic acid (50 ml)
solution of 2.45 mol/l
- 2 2-thiobarbituric acid (1 dose)
2.5 mmol/dose
- 3 Standard solution (20 ml)
fructose 500 µmol/l

Reference values

aB HbA_{1c} (µmol of fructose/g Hb) 3.5–7.0

The range of reference values is only approximate, it is recommended to all laboratories to verify the extension of reference interval for their concrete examined population.

Reproducibility

Approx. ±6%

Auxiliary reagents (not included in the Set)

Phosphoric acid 85 %, p.a.

Physiological solution of NaCl:

Prepare by dissolving 0.9 g of sodium chloride in 100 ml of distilled water.

BIO-LA-TEST® HEMOGLOBIN, Cat. No. 10003194,

BIO-LA-TEST® POTASSIUM EDTA, Cat. No. 10003159.

Working solutions**TBA solution**

Dissolve the contents of the bottle with Reagent 2 in 50 ml of distilled water.

Stability: 1 month at (+15 to +25)°C in the dark.

Calibration solutions

By diluting Reagent 3 with distilled water, prepare calibration solutions containing fructose from 100 to 400 µmol/l.

Stability: 1 month at (+2 to +8)°C in the dark.

Procedure**Preparation of hemolysate**

Using Potassium EDTA as an anticoagulating agent, prepare anticoagulating blood. Centrifuge 1 ml of anticoagulating blood at approx. 1000 g for 10 minutes and suck off the plasma with Pasteur pipette. To the packed erythrocytes add 3 ml of physiol. solution, mix lightly using a glass rod, centrifuge and suck off the supernatant. To the packed erythrocytes add 3 ml of dist. water, shake thoroughly, let stand for 10 minutes and centrifuge. For the following analyses, use the supernatant (hemolysate).

Determination of total hemoglobin

Wavelength (540–546) nm

Cuvette 1 cm

Temperature (+15 to +25)°C

In a test tube, mix Working solution (prepared from BIO-LA-TEST® HEMOGLOBIN) in the ratio 50+1 with hemolysate and let stand for 10 min. Read the absorbance of a sample (A_s) against working solution and calculate the content of total hemoglobin in hemolysate:

$$\text{Hb (g/l)} = A_s \cdot \frac{367.7}{4.92}$$

Determination of glycated hemoglobin

Wavelength (430–450) nm

Cuvette 1 cm

Water bath tempered to (37 ± 1)°C

Glycerol bath tempered to (100 ± 1)°C with a mixing device securing homogeneous temperature.

The glycerol level in the bath should reach over approx. 1 cm of the level of the solution in a test tube. Temperate Reagent 1 to (+2 to +8)°C before use.

Pipette (ml)	Sample	Control soln. 1	Control soln. 2	Standards
Hemolysate	1.50	1.50	–	–
Phosphoric acid	0.25	0.25	0.25	0.25
Calibr. solns.	–	–	–	1.50
Dist. water	–	–	1.50	–

Shake, close test tubes with a resin stopper for antibiotics punched with an injection needle and place them for 30 minutes in a glycerol bath tempered to (100 ± 1)°C. After 10 min take out the needles and cool test tubes for approx. 10 minutes in tap water.

Reagent 1	0.50	0.50	0.50	0.50
-----------	------	------	------	------

Mix and centrifuge for 20 min at 1000 g. In the presence of turbidity, prolonge the centrifugation. Into a clean test tubes, pipette.

Supernatant	1.00	1.00	1.00	1.00
TBA soln.	0.50	–	0.50	0.50
Dist. water	–	0.50	–	–

Mix and incubate for exactly 40 min at 37°C in a water bath and read the absorbances of the sample (A₁), control solutions 1 (A₂) and 2 (A₃) and absorbances of standards against water.

Calculation

Using absorbances of standards, calculate the slope of calibration function sm in (l/µmol) and calculate the content of glycated hemoglobin according to following formula:

$$\text{aB HbA}_{1c} \text{ (µmol of fructose/g Hb)} = \frac{A_1 - (A_2 + A_3)}{\text{Hb} \cdot \text{sm}}$$

Notes

One control solution 1 and 2 is prepared for the whole series of samples to be analyzed. It is possible to prepare control solution 1 with an arbitrary hemolysate or with a mixture of hemolysates.

It is recommended to control the calibration function with each series of samples to be analyzed.

Health protection

For in vitro diagnostic use. To be handled by entitled and professionally educated person.

Reagents contain trichloroacetic acid (R1, 40%), a corrosive agent, dangerous for environment and irritant sodium hydrogenphosphate (R2, 52%). While working it is especially significant to observe sanitary rules, not to eat, drink, or smoke and to use self preventatives.

First aid

At an accidental ingestion drink up approx. 0.5 l of water. At an eye contact flush immediately and thoroughly with large quantity of water. At a skin contact wash the skin with soap and warm water. In all serious cases of health damage contact the physician.

Waste disposal

All tested samples should be treated as potentially infectious and with the contingent rest of the reagents should be liquidated in accordance with any other local and national regulations relating to the safe handling of such materials.

Put packaging paper waste and containers to recycling.

Date of last revision: 28. 1. 2011

Produced Erba Lachema s.r.o.
Karásek 1d, 621 33 Brno, CZ
e-mail: diagnostics@lachema.com, www.lachema.com

БИО-ЛА-ТЕСТ®

ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫЙ ГЕМОГЛОБИН (GNB 100)

Ном. номер 10003170

Хранить при
(+2 до +25)°C

Набор реактивов для приготовления 100 мл рабочих растворов для определения гликогемоглобина в крови.

Принцип метода

Стабильная форма гликогемоглобина (HbA_{1c}) содержит 1-дезоксигемоглобин (HbA_{1c}), которая дегидратируется фосфорной кислотой с образованием цветного комплекса, имеющего абсорбционный максимум при 443 нм. Определению не мешает ни лабильная форма гликогемоглобина, ни фетальный гемоглобин.

Литература

Gabbay, K. H. a spol.: Diabetes 28, 337 (1979)
Chromý, V., Konečná, H., Jedličková, R., Horní, J., Kamaryt, J.: Biochem. clin. bohemoslov. 15, 327 (1986)

Реактивы

- 1 Трихлоруксусная кислота (50мл)
раствор 2,45 моль/л
- 2 2-Тиобарбитуровая кислота (1 доза)
2,5 ммоль/1 доза
- 3 Стандарт фруктозы (20 мл)
раствор 500 ммоль/л

Референтные величины

aK - HbA_{1c}, вщ-к = (3,5–7,0) ммоль фруктозы/г Hb
Приведенный диапазон референтных значений является ориентировочным. Рекомендуется каждой лаборатории вычислять свои диапазоны нормальных величин.

Воспроизводимость

Около ±6 %

Вспомогательные реактивы

Фосфорная кислота 85%-ная, ч.д.а. или ч.
Физиологический раствор хлористого натрия
Приготавливают растворением 0,9 г хлорида натрия в 100 мл дистиллированной воды.
Диагностические наборы Био-ЛА-Тест® ГЕМОГЛОБИН,
Ном. номер 10003194,
Био-ЛА-Тест® КОМПЛЕКСОНАТ КАЛИЯ, Ном. номер 10003159.

Приготовление рабочих растворов

Раствор тиобарбитуровой кислоты (ТВА)

Содержимое флакона с Реактивом 2 растворяют в 50 мл дист. воды.
Устойчивость: мин 1 месяц при (+15 до +25)°C в темном месте.

Калибровочные растворы

Разбавлением Реактива 3 дист. водой приготавливают калибровочные растворы фруктозы концентрации 100–400 ммоль/л.
Устойчивость: мин 1 месяц при (+2 до +8)°C в темном месте.

Проведение анализа

Приготовление гемолизата

Кровь отбирают в комплексопат калия, 1 мл несвертываемой крови центрифугируют (примерно 10 мин при 1000 g), плазму сливают или отсасывают пипеткой Пастера. К эритроцитам добавляют 3 мл физиологического раствора, смесь осторожно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют. После отсоса надосаочной жидкости к осадку эритроцитов добавляют 3 мл дист. воды, смесь интенсивно встряхивают, оставляют стоять 10 мин и центрифугируют. Для дальнейшей работы используют надосаочную жидкость (гемолизат).

Определение общего гемоглобина

Длина волны (540–546) нм
Кювета 1 см
Температура (+15 до +25)°C
Рабочий раствор (приготовленный из набора Био-ЛА-Тест® ГЕМОГЛОБИН) смешивают в соотношении 50+1 с гемолизатом и оставляют стоять 10 мин.
Измеряют оптическую плотность при 546 нм против трансформационного раствора (A₅₄₆). Содержание общего гемоглобина в гемолизате вычисляют по формуле:

$$Hb \text{ (г/л)} = A_{546} \cdot \frac{367,7}{4,92}$$

Определение гликогемоглобина

Длина волны (430–450) нм
Кювета 1 см
Температура в водной бане (37 ± 0,1)°C, температура в глицериновой бане (100 ± 1)°C с перемешиванием обеспечивающим гомогенное температурное поле.
Пробирки помещают так, чтобы уровень глицерина примерно на 1 см превышала уровень раствора в пробирках.
Реактив 1 перед употреблением охлаждают до (+2 до +8)°C.

В пробирку отмеряют (мл)	Проба	Контр. раствор 1	Контр. раствор 2	Стандарты
Гемолизат	1,50	1,50	–	–
Фосфатная кислота 85%-ная	0,25	0,25	0,25	0,25
Калибровочный раствор	–	–	–	1,50
Дист. вода	–	–	1,50	–
Перемешивают встряхиванием, пробирки закрывают резиновыми пробирками для антибиотиков с вколотой инъекционной иглой и нагревают 30 мин на глицериновой бане при (100 ± 1)°C. После 10 мин нагревания инъекционные иглы из пробирок вынимают. По окончании дегидратации пробирку охлаждают в проточной воде или на ледяной бане в течение 10 минут.				
Реактив 1	0,50	0,50	0,50	0,50
Содержимое пробирок встряхивают и центрифугируют в течение 20 мин при наличии помутнения центрифугирование следует подпитать. В сухие пробирки отмеряют пипеткой.				
Надосаочная жидкость	1,00	1,00	1,00	1,00
Раствор ТВА	0,50	–	0,50	0,50
Дист. вода	–	0,50	–	–
Перемешивают встряхиванием и инкубируют точно 40 мин при 37°С на водяной бане. Измеряют оптическую плотность пробы (A ₁), контрольного раствора 1 (A ₂), контрольного раствора 2 (A ₃) и стандарты против воды.				

Расчет

По зависимости оптических плотностей стандартов от концентрации калибровочных растворов определяют угловой коэффициент прямой sm (литр/мкмоль).

Содержание гликогемоглобина рассчитывают по формуле:

$$aK \text{ HbA}_{1c} \text{ (мкмоль фруктозы/г Hb)} = \frac{A_1 - (A_2 + A_3)}{Hb \cdot sm}$$

Примечания

Контрольные растворы 1 и 2 приготавливают по одному для всей серии анализируемых проб. Для контрольного раствора 1 можно использовать любой гемолизат или их смесь.
Калибровочный график следует проверять при анализе новой серии проб.

Меры предосторожности

Набор реагентов предназначен для in vitro диагностики профессионально обученным лаборантом.
Реактив 1 содержит трихлоруксусную кислоту (40%) – едкое вещество.
Реактив 2 содержит вторичный фосфат натрия (52%), который раздражающим веществом.
При работе необходимо соблюдать правила личной гигиены, запрещается есть, пить и курить, надо употреблять личные предохранительные средства.

Первая помощь

При случайном приеме внутрь следует выпить 0,5 л воды. При попадании в глаза их следует промыть проточной водой. При попадании на кожу ее следует отмыть теплой водой с мылом. Во всех случаях серьезного повреждения здоровья должна быть оказана медицинская помощь.

Ликвидация мусора

Все тестированные пробы считают материалом, который может быть инфицирован, и совместно с возможными остатками реактивов подлежат уничтожению в соответствии с утвержденными внутрибольничными правилами.
Бумажную упаковку сдайте в макулатуру, выдосканую заводскую тару в сортированный мусор.

Дата проведения последнего контроля: 28. 1. 2011

Выпускает Erba Lachema s.r.o.
Капачек 1d, 621 33 Брно, CZ
e-mail: diagnostics@lachema.com, www.lachema.com