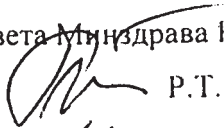


**Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования ММА им. И.М. Сеченова**

Утверждаю
Председатель секции
лабораторной диагностики (№ 25)
Ученого Совета Минздрава России
профессор  Р.Т. Тогузов
протокол № *12/7* 29.05.2002 г.

ГЕМИХРОМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

Информационно-методическое пособие

Москва
2002

Пособие для врачей клинической лабораторной диагностики «Гемихромный метод определения гемоглобина в крови» содержит: основные сведения по строению и свойствам гемоглобина, характеристику гемихромного метода, подробную методику и способ проведения анализа, сравнение гемихромного метода с гемиглобинцианидным, сведения об источниках возможных погрешностей. Объективной основой для внедрения в практику гемихромного метода определения гемоглобина является создание набора реагентов, не содержащего токсичных веществ. Разработанный набор реагентов для определения гемоглобина в крови гемихромным методом «Гемоглобин-Ново» рекомендован комиссией по лабораторным реагентам Комитета по новой медицинской технике Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 8 от 24 ноября 1997 г.) к серийному выпуску и применению в медицинской практике.

Показано, что гемихромный метод анализа по правильности, воспроизводимости и чувствительности сравним с гемиглобинцианидным методом, а по скорости проведения анализа (5 минут против 20 минут) и срокам годности трансформирующего раствора (6 месяцев против 3 месяцев) превосходит его.

Пособие предназначено для врачей клинической лабораторной диагностики, медицинских технологов, медицинских техников, биологов.

Организации-разработчики:

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования ММА им. И.М. Сеченова; ЗАО «Вектор-Бест».

Авторы:

Т.И. Лукичева – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории проблем клинико-лабораторной диагностики Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования ММА им. И.М. Сеченова;

В.И. Пушкова – к.х.н., заведующая лабораторией аналитической биохимии ЗАО «Вектор-Бест».

Рецензенты:

В.Н. Титов – д.м.н., профессор, руководитель лаборатории клинической биохимии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ;

Ю.Е. Михайлов – к.м.н., заведующий лабораторией Научного центра хирургии РАМН.

ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации гемоглобина в крови является наиболее распространенным исследованием в КДЛ. Это важнейший показатель (наряду с подсчетом эритроцитов) для оценки анемических состояний в клинической практике.

Предложено много методов определения гемоглобина, и степень надежности получаемых результатов варьирует в зависимости от применяемого метода. Международным комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) в 1963 г рекомендовано использовать в качестве стандартного метода гемиглобинцианидный, разработанный Драбкиным в 1932 г.

С развитием аналитических методов исследования появилась возможность заменить цианистые соединения более безопасными. В настоящем пособии изложен гемихромный метод определения гемоглобина, в котором превращение гемоглобина в окисленную форму осуществляется раствором, содержащим в качестве лизирующего агента додецилсульфат натрия. Данный метод, реализованный в коммерческих наборах реагентов, рекомендованных Минздравом России к применению в КДЛ, безопасен для сотрудников, проводящих анализ, и позволяет получать результаты определения гемоглобина с такой же степенью надежности, как и при использовании гемиглобинцианидного метода.

ПОКАЗАНИЯ И ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА

Показания к применению метода

Определение гемоглобина является одним из наиболее важных и распространенных исследований в клинической лабораторной диагностике. Оно проводится при различных заболеваниях, а также при контроле за лечением: всех видов анемий, связанных с кровопотерей, с нарушением кровообращения, с повышенным кроверазрушением; при первичных и вторичных эритроцитозах, эритремии, полицитемии и других заболеваниях человека.

Противопоказания к применению метода

Противопоказаний нет.

МАТЕРИАЛЬНО-ТЕХНИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ МЕТОДА

Для определения гемоглобина в крови гемихромным методом необходимо оборудование, имеющееся практически в каждой клинико-диагностической лаборатории. Внедрение гемихромного метода определения гемоглобина не требует технического переоснащения лабораторий приборами и оборудованием. Используемые приборы и оборудование серийно выпускаются отечественной и зарубежной промышленностью и разрешены к применению в широкой медицинской практике Минздравом РФ:

1. Гемоглобинометр фотоэлектрический типа «Гемолан-500», АО НИКИ МЛТ, рег. № 90/345-56; колориметр автоматический медицинский цифровой КАМЦ-1, АО НИКИ МЛТ, рег. № 81/823-65; фотометры: «Минилаб 501», рег. № 29-7-1838-2001; «Stat-Fax 1904», Awareness Technology Inc., США, рег. № 95/244; фотометр 5010, Boehringer Mannheim, Германия, рег. № 96/450; «Спекол 11», Карл Цейс, Германия, рег. № 21/7-38-86 и др.
2. Дозаторы жидкостей одноканальные объемом от 20 до 5000 мкл типа «ДПВ-1, ДПФ-1», ЗАО «СПб-Лабсистемс», рег. № 29/070506921613-01.
3. Встряхиватель медицинский типа «Вортекс», модель V 3, Elmi Ltd., Швеция-Латвия, рег. № 96/638.
4. Калькулятор.
5. Наборы реагентов для определения гемоглобина в крови гемихромным методом: набор реагентов для определения гемоглобина в крови гемихромным методом «Гемоглобин-Ново», ЗАО «Вектор-Бест», рег. № 29/25081197/0404-00; набор калибровочных растворов гемихрома «Гемосо-Ново», ЗАО «Вектор-Бест», рег. № 29/25081197/0403-00; набор контрольных растворов гемоглобина «Гемоконт-Ново», ЗАО «Вектор-Бест», рег. № 29/25050501/3535-02.

ОПИСАНИЕ МЕТОДА

Предлагаемый гемихромный метод определения гемоглобина в крови отличается от гемиглобинцианидного метода отсутствием цианистых соединений в составе рабочего реагента и заменой их на более безопасные соединения; быстротой проведения реакции и большей производительностью.

В этом разделе кратко изложены основные функции, строение и свойства гемоглобина и методы его определения.

Гемоглобин. Основные функции. Строение. Свойства

Принятые обозначения:

Hb – гемоглобин;

HbS – сульфогемоглобин;

HbF – фетальный гемоглобин;

HbChr – гемихром;

HbCN – гемиглобинцианид;

SDS – натрия додецилсульфат;

ПАВ – поверхностно-активные вещества.

Гемоглобин – основной дыхательный пигмент и главный компонент эритроцитов, выполняющий важные функции в организме человека: перенос кислорода от легких в ткани, выведение углекислого газа из организма и регуляция кислотно-основного состояния крови. Буферная система, создаваемая Hb, способствует сохранению рН крови в определенных пределах.

Гемоглобин – красный пигмент крови человека и животных, относящийся к хромопротеидам. Молярная масса гемоглобина составляет ~68 000. В крови человека в среднем содержится ~14,5% Hb, его общее количество ~750 г. Hb представляет собой сложный белок, белковый компонент в котором представлен глобином, небелковый – протетической группой. Протетическая группа в молекуле Hb представлена 4 одинаковыми железопорфириновыми соединениями, которые образуют гем. Молекула гема состоит из протопорфирина IX, связанного через 4 атома азота с железом двумя ковалентными и двумя координационными связями. Атом железа (II) расположен в центре гема и придает крови характерный красный цвет [1] (рис. 1).

Видовые различия Hb обусловлены химическим составом и строением белкового компонента – глобина. Молекулы Hb пред-

ставляют собой тетрамерные белки, отличающиеся строением полипептидных цепей, обозначаемых как α , β , γ , δ . В состав Hb входят две пары полипептидных цепей двух типов. Гемоглобины различных видов имеют различия во вторичной, третичной и четвертичной структуре, поэтому свойства их индивидуальны. Известно, что гемоглобин человека состоит из двух равных половин, каждая из которых образована двумя одинаковыми полипептидными цепями. В крови человека имеются Hb различных типов, отличающиеся по строению. Основным Hb крови взрослого человека является HbA (~97%), состоящий из $\alpha_2\beta_2$ цепей, а также HbA2 (~2,5%). Кроме того, в крови взрослого человека содержится до ~1,5% HbF. Кровь новорожденного ребенка состоит на ~80% из HbF, который к концу первого года жизни почти целиком заменяется на HbA.

Гемоглобин у новорожденных (фетальный) имеет структуру $\alpha_2\gamma_2$, что значительно обуславливает и различия Hb взрослых и детей: по спектральным характеристикам, электрофоретической подвижности, устойчивости к тепловой денатурации и др. [2, 3].

Незначительное изменение аминокислотного состава глобина, иногда замена лишь одной аминокислоты в полипептидной цепи Hb, полностью изменяет его свойства. Так, замена в HbA глутаминовой кислоты на валин приводит к превращению его в сульфогемоглобин – HbS, имеющий структуру α_2s_2 . Этот Hb, обнаруженный у больных серповидно-клеточной анемией, по своим свойствам отличается от нормального. После отдачи кислорода в тканях HbS превращается в плохо растворимую форму и выкристалливывается в

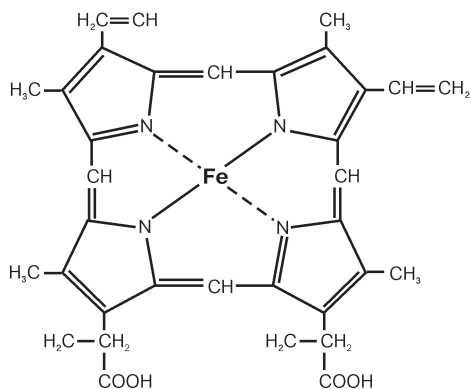


Рис.1. Строение гема.

эритроцитах, вызывая их деформацию (образование серповидных форм), это приводит к нарушению функций эритроцитов [4].

Гемоглобин – кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде и нерастворимое в спирте, эфире и хлороформе. В эритроцитах Hb находится в растворенном состоянии, несмотря на то, что его содержание более 30%. При изменении аминокислотного состава глобина может произойти и изменение его растворимости, как у HbS.

Растворы Hb окрашены в темно-красный цвет и имеют характерные спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой области спектра; изоэлектрическая точка Hb ~7. В кислой и щелочной среде Hb легко денатурируется, скорость денатурации различна у разных видов Hb. В кислой среде связь между гемом и глобином легко разрывается. Свободный гем легко окисляется кислородом воздуха до гематина, в котором атом железа трехвалентен [1].

Наиболее характерным свойством Hb является обратимое присоединение газов O₂, CO. Образовавшиеся при этом соединения называются оксигемоглобином и карбоксигемоглобином, соответственно. Реакция присоединения молекулярного кислорода не является истинным окислением Hb, так как валентность железа в геме при этом не изменяется, и эту реакцию правильнее называть оксигенацией. Истинное окисление Hb происходит только тогда, когда железо переходит в трехвалентное состояние.

В крови Hb находится, по крайней мере, в четырех формах: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, карбоксигемоглобин, метгемоглобин. В эритроцитах молекулярные формы Hb способны к взаимопревращению, их соотношение определено индивидуальными особенностями организма [1–4].

Методы анализа. Общая характеристика методов

Определение содержания Hb в крови человека является одним из самых важных и массовых показателей. Для его определения чаще всего анализируют производные Hb, образовавшиеся в процессе его окисления и присоединения к гему различных химических групп, приводящих к изменению валентности железа и окраски раствора.

Из «старых» методов, все еще применяемых в ряде лабораторий, остановимся на следующих: сапониновом и методе Сали [5, 6].

При использовании сапонинового метода тельца Гейнца не растворяются, раствор остается мутноватым, за счет чего может меняться спектр поглощения раствора, и ошибка при этом достигает 20–30%.

В методе Сали измеряется гематин, образовавшийся при взаимодействии Hb с соляной кислотой. Метод основан на визуальной оценке содержания Hb путем сравнения окраски исследуемой пробы со стандартными растворами солянокислого гематина. Ошибка метода достигает ~30%, на результаты определения влияют многие факторы: время реакции между Hb и соляной кислотой, которое может колебаться от 2 до 40 мин в зависимости от содержания белков крови; оттенок цвета геминхлорида, зависящий от содержания билирубина в крови; характер освещения и пр. Химические и спектрофотометрические методы имеют высокую точность и рекомендуются в качестве референсных, но из-за трудоемкости и значительной стоимости анализа для рутинных определений Hb не применяются. Для рутинных лабораторных исследований наиболее предпочтительны колориметрические методы, как наиболее дешевые, простые и быстрые в исполнении. Кровь человека – это нормальная смесь производных Hb с различными спектрами поглощения. При количественном определении Hb колориметрическими методами возникает проблема в выборе реагента, который превращал бы все производные Hb только в одну форму перед фотометрическим анализом. Лучшими методами, количественно превращающими Hb в его производные, оказались: гемиглобинцианидный (HbCN), гемихромный (HbChr) и гемиглобиназидный (HbN₃), дающие наименьшую ошибку определения при фотометрировании [7, 8]. Однако, гемиглобиназидный метод имеет ряд недостатков: конечный продукт превращения Hb – HbN₃ имеет слабый пик поглощения при $\lambda = 540$ нм, что не дает возможности использовать фотометры с широкополосными фильтрами; иногда возникают проблемы, связанные с мутностью растворов гемиглобиназида; раствор HbN₃ не хранится при комнатной температуре. Напротив, гемиглобинцианидный и гемихромный методы лишены этих недостатков и при дальнейших исследованиях им было отдано предпочтение.

Гемиглобинцианидный метод

Принцип гемиглобинцианидного метода основан на переводе всех форм Hb в одну – HbCN. Перевод Hb в HbCN осуществляется при его взаимодействии с трансформирующим раствором, содержащим феррицианид калия, цианид калия, дигидрофосфат калия и неионный детергент. Дигидрофосфат калия поддерживает уровень pH, при котором реакция проходит за 3–5 минут. Детергент усиливает

гемолиз эритроцитов и предотвращает мутность, связанную с белками плазмы. Феррицианид калия окисляет все формы Hb в метгемоглобин, который образует с цианистым калием HbCN, имеющий красноватый цвет, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации Hb в пробе [9].

Гемиглобинцианидный метод был одобрен Международным Комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) в 1963 г. [10, 11]. В нашей стране гемиглобинцианидный метод был рекомендован к применению Министерством здравоохранения в 1974 г.: Приказ Минздрава РФ № 960 от 5 октября 1974 г. «Об унификации клинических лабораторных методов исследований» п. 2.1.1. [Определение гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом с применением ацетонциангидрина, М., 1974, 29–34].

Основные достоинства гемиглобинцианидного метода:

- HbCN является стабильным производным Hb, и все имеющиеся в крови формы Hb, кроме сульфогемоглобина, могут быть быстро и количественно превращены в HbCN;
- спектр поглощения HbCN имеет максимум при $\lambda = 540$ нм, поэтому достаточная точность анализа возможна при измерении оптической плотности на фотометрах даже с неинтерференционными светофильтрами;
- растворы HbCN строго подчинены закону Ламберта-Бера при $\lambda = 540$ нм в широком диапазоне концентраций;
- калибровочный раствор HbCN устойчив в течение нескольких лет.

Калибровочный раствор гемиглобинцианида

Международный калибровочный раствор HbCN готовится от имени ICSH с относительной погрешностью, не превышающей 0,2%, и используется для аттестации коммерческих калибровочных растворов [12]. Требование к пределу допустимого значения систематической погрешности при определении концентрации гемоглобина в коммерческих калибровочных растворах $\leq \pm 2\%$ по сравнению с Международным калибровочным раствором.

Гемихромный метод

В настоящее время для определения Hb в крови разработан новый колориметрический метод, не содержащий в составе реагентов цианистых соединений, получивший название гемихромного.

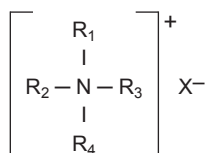
Принцип гемихромного метода

Принцип гемихромного метода основан на переводе всех форм Hb в одну – гемихром (HbChr). При взаимодействии Hb с трансформирующим раствором происходит его превращение в окисленную низкоспиновую форму – гемихром, имеющую красноватый цвет, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации Hb в пробе [13, 14].

Трансформирующие реагенты

Для перевода Hb в HbChr имеется несколько трансформирующих реагентов, отличающихся по составу:

- четвертичные аммониевые основания с ПАВ: т-октилфенокси-полиэтокси-этанол, полигидроксилаурилэтиловый эфир, с торговым названием Triton X-100 и Brij-35, соответственно, и другие, имеющие общую формулу [15, 16]:



где: R_1-R_3 – короткие алкильные группы, содержащие от 1 до 4 атомов углерода;
 R_4 – алкильная группа, содержащая от 12 до 16 атомов углерода;
 X – галоген.

- соли жирных кислот (C14–C20) с феррицианидом калия и ЭДТА в трис-буфере [17, 18];
- SDS [19, 20];
- другие агенты, не содержащие цианидов [21–28].

Из перечисленных трансформирующих реагентов лучшим является SDS. Максимальная скорость превращения Hb в HbChr отмечена именно при его взаимодействии с SDS. Полное превращение Hb происходит в пределах 5 мин. Высокая скорость реакции позволяет использовать данный метод в качестве экспресс-метода и применять для определения Hb при неотложных состояниях.

Калибровочный раствор гемихрома

До последнего времени в практике гемихромного метода отсутствовали калибровочные растворы гемихрома. Концентрацию Hb в крови определяли по-разному: по коэффициенту молярной экстинкции, который по данным различных авторов, находится

в пределах 9,86–10,45 [14, 16]; по калибровочным растворам различного состава [19, 20], но не гемихрома; по контрольному раствору гемоглобина [29, 30], аттестованному с высокой степенью точности.

Приказом Минздрава РФ № 45 от 07.02.2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» не рекомендовано использовать контрольные растворы Hb в качестве калибровочного раствора.

Контрольные растворы Hb не правомочно использовать по следующим причинам: с контрольным раствором необходимо проводить все операции, предусмотренные методикой определения Hb, вследствие чего неизбежны ошибки при его разведении; его невозможно использовать для калибровки приборов, так как это не готовый раствор HbChr, а проба крови, требующая соответствующей обработки и подготовки.

В 1998 г. Пупковой В.И. с соавторами разработан, запатентован и внедрен в практику набор реагентов для определения Hb гемихромным методом, в состав которого входит концентрат SDS (трансформирующий раствор) и калибровочный раствор гемихрома [31].

Набор зарегистрирован в Российской Федерации и внесен в государственный реестр медицинских изделий. Калибровочный раствор HbChr обладает достаточной стабильностью (более 1 года) и обеспечивает высокую точность измерения Hb при $\lambda = 540$ нм. Созданный калибровочный раствор HbChr соответствует всем требованиям, предъявляемым к калибровочным растворам: это стерильный водный раствор, разлитый в ампулы из светозащитного стекла, прозрачен, его спектральная чистота: A_{533}/A_{498} – в пределах 1,59–1,63; $A_{750} \leq 0,002$ (при длине оптического пути 10 мм).

Аттестация калибровочных растворов гемихрома проводилась опосредованно – относительно калибровочных растворов HbCN фирм «Boehringer Mannheim» (Германия) и «Ренам» (Россия). Калибровочные растворы фирмы «Ренам» были аттестованы относительно 6-го Международного калибровочного раствора гемиглобинцианида (ICSH) с концентрацией HbCN – 592 ± 1 мг/л (систематическая погрешность – 0,17%), изготовленного в Национальном институте общественного здоровья и охраны окружающей среды, г. Бетховен, Нидерланды. Допустимое значение систематической погрешности при аттестации коммерческих ка-

либровочных растворов не превышает $\pm 2\%$, поэтому и результаты определения концентрации Hb в одной пробе, полученные обоими методами, сопоставимы: их расхождение также не превышает $\pm 2\%$. При теоретическом молярном коэффициенте экстинкции HbCN, равном 11,00, молярный коэффициент экстинкции гемихрома составляет 10,16.

Контрольные растворы гемоглобина

Использование калибровочных растворов позволяет точно определить концентрацию Hb в крови, если при анализе не было допущено различных погрешностей. Погрешности анализа можно выявить при внутрилабораторном и межлабораторном контроле качества с помощью контрольных растворов Hb. Контрольные растворы Hb – это высоко очищенные имитаторы крови человека, не содержащие примесей, искажающих результаты анализа. Систематическая погрешность, допускаемая при определении концентрации Hb в контрольных растворах, не превышает $\pm 2\%$. Аттестация этих растворов проводится на фотометрах высокого класса точности при использовании дозаторов с погрешностью дозирования $\leq 1\%$.

Наличие наборов реагентов для определения Hb в крови: трансформирующего реагента, калибровочных растворов гемихрома и контрольных растворов Hb обеспечивает возможность получения результатов с погрешностью, не превышающей $\pm 2\%$.

Основные достоинства гемихромного метода [13, 32]:

- гемихром – стабильное производное гемоглобина, и все имеющиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbChr;
- максимум спектра поглощения HbChr вблизи $\lambda = 540$ нм (533 нм), поэтому достаточная точность анализа возможна при измерении оптической плотности на фотоэлектроколориметрах;
- растворы HbChr строго подчинены закону Ламберта-Бера при $\lambda = 540$ нм в широком диапазоне концентраций;
- калибровочный раствор HbChr устойчив в течение 1,5 лет;
- трансформирующий реагент не ядовит и безвреден: в его составе не содержится цианистых и других токсичных соединений.

Молярный коэффициент экстинкции HbChr при $\lambda = 540$ нм равен 10,16.

Определение гемоглобина в крови гемихромным методом

1. Принцип метода

При взаимодействии гемоглобина с трансформирующим раствором, содержащим додецилсульфат натрия, происходит превращение всех форм гемоглобина в окисленную низкоспиновую форму – гемихром, имеющую красноватый цвет, интенсивность которого, измеренная при длине волны 540 нм, прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе.

2. Реагенты

2.1. Набор реагентов для определения гемоглобина в крови гемихромным методом «Гемоглобин-Ново», ТУ 9398-281-23548172-98, ЗАО «Вектор-Бест».

В состав набора входят:

2.1.1. Реагент – концентрированный раствор (6%) натрия додецилсульфата, 4 флакона (по 10,0 мл).

Конечная концентрация натрия додецилсульфата в трансформирующем растворе (растворе рабочего реагента) составляет 0,06%.

2.1.2. Калибратор – калибровочный раствор гемихрома, соответствующий концентрации гемоглобина ~140 г/л, готовый к использованию, 1 ампула, 5,0 мл.

Точное значение концентрации гемоглобина в калибраторе указано на этикетке ампулы и в «Аналитическом паспорте».

2.1.3. Приготовление рабочего раствора реагента – трансформирующего раствора.

При наличии осадка в Реагенте (п. 2.1.1.) флакон, не вскрывая, выдержать в горячей воде (температура 50–60°C) до полного растворения осадка.

Для приготовления рабочего реагента следует использовать дистиллированную воду, соответствующую требованиям ГОСТ 6709-72, или свежепрокипяченную дистиллированную воду, охлажденную до комнатной температуры (далее по тексту – дистиллированная вода).

Содержимое флакона с Реагентом (п.2.1.1.) количественно перенести в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавить дистиллированную воду до метки, перемешать, избегая вспенивания.

Трансформирующий раствор прозрачен и бесцветен, имеет оптическую плотность, измеренную против воды при $\lambda = 540$ нм (при длине оптического пути 10 мм), равную 0.

Если в процессе хранения рабочего раствора появляется осадок, это указывает на плохое качество воды, используемой для его приготовления, или недостаточную чистоту посуды. Такой раствор непригоден.

Аналитические характеристики набора реагентов «Гемоглобин-Ново»:

- линейная область калибровочного графика определения концентрации гемоглобина – в диапазоне 30–200 г/л (клинически значимый диапазон измерения);
 - отклонение от линейности – не более 2%;
 - чувствительность определения – не менее 25 г/л;
 - коэффициент вариации результатов измерений – не более 2%.
- Качество набора может проверяться по отечественным или импортным контрольным растворам с известным одержанием гемоглобина.

Условия хранения и эксплуатации набора:

- хранение набора должно производиться при температуре (2–8)°С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности, допускается хранение набора при комнатной температуре (18–25)°С не более 10 суток;
- срок годности набора – 12 месяцев;
- раствор рабочего реагента можно хранить при комнатной температуре (18–25)°С не более 6 месяцев;
- калибратор после вскрытия ампулы можно хранить при температуре (2–8)°С в плотно закрытом виде не более 3 суток.

Для правильного определения Hb в крови необходимы также следующие наборы:

2.2. Набор калибровочных растворов гемихрома «Гемосо-Ново», ТУ 9398-280-23548172-98, ЗАО «Вектор-Бест»; набор используется для построения калибровочного графика.

В состав набора входят:

2.2.1. Калибровочные растворы гемихрома, соответствующие различным концентрациям гемоглобина ~60; 100; 140; 180 г/л, готовые к использованию, 4 ампулы из светозащитного стекла (по 5,0 мл).

Точные значения концентрации гемоглобина указаны на этикетках ампул и в «Аналитическом паспорте» набора.

Аналитические характеристики набора калибровочных растворов гемихрома «Гемосо-Ново»: спектральная чистота калибровочных растворов при длине волны 750 нм – $A_{750} \leq 0,002$; отношение оптических плотностей при длинах волн 533 и 498 нм – A_{533}/A_{498} в преде-

лах – 1,59–1,63. Допустимое отклонение концентрации гемихрома, соответствующей определенной концентрации гемоглобина в калибровочных растворах, от аттестованного значения – не более $\pm 2\%$; коэффициент вариации результатов определения гемоглобина каждой концентрации – не более $\pm 2\%$.

Условия хранения и эксплуатации набора:

- хранение набора должно производиться при температуре (2–8)°С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности;
- допускается хранение набора при комнатной температуре (18–25)°С не более 10 суток.
- срок годности набора – 12 месяцев;
- калибровочные растворы после вскрытия ампул можно хранить при температуре (2–8)°С плотно закрытыми не более 3 суток.

2.3. Набор контрольных растворов гемоглобина «Гемоконт-Ново», ТУ 9398-220-23548172-01, ЗАО «Вектор-Бест».

В состав набора входят:

2.3.1. Контрольные растворы с различной концентрацией гемоглобина (гемолизаты эритроцитов) №№ 1–3:

- №1 – с концентрацией гемоглобина – 70–90 г/л;
- №2 – с концентрацией гемоглобина – 110–130 г/л;
- №3 – с концентрацией гемоглобина – 150–170 г/л,

содержащие натрий хлористый, 0,9%; этиленгликоль, 30%; готовые к использованию, 3 флакона (по 2,0 мл).

Точные значения концентрации гемоглобина указаны на этикетках флаконов и в «Аналитическом паспорте» набора.

Аналитические характеристики набора «Гемоконт-Ново»:

- допустимое отклонение концентрации гемоглобина от аттестованного значения для каждой концентрации – не более $\pm 2\%$;
- коэффициент вариации результатов определения гемоглобина в контрольных растворах каждой концентрации – не более $\pm 2\%$.

Условия хранения и эксплуатации набора:

- хранение набора должно производиться при температуре (2–8)°С в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности, допускается хранение набора при комнатной температуре (18–25)°С не более 10 суток;
- срок годности набора – 18 месяцев;
- контрольные растворы гемоглобина после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре (2–8)°С не более 3 месяцев.

3. Материал для исследования

- Капиллярная кровь, полученная при свободном токе после прокола пальца скарификатором.
- Венозная кровь: наложение жгута не более чем на 1 мин. В кровь в качестве антикоагулянтов могут быть добавлены – ЭДТА, гепарин, оксалаты аммония или калия. Венозную кровь, взятую с этими антикоагулянтами, можно хранить 48 час при 4°C или 24 час при комнатной температуре (18–25)°C.

3.1. Преаналитическая фаза

Заведомо неправильный результат может быть получен:

- при взятии капиллярной крови при оказании чрезмерного давления или выжимания крови, вызывающего выход межклеточной жидкости, которая разбавляет пробу крови и приводит к ошибочно низкой концентрации Hb;
- при наложении жгута на руку более чем на одну минуту, это может привести к пролонгированному сосудистому стазу и ошибочно высокой концентрации Hb в венозной крови;
- при использовании неомогенной пробы, полученной при недостаточном перемешивании;
- при липимии.

4. Ход определения

4.1. Построение калибровочного графика

Калибровку измерительного прибора и построение калибровочного графика следует проводить для всех приборов, используемых для определения Hb в лаборатории. Для построения калибровочных графиков используют коммерческие наборы калибровочных растворов HbCht четырех концентраций «Гемосо-Ново».

Перед измерением калибровочных растворов кюветы тщательно моют и проверяют их чистоту, измеряя оптическую плотность дистиллированной воды. Необходимо добиваться оптической плотности измерительной кюветы с дистиллированной водой относительно холостой кюветы с дистиллированной водой равной 0 при $\lambda = 540$ нм и длине оптического пути 10 мм. Чистота измерительной кюветы значительно влияет на точность измерения оптической плотности растворов Hb: так, погрешность измерения в 0,004 ед.опт.пл. дает ошибку измерения Hb до $\pm 2\%$.

Последовательно вносят в кювету (с длиной оптического пути 10 мм) фотометра, содержимое каждой ампулы с калибровочным

Схема определения

Растворы	Холостая проба, мкл	Опытная проба, мкл	Контрольная проба, мкл
1. Кровь	–	20	–
2. Контрольный раствор гемоглобина	–	–	20
3. Трансформирующий раствор	5000	5000	5000

раствором, предварительно сполоснув ее исследуемым раствором. Оптическую плотность растворов измеряют против дистиллированной воды при $\lambda = 540$ (520–560) нм и температуре (18–25)°С. На миллиметровой бумаге строят калибровочный график зависимости оптической плотности (ось «у») от концентрации Hb (ось «х») по 4 точкам измеренной оптической плотности, соответствующей определенной концентрации Hb. График должен представлять собой прямую линию, выходящую из начала координат. Полученный график используют для расчета концентрации Hb в пробах крови.

Калибровочный график следует строить не реже 1 раза в неделю.

4.2. Проведение анализа

Определение концентрации гемоглобина проводят по схеме, приведенной в таблице 1.

Пробы тщательно перемешивают на встряхивателе или вручную до достижения гомогенного раствора и выдерживают при комнатной температуре в течение 5 мин. Далее измеряют оптическую плотность опытной пробы на фотометре, гемоглобинометре или спектрофотометре в кювете с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 540 нм против холостой пробы. Окраска растворов устойчива не менее 5 час.

4.3. Расчет результатов

Концентрацию Hb (С) в г/л рассчитывают:

1. по калибровочному графику;
2. по фактору (формула 3, см. далее).

4.3.1. Расчет результатов по калибровочному графику

На оси ординат «у» находят точку, соответствующую значению оптической плотности измеренной пробы, из которой восстанавли-

вают перпендикуляр до пересечения с линейной частью калибровочного графика. Из точки пересечения проводят перпендикуляр к оси «х», точка пересечения которого с осью «х» соответствует концентрации Нв в пробе.

4.3.2. Расчет результатов по фактору

Значение фактора может быть определено одним из двух способов.

4.3.2.1. После построения калибровочного графика можно рассчитать фактор для данного измерительного прибора. Для этого рассчитывают фактор (f_i) для каждого калибровочного раствора по формуле:

$$f_i = \frac{C_i}{A_i} \quad (1),$$

где: C_i – концентрация Нв (указана на этикетке), соответствующая концентрации Нв в i -той ампуле, г/л;

A_i – оптическая плотность раствора исследуемой пробы, ед.опт.пл.

При условии, что полученные значения каждого фактора не различаются между собой на величину более $\pm 2\%$, их усредняют по формуле:

$$\bar{f} = \frac{1}{n} \sum f_i \quad (2),$$

где: n – число усредняемых факторов;

f_i – значение фактора для i -той ампулы, г/л ед.опт.пл⁻¹.

Полученное среднее арифметическое значение фактора для данного измерительного прибора используют при расчете концентрации Нв (C) в г/л по формуле:

$$C = A \times f \quad (3),$$

где: A – оптическая плотность раствора исследуемой пробы, ед.опт.пл.;

f – среднее арифметическое значение факторов, г/л ед.опт.пл⁻¹.

4.3.2.2. На линейной части калибровочного графика выбирают точку n и проводят перпендикуляр к оси «х», определив соответствующую ей концентрацию C_n , и к оси «у», определив таким образом соответствующую этой концентрации величину оптической плотности A_n .

Затем рассчитывают фактор по формуле (1) и используют его в расчете результатов по формуле (3).

Значение фактора необходимо периодически (не реже одного раза в неделю) перепроверять по калибровочному раствору, прилагаемому к набору «Гемоглобин-Ново», или по калибровочным растворам из набора «Гемосо-Ново».

4.4. Проведение внутрилабораторного контроля качества

При проведении исследований возможно возникновение различных погрешностей (систематических и случайных), связанных с ошибками операторов; приборными ошибками; неточностью пипеток; несоблюдением времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности; несоблюдением температурного режима; неомогенностью пробы и др. Эти и другие погрешности выявляются с помощью контрольных растворов Hb при проведении внутрилабораторного контроля качества в соответствии с приказом № 45 от 07.02.2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации» (приложение 2).

Определение Hb следует проводить с использованием точно калиброванных пипеток. Особое внимание следует уделять истинному объему крови (20 мкл), отбираемому микропипетками, поскольку погрешность в 1 мкл при последующем разведении крови трансформирующим раствором в 251 раз дает погрешность определения Hb до 5%.

Большое влияние на правильность определения Hb в крови оказывает техника дозирования пробы крови [33]. Как показали исследования, оптимальным способом является способ обратного дозирования. При этом наилучшие результаты достигаются в случае предварительного промывания наконечника дозируемым раствором. При работе с механическими дозаторами следует обращать внимание на наконечник: он должен быть новым (либо «абсолютно» чистым), иметь узкое отверстие и хорошую стекаемость. Если результат определения концентрации Hb в контрольных растворах попадает в диапазон указанных в паспорте концентраций, это свидетельствует о том, что при проведении анализа погрешность определения менее $\pm 2\%$. Если результат определения концентрации Hb не попадает в указанный диапазон – при проведении анализа были допущены систематические или случайные ошибки.

Систематические ошибки:

- неправильная калибровка измерительного прибора (составляющая до 40% от общего числа допускаемых ошибок). Она может быть связана: с ошибками при построении калибровочного графика; ошибками при расчете фактора; использованием некачественных калибровочных растворов; нелинейностью характеристик измерительного прибора, нестабильностью прибора;
- использование неточно калиброванных пипеток, что приводит к ошибкам разведения, составляющим ~50% от общего числа ошибок;
- неправильный выбор способа дозирования пробы.

Случайные ошибки:

– ошибки оператора вследствие: нарушения рекомендуемого температурного режима; несоблюдение необходимого времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности; использование некачественных или неправильно приготовленных трансформирующих реагентов; неправильное измерение или расчет.

Кроме того, грубые погрешности могут возникать при неправильном взятии проб. Некоторые погрешности могут быть связаны с составом крови (см. «Преаналитическая фаза»).

Следует исключить возможные систематические ошибки, связанные с влиянием указанных факторов, но если и тогда результат определения Hb в контрольном растворе не попадает в диапазон допустимых значений, следует обратить внимание на возможность появления случайных ошибок. Так, несоблюдение температурного режима (использование контрольных, калибровочных растворов или трансформирующего реагента, имеющих температуру, отличающуюся от комнатной температуры (18–25)°С, может приводить как к заниженным, так и к завышенным результатам). Несоблюдение времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности занижает результаты, так как оптическая плотность будет ниже максимальной. При получении правильных и воспроизводимых результатов определения Hb в контрольных растворах можно приступать к определению его в крови.

Кратко суммируем источники возможных ошибок при определении Hb [29, 33, 34]: факторы, влияющие на получение правильного результата на преаналитической фазе; использование некалиброванных пипеток и несовершенная техника дозирования проб крови; применение неуправляемого оборудования, не обеспечивающего линейную зависимость оптической плотности от концентрации Hb в требуемой области измерений; нестабильность прибора; отсутствие внутрилабораторного контроля качества; ошибки при построении калибровочных графиков и расчете факторов; использование контрольных растворов Hb низкого качества; недостаточная чистота кювет, особенно проточных; ошибки оператора.

Пределы допускаемых значений погрешностей при определении гемоглобина в крови в соответствии с критериями, рекомендованными в приказе МЗ РФ № 45 от 07.02.2000 г. (Приложение 3, таблица 1):

- для относительного смещения ($\pm B, \%$) – B_{10} (в 10 аналитических сериях) – не более 5%; B_{20} (в 20 аналитических сериях) – не более 4%;
- для коэффициента общей аналитической вариации (CV, %), соответственно: CV_{10} 5%, CV_{20} – 4%.

Возраст	Концентрация Hb, г/л	Возраст	Концентрация Hb, г/л
1	2	1	2
Кровь: 18–20 нед.:	115±7,8	12 мес.:	113–141
21–22 нед.:	123±8,9	0,5–2 года:	110–140
23–25 нед.	124±7,7	2–5 лет:	110–140
26–30 нед.:	134±11,7	5–9 лет:	120–150
Кровь из пуповины	135–205	9–12 лет:	115–145
0,5 мес.:	134–198	12–14 лет, М.:	120–160
1 мес.:	107–171	Ж.:	115–150
2 мес.:	94–130	15–17 лет, М.:	117–166
4 мес.:	103–141	Ж.:	117–153
6 мес.:	111–141	18–44 г., М.:	132–173
9 мес.:	114–140	Ж.:	117–155
		45–64 г., М.:	131–172
		Ж.:	117–160
		65–74 г., М.:	126–174
		Ж.:	117–161

5. Нормальные величины концентрации гемоглобина

Нормальные величины: у мужчин 130–160 г/л; у женщин – 120–140 г/л.

Референтные пределы [35] – кровь плода. Забор крови осуществляют чрезкожно из v. umbilicalis.

Концентрация Hb ниже у недоношенных новорожденных, чем у доношенных новорожденных. В течение дня концентрация Hb снижается на ~10% в промежутке времени от 17 до 7 час утра, а также после еды. Снижение концентрации Hb от нормальных величин на ~6% наблюдается при взятии пробы в положении лежа. Незначительное, но диагностически значимое, снижение нижнего предела нормальных величин Hb встречается у мужчин возрастной группы 65–74 года.

6. Клиническое значение

Снижение концентрации Hb: все виды анемий, связанных: с кровопотерей, с нарушением кровообразования, с повышенным кроверазрушением; гипергидратация.

Повышение концентрации Hb: первичные и вторичные эритроцитозы, эритремия, полицитемия, гемоконцентрация: при дегидратации, ожогах, кишечной непроходимости, упорной рвоте; длительном пребывании на больших высотах, при чрезмерной физической нагрузке или возбуждении; сердечно-сосудистой патологии, обычно врожденной, приводящей к значительному венозному сбросу; заболевания легких, приводящие к снижению легочной перфузии, плохой аэрации легких; хроническое химическое воздействие нитритов, сульфаниламидов, вызывающих образование мет- и сульфогемоглобина.

7. Факторы, влияющие на колориметрические методы анализа Hb

Повышение Hb: гипертриглицеридемия, лейкоцитоз (количество лейкоцитов более $25 \times 10^9/\text{л}$), прогрессирующие заболевания печени, наличие легко преципитирующихся глобулинов (при миеломной болезни или при макроглобулинемии Вальденстрема).

Понижение Hb: у заядлых курильщиков вследствие образования неактивного HbCO.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

При испытаниях гемихромного метода было показано, что в интервале концентраций Hb от 40 до 200 г/л калибровочные графики гемиглобинцианида и гемихрома представляют собой прямые линии, выходящие из начала координат, а близкие углы их наклона в линейной части указывают на сопоставимость результатов обоих методов (рис.2).

Спектр поглощения HbChr в области 510–570 нм имеет большое сходство со спектром поглощения HbCN, что видно на рис. 3.

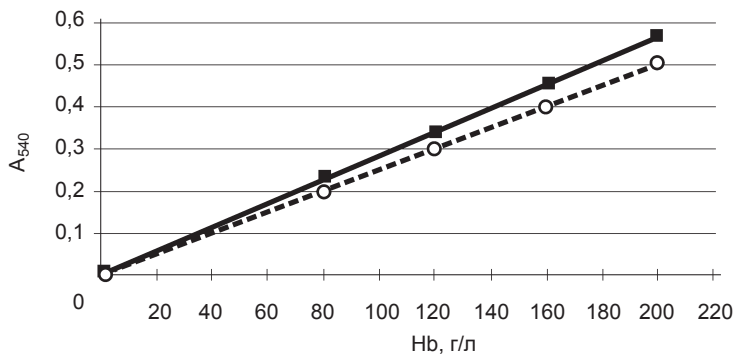


Рис. 2. Калибровочные графики гемиглобинцианида (верхняя линия) и гемихрома.

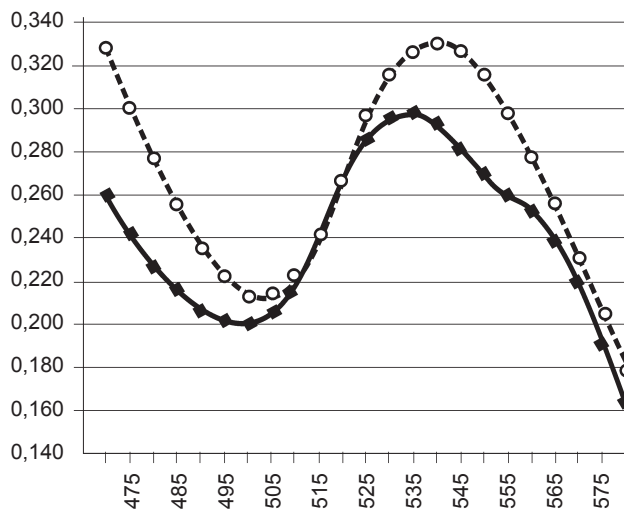


Рис. 3. Спектры поглощения гемиглобинцианида (верхняя линия) и гемихрома.

Порядок выполнения анализа и основные характеристики наборов, основанных на гемихромном и гемиглобинцианидном методах, не имеют принципиальных различий, что видно из таблицы 2.

Таким образом, гемихромный метод определения Hb в крови обладает всеми достоинствами гемиглобинцианидного метода, которые дополняются отсутствием в составе трансформирующего реагента высокотоксичных цианидов и других ядовитых веществ, увеличением срока годности трансформирующего реагента, сокращением времени анализа.

Таблица 2

Сравнение основных характеристик наборов для определения Hb гемиглобинцианидным и гемихромным методами анализа

№ п/п	Показатели	Наборы, основанные на гемиглобинцианидном методе	Наборы, основанные на гемихромном методе
1.	Измерение оптической плотности при длине волны, нм	540	540
2.	Линейная область измерения, г/л	30–200	30–200
3.	Чувствительность, г/л	25	25
4.	Соотношение «реагент:проба»	251:1	251:1
5.	Коэффициент вариации, %	2,0	2,0
6.	Температура проведения анализа, °С	18–25	18–25
7.	Срок годности трансформирующего раствора, мес.	3	6
8.	Время анализа, мин	20	5
9.	Наличие в составе набора цианистых соединений	+	–

Таблица 3

Сравнение двух методов при определении концентрации гемоглобина в контрольных растворах гемоглобина

Контрольный раствор гемоглобина	Аттестованная концентрация Hb, г/л	Получено Hb, г/л, гемихромным методом, набор «Гемоглобин-Ново»			Получено Hb, г/л, гемиглобинцианидным методом, набор «Диагем-Т»		
		n	$\bar{x} \pm S$	CV, %	n	$\bar{x} \pm S$	CV, %
Диагем-К, «Ренам»							
№ 1	78,30 (76,7–78,3)	10	78,25 ± 0,53	0,68	10	78,33 ± 0,76	0,97
№ 2	121,30 (118,9–123,7)	10	121,47 ± 0,76	0,97	10	121,09 ± 1,01	0,83
№ 3	160,50 (157,3–163,7)	10	160,55 ± 1,13	0,70	10	160,54 ± 1,74	1,08

При определении Hb двумя методами Ахрем А.А. с соавторами показали, что большую точность (и меньшую s) дает гемихромный метод. Авторы предполагают, что SDS способствует солиubilизации (растворимости) мембранных частиц и препятствует адсорбции белка на стекле пробирок и кювет, тем самым обеспечивается высокая точность анализа.

Сравнение результатов оценки правильности и воспроизводимости гемиглобинцианидного и гемихромного методов определения гемоглобина в контрольных растворах представлено в таблице 3.

Правильность и воспроизводимость результатов определения гемоглобина в контрольных растворах гемихромным и гемиглобинцианидным методами удовлетворительны, коэффициенты общей аналитической вариации и величины относительного смещения значительно ниже рекомендуемых критериев и сопоставимы. При определении концентрации гемоглобина в крови больных различными заболеваниями (анемии, заболевания печени, крови, почек и др.) гемиглобинцианидным методом (метод «х») и гемихромным методом (метод «у»), в пределах концентраций 67,0–193,0 г/л были получены сопоставимые результаты (таблица 4).

В табл. 5 приведены данные, полученные в Гематологическом научном центре РАМН (А.А. Козловым и А.Л. Берковским) при сравнительных испытаниях 3 наборов, основанных на гемихромном методе анализа («Гемоглобин-Ново») и набора, основанного на гемиглобинцианидном методе («Диагем-Т», «Ренам»). Определенный этими авторами коэффициент вариации параллельных определений в пробах с концентрациями Hb ~80, 120 и 160 г/л во всех случаях был ниже 1%.

Результаты определения Hb двумя методами различаются менее, чем на 2%. Сравнительная оценка результатов определения концентрации Hb в крови набором «Гемоглобин-Ново» на фотометре 4010 фирмы «Boehringer Mannheim» и гемиглобинцианид-

Таблица 4

Сравнение результатов при определении концентрации гемоглобина гемиглобинцианидным и гемихромным методами в крови пациентов

Метод	Количество результатов	Получено Hb при определении $\bar{x} \pm S$, г/л	Корреляция r	Регрессия $y=a+bx$	Парный тест Стьюдента t (p)
HbCN (метод «х»)	90	135,83 \pm 29,95	0,9666	-8,32 + 1,05x	0,9375 ($p=0,35$)
HbCr (метод «у»)	90	134,99 \pm 32,69			

ным методом на гематологическом анализаторе «System-9000» фирмы «Sepono», проведенная на кафедре клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последиplomного образования (М.Е. Почтарь и Л.А. Романова), а также на анализаторе «Микрос, АВХ» в Кардиологическом научно-производственном

Таблица 5

Сравнение результатов определения концентрации гемоглобина в крови, полученных с использованием наборов реактивов «Гемоглобин-Ново» и «Диагем-Т»

Гемоглобин-Ново (гемихромный метод)			Диагем-Т (гемиглобинцианид- ный метод)		Статисти- ческие показатели различий двух мето- дов		На- личие досто- верных различ- чий	
A ₅₄₀ , ед.опт.пл.			Концен- трация Hb, г/л	A ₅₄₀ , ед.опт.пл.	Концен- трация Hb, г/л	t		p
Набор 1	Набор 2	Набор 3		Набор 1				
0,236±0,001	0,235±0,001	0,233±0,001	88,0±0,4	0,229±0,003	86,1±1,0	1,852	<0,1	нет
0,345±0,001	0,344±0,001	0,345±0,001	134,5±0,6	0,353±0,006	132,1±1,6	1,400	<0,1	нет
0,441±0,003	0,439±0,003	0,439±0,003	171,1±0,9	0,464±0,001	170,7±0,6	0,284	<0,5	нет

Таблица 6

Сравнительная оценка определения концентрации Hb в крови двумя методами

Метод	Прибор	
	System-9000	Фотометр 4010
	гемиглобинцианидный	гемихромный
Концентрация Hb в пробах крови, г /л	81	80,7
	117	119,3
	98	96,2
	150,3	150,6
	149	151,3
	138,2	140,2
	94	94,8
	134,3	133,6
	150,2	151,4
	157,4	156,9
Коэффициент корреляции	0,980	0,987

комплексе МЗ РФ (В.Н. Титов и Т.И. Коткина) показала, что результаты, полученные обоими методами, сопоставимы, а коэффициенты корреляции двух методов составляют 0,98 и 0,99, соответственно (таблица 6).

Таким образом, проведенные в ряде медицинских учреждений Минздрава России испытания набора «Гемоглобин-Ново» полностью подтвердили, что гемихромный метод определения Hb в крови, реализованный в наборе реагентов «Гемоглобин-Ново» с применением наборов калибровочных растворов гемихрома «Гемосо-Ново» и контрольных растворов гемоглобина «Гемоконт-Ново», позволяет получать правильные и воспроизводимые результаты определения Hb с такой же степенью надежности, как и традиционный гемиглобинцианидный метод.

Предлагаемый в данном пособии гемихромный метод определения Hb в крови стал результатом изучения, обобщения материалов, опубликованных в отечественных и зарубежных изданиях, и собственных экспериментальных данных. Материалы пособия были доложены на научно-практических конференциях «Новые методы диагностики, лечения заболеваний в здравоохранении» в г. Новосибирске в 1998 и 2001 гг.; «Актуальные проблемы теоретической и прикладной биохимии», в г. Ижевске в 2001 г.; на научно-практической конференции в Вологде в 2001 г. Фрагменты материалов опубликованы в Информационно-методическом пособии «Определение гемоглобина в крови» (Кольцово, 2001 г.); в Информационных бюллетенях «Новости «Вектор-Бест»» (№ 4, 1998 г., № 1, 2000 г.).

Для внедрения в практику гемихромного метода разработаны: набор реагентов для определения гемоглобина гемихромным методом «Гемоглобин-Ново» и набор калибровочных растворов гемихрома «Гемосо-Ново», а для контроля правильности и воспроизводимости результатов – набор контрольных растворов гемоглобина «Гемоконт-Ново». Данные наборы широко используются в практике КДЛ: так, в 2001 г. наборами пользовались в 217 организациях 41 региона России. Наличие полного комплекта наборов для гемихромного метода должно привести к существенному улучшению результатов определения гемоглобина в крови.

Метод позволяет правильно и с высокой точностью определять концентрацию гемоглобина в крови аналогично гемиглобинцианидному методу.

Проведение анализа всего за 5 мин на любом фотометрическом оборудовании с длиной волны 540 нм позволяет использовать дан-

ный метод в качестве экспресс-метода при неотложных состояниях, что приводит к ускорению диагностики заболеваний и назначения пациенту соответствующего лечения.

Гемихромный метод активно используется в Японии, в США и др. странах при определении гемоглобина на гематологических анализаторах; никаких препятствий для его использования при работе на гематологических анализаторах нет и у нас в стране. Таким образом, гемихромный метод определения гемоглобина в крови является менее токсичным, быстрым и экономичным. Метод рекомендуется к повсеместному использованию в КДЛ на любых типах фотометрического и гематологического оборудования на всей территории России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. // Биологическая химия, М., Медицина, 1990.
2. Белки, пер. с англ., под ред. Г. Нейрата и К. Бейли, т. 3, ч. 1, М., 1958.
3. Гауровитц Ф. // Химия и биохимия белков, М., 1953.
4. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода, М., 1957.
5. Справочник по клиническим методам исследования, под ред. Е.А. Кост, 2-е изд., М., 1975.
6. Медицинские лабораторные технологии и диагностика, под ред. А.И. Карпищенко. Справочник, т. 1, С.-Петербург, 1998.
7. Авдеева Н.А. Оценка методов определения гемоглобина, применяемых в клинико-диагностических лабораториях. // Лаб. дело. 1987, № 10, 786–788.
8. Tentory L., Salvaty F.A. Hemoglobinometry in Human Blood. // Methods in enzymology. 1981, v. 76, 707–715.
9. Drabkin David L., Austin J. Harold. Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. // J. Biol. Chem., 1935, 51–65.
10. International Committee for Standardisation in Haematology: Recommendation for Haemoglobinometry in Human Blood. // Brit. J. Haemat. 1967, v. 13, 71–75.
11. International Committee for Standardisation in Haematology. // J. Clin. Pathol., 1978, 31, 139.
12. Haemoglobin Cyanide Standard Preparation. International Committee for Standardization in Haematology. // Wld Hlth. Org. Tech Rep. 1967, Ser. 384, 14.
13. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Киселева С.И. и др. Определение гемоглобина крови с использованием додецилсульфата натрия. // Лаб. Дело, 1989; № 5, 13–15.
14. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Кисель М.А., Киселева С.И. Обратимое превращение гемоглобина в гемихром под действием жирных кислот. // Докл. АН СССР, 1986; т. 290, № 4, 1003–1006.
15. Sakata Takashi. Реагент для измерения лейкоцитов и гемоглобина в крови. Патент JP 2897781 B2 4013969A, G01 N 33/72, 02.05.90.
16. Антонов В.С., Власенко В.И., Ованесов Е.Н. Способ определения концентрации гемоглобина в крови и реактив для лизирования клеток крови. Патент РФ № 2052197, G 01 N 33/48, опубл. 10.01.96, Бюл. № 1.
17. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Киселев М.А. и др. Способ определения концентрации гемоглобина в крови. Патент РФ № 1386901, G 01 N 33/48, опубл. 15.01.90, Бюл. № 2
18. Kim Young Ran, Stroupe Stephen D. Свободный от цианида реагент и способ определения гемоглобина. Патент US 5612223 A, 6 G 01 N 33/523, 31.08.95.
19. Антонов В.С., Власенко В.И., Ованесов Е.Н. Способ определения концентрации гемоглобина в крови, реактив-комплексобразователь и раствор

- калибратор для его осуществления. Патент РФ № 2054173, G 01 N 33/48, опубл. 10.02.96, Бюл. № 4.
20. Власенко В.И., Прищепа М.И. Способ определения концентрации гемоглобина в крови. Патент РФ № 2044319, G 01 N 33/49, опубл. 20.09.95, Бюл. № 26.
 21. Wong Show-Chu, Khoo Sylvia. Способы и реагенты для бесцианидного определения гемоглобина и лейкоцитов в цельной крови. Патент US 94275466, G 01 N 33/72, 14.07.94.
 22. Kim Young Ran, Stroupe Stephen D. Бесцианидный реагент и способ определения гемоглобина. Патент WO 9524651, G 01 N 33/72, 06.03.95.
 23. Kim Young Ran, Stroupe Stephen D. Не содержащий цианида реагент и способ определения уровня гемоглобина. Патент US 5866428A, G 01 N 33/72, 15.10.96.
 24. Li Yi, Young Carole. Композиция и способ анализа гемоглобина и клеток. Патент EP 960333 A 2, G 01 N 33/50, 13.01.98.
 25. Malin Michael J, Shapiro Phyllis. Универсальный промывающий реагент для проведения гематологического анализа образцов цельной крови. Патент US 588752 A, G 01 N 33/50, 16.05.95.
 26. Li Yi, Young Carole, Ranor Robert H. Способ определения лейкоцитов и уровня гемоглобина в крови. Патент US 5882933 A, G 01 N 33/48, 25.07.97.
 27. Li Yi. Способ определения концентрации лейкоцитов и гемоглобина крови. Патент WO 9905523/569, G 01 N 33/50, 29.06.98.
 28. Li Yi, Young Carole. Реагент, не содержащий цианидов. Патент US 5882934 A, G 01 N 33/72, 24.03.98.
 29. Козлов А.А., Берковский А.Л., Простакова Т.М. Как обеспечить аналитическую достоверность гемоглобинометрии. // Клин. лаб. диагностика, 1997; № 9, 19–20.
 30. Козлов А.А. Гемоглобинометрия. // Лаборатория, 1998; № 11, 20–21.
 31. Пупкова В.И., Банина Л.И., Войтова Н.И. Набор реагентов для определения концентрации гемоглобина в крови. Патент РФ № 2159442, G 01 N 33/72, 33/52, опубл. 20.11.2000. Бюл. № 32.
 32. Пупкова В.И., Офицеров В.И. Набор реагентов «Гемоглобин-Ново» для бесцианидного определения гемоглобина. // Новости «Вектор-Бест», 1998; № 4, 8–9.
 33. Дозирование цельной крови человека (по материалам статьи // European Clin. Lab., October 1996) // Лаборатория, 1997; № 5, 21–22.
 34. Пупкова В.И., Жданова В.В. Рекомендации по определению гемоглобина. Опыт внедрения в практику гемихромного метода (набор «Гемоглобин-Ново»). // Новости «Вектор-Бест», 2000; № 1, 9–11.
 35. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Под ред. проф. Норберта У. Тица. Гл. редактор русского издания проф. В.В. Меньшиков. Перевод с английского и систематизация материалов: проф. В.В. Меньшиков, к. м. н. И.В. Меньшикова, Л.В. Меньшикова, к. м. н. Д.Ю. Окунев, А.Н. Хитров. Издательство Лабинформ, М., 1997, 128.

Информационно-методическое пособие

**ГЕМИХРОМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ**

Подписано в печать 24.10.11. Гарнитура «Century Schoolbook».
Формат 60×84 1/16. Усл. печ. л. 2,25. Доп. тираж 1 000 экз.

Отдел оперативной печати ЗАО «Вектор-Бест».
630559 Новосибирская обл., пгт. Кольцово, а/я 121.