

## АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕМОГЛОБИНА, ВЫБОР МЕТОДА

А.В. БАГАЕВ

ЗАО «АНАЛИТИКА», г. Москва

*Резюме.* В статье описываются достоинства и недостатки сертифицированных методов определения HbA1c. Оценивается степень влияния интерферирующих факторов на результаты исследований, приводятся аналитические характеристики современного ВЭЖХ анализатора гликогемоглобина.

*Ключевые слова:* гликогемоглобин HbA1c, методы определения, сертификат NGSP, интерференция, минорные фракции гемоглобинов.

## AUTOMATE-BASED EVALUATION OF GLYCOHEMOGLOBIN. HOW TO CHOOSE A METHOD

A.V. BAGAEV,

PhD, Chief specialist for production

«Analytica», Moscow

*Summary.* The article describes the positive and negative features of certified methods for HbA1c evaluation. The degree of influence of interfering factors on the obtained results is discussed, the analytic characteristics of modern High effective liquid chromatography analyzer are given. This device can be used for glycated hemoglobin evaluation.

*Key words:* glycated hemoglobin HbA1c, methods of evaluation, certificate NGSP, interference, minor hemoglobin fractions.

### Данные для корреспонденции:

Андрей Владимирович Багаев

к. м. н., ведущий специалист по продукции ЗАО «АНАЛИТИКА», г. Москва,

тел. (495) 737-03-63, 748-11-69 внутр. 139, bagaev@analytica.ru

Широкая распространенность заболевания диабетом, поздняя диагностика и тяжесть осложнений, вызванных неадекватной терапией, определяют актуальность внедрения в лабораторную практику надежных и доступных методов измерения гликированного гемоглобина в крови. При выборе метода исследования и конкретного анализатора в первую очередь следует обратить внимание на наличие сертификата NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program, США). В России наличие этого документа не является обязательным, тем не менее, данный критерий позволяет значительно сузить круг оборудования, отвечающего современным требованиям и проверенного независимыми авторитетными лабораториями.

Методы определения гликогемоглобина, реализованные в современных автоанализаторах, можно разделить на пять групп: ионообменная хроматография высокого (ВЭЖХ) и низкого давления, аффинная хроматография, иммунохимия, капиллярный электрофорез и прямое энзиматическое определение.

При выборе конкретного производителя анализатора или набора реагентов из перечня, имеющего сертификат, NGSP рекомендует отдавать предпочтение тем

образцам, при использовании которых минимизирован эффект интерференции. Искажение результатов могут давать наличие патологических фракций гемоглобина (HbS, HbC и др.), повышенное содержание HbF, карбамелированный (у пациентов с уремией) или ацетилированный гемоглобин, повышение уровня лабильных гликированных фракций, гипербилирубинемия, гиперлипидемия, высокие дозы витамина С или витамина Е. Актуальные обобщенные данные размещены на сайте NGSP [1].

Степень интерференции при исследовании гликогемоглобина зависит не только от используемого метода измерения. Для иммунотурбидиметрических методов эффект интерференции связан с типом используемых антител, для ионообменной хроматографии качество разделения фракций гемоглобинов зависит от типа сорбента, характеристик колонки, состава элюирующих буферов. Поэтому автоанализаторы, в которых используется один и тот же метод определения, могут иметь существенно различающиеся характеристики [2].

Если провести анализ структуры методов определения гликогемоглобина, имеющих действующий сертификат NGSP (рис. 1), то можно констатировать, что

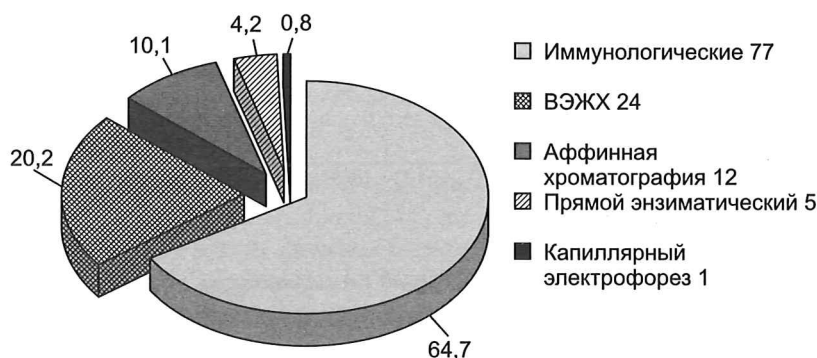


Рис. 1. Структура методов определения гликогемоглобина, имеющих действующий сертификат NGSP (март 2012 г.)

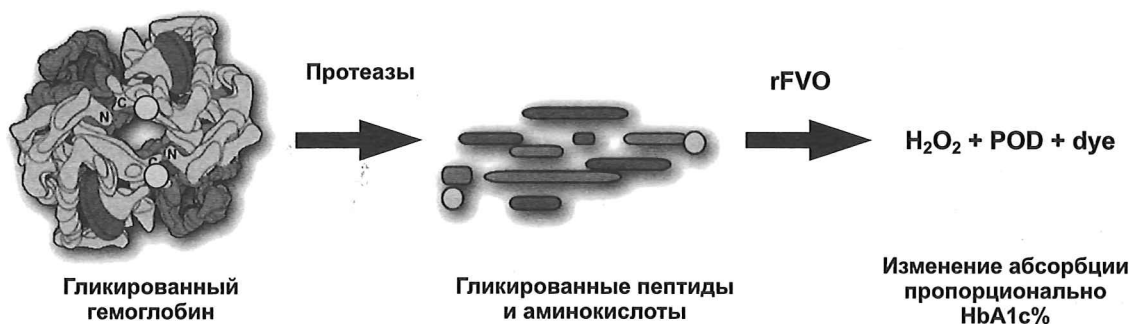


Рис. 2. Схема определения гликогемоглобина прямым энзиматическим методом

более двух третей сертификатов выдано компаниям-изготовителям иммунотурбидиметрических тестов [3]. Популярность этого метода объясняется тем, что он позволяет напрямую, без предварительного определения негликозированной фракции определять процентное содержание HbA1c в цельной крови.

Метод основан на конкурентном связывании общего гемоглобина и HbA1c со специфическими латексными частицами пропорционально их концентрации. Моноклональные антитела к HbA1c человека, перекрестно меченные антителами к IgG мыши, специфически взаимодействуют с HbA1c с развитием агглютинации латексных частиц. Степень агглютинации зависит от количества связанного HbA1c. Увеличение мутности смеси измеряется фотометрически. Процентное содержание HbA1c в пробах вычисляется по калибровочной зависимости, установленной при измерении калибраторов. Наряду с хорошими аналитическими характеристиками преимуществом турбидиметрического метода является возможность выполнения измерений на автоматических и полуавтоматических биохимических анализаторах, которые, как правило, уже имеются в лаборатории.

Сравнительно недавно был внедрен в практику метод прямого энзиматического определения гликозированной фракции HbA1c [4], который имеет ряд неоспоримых преимуществ. В этом методе гемолизат пробы

цельной крови подвергается воздействию бактериальной протеазы. В результате протеолиза высвобождаются аминокислоты, в том числе гликозированный валин бета цепей гемоглобина, который является субстратом для рекомбинантной фруктозилвалинооксидазы (FVO). Этот фермент избирательно расщепляет N-концевой валин с образованием перекиси водорода, концентрация которой измеряется с помощью пероксидазной реакции (рис. 2). Метод имеет сертификат NSGP (Direct Enzymatic HbA1c Assay, Diazyme Laboratories), минорные фракции гемоглобина, в том числе HbC, HbS, HbE, карбамиллированный и ацетилированный гемоглобины, а также лабильные фракции не влияют на результат анализа. Концентрация HbA1c рассчитывается с использованием линейной калибровки. В отличие от иммунотурбидиметрических тестов, в составе реагентов отсутствуют латексные частицы, что практически исключает загрязнение кювет и понижает требования к характеристикам биохимического автоанализатора.

В компактных портативных (РОСТ) анализаторах, как правило, используется метод аффинной хроматографии (борат-ионы), реже иммунохимические методы. Достоинством метода аффинной хроматографии является отсутствие интерференции с промежуточными продуктами гликозирования, а также получение корректных результатов при наличии минорных фракций гемоглобинов. Стоимость РОСТ-анализаторов относительно

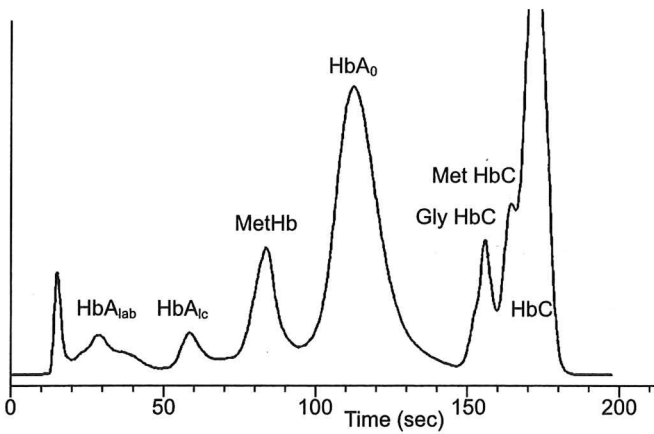


Рис. 3. Хроматограмма пробы с высоким содержанием гемоглобина HbA1c (распечатка анализатора «DS 360»)

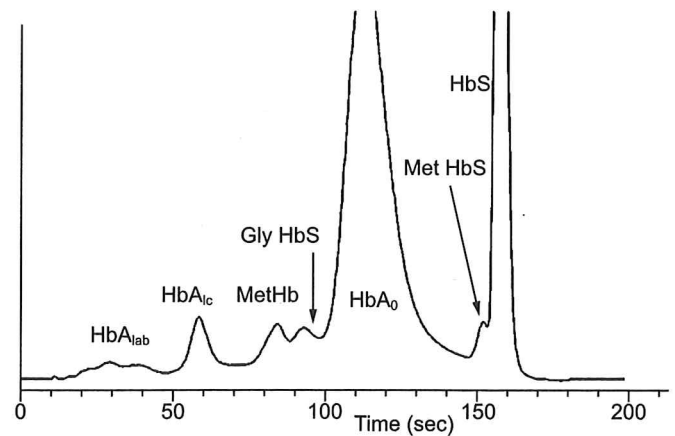


Рис. 4. Хроматограмма пробы с наличием гемоглобина HbAS (распечатка анализатора «DS 360»)

невысокая, однако лишь в отдельных моделях производителям удалось достичь приемлемых показателей точности и воспроизводимости результатов [5], как правило, за счет увеличения стоимости измерительных кассет (картриджей). В современных рекомендациях ADA (American Diabetes Association, США) указывается, что РОСТ-анализаторы нельзя использовать для диагностики сахарного диабета [6].

Специализированные ВЭЖХ-анализаторы позволяют наряду с измерением гликированной фракции определять минорные и патологические фракции гемоглобина. Учитывая современные тенденции развития демографической ситуации в России, нельзя оставлять без внимания факт повышения в общей популяции носителей минорных и патологических форм гемоглобина, для которых в ряде случаев может иметь место неверная интерпретация результатов измерения гликированной фракции. Наряду с высокой точностью измерений, преимуществом ВЭЖХ-анализаторов является наглядность получаемых результатов. Иногда только при анализе хроматограмм, наряду с измерением гликогемоглобина, удается впервые установить, что пациент является гетерозиготным носителем той или иной формы патологических гемоглобинов (рис. 3, 4). В этом случае, в зависимости от выраженности интерференции, сомнительный результат анализа необходимо верифицировать в «ручном режиме». При измерении проб таких пациентов с использованием других методов нельзя оценить вероятность некорректного результата. Поэтому было бы целесообразно при постановке диагноза «сахарный диабет» или в начале лечения один раз выполнить измерение HbA1c использованием ВЭЖХ-анализатора.

Принимая во внимание ряд очевидных преимуществ анализаторов ВЭЖХ, многие производители лабораторного оборудования освоили их массовое производство, а серийно выпускаемые модели постоянно совершенствуются в соответствии с растущими требованиями лабораторий. Компания «Drew Scientific» (Великобритания), являясь одним из известных производителей

оборудования для гематологических исследований, выпустила новый автоанализатор гликогемоглобина «DS 360», в котором процесс измерения максимально оптимизирован, а стоимость расходных материалов значительно снижена. Автосэмплер, рассчитанный на 36 пробирок, интегрирован в анализатор, прибор позволяет работать как с венозной, так и с капиллярной кровью, взятие аликвот осуществляется через зонд с прокалыванием крышки, содержимое пробирок автоматически перемешивается. Назначение заданий и передача результатов осуществляются через ЛИС. Встроенный сканер штрих-кодов, большой сенсорный дисплей и русифицированное меню облегчают работу лаборанта. Ресурс хроматографической колонки увеличен вдвое, а стабильность рабочих реагентов составляет один месяц. Производителю удалось соединить в «DS 360» все достоинства референсного метода анализа и высокую экономичность исследований. Прибор зарегистрирован в Росздравнадзоре, имеет сертификат соответствия ГОСТ и, без сомнения, займет достойное место в арсенале передовых лабораторий нашей страны.

#### Литература

1. NGSP. Factors that Interfere with HbA1c Test Results. <http://www.ngsp.org/factors.asp>.
2. Mongia S.K., Little R.R., Rohlfing C.L., Hanson S., Roberts R.F., Owen W.E., D'Costa M.A., Reyes C.A., Luzzi I., Rober W.L. Effects of Hemoglobin C and S Traits on the Results of 14 Commercial Glycated Hemoglobin Assays // *Am. J. Clin. Pathol.* 2008; 130: 136–140.
3. NGSP. List of NGSP certified methods (updated 3/12, listed by date certified). <http://www.ngsp.org/prog/methods.pdf> (Accessed March 2012).
4. Sakurabayashi I., Watano T., Yonehara S., Ishimaru K., Hirai K., Komori T., Yagi M. New enzymatic assay for glycohemoglobin // *Clin. Chem.* 2003; 49 (2): 269–274.
5. Lenters-Westra E., Slingerland R.J. Six of eight Hemoglobin A1c Point-of-Care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria // *Clin. Chem.* 2010; 56 (1): 44–52.
6. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations: Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes-2010 *Diabetes Care.* 2010; 33 (suppl. 1): 4–5.