

Quantitative determination of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) in human blood IVD

Store 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

This method utilizes the interaction of antigen and antibody to directly determine the HbA_{1c} in whole blood. Total hemoglobin and HbA_{1c} have the same unspecific absorption rate to latex particles. When mouse anti-human HbA_{1c} monoclonal antibody is added (R2), latex-HbA_{1c}-mouse anti human HbA_{1c} antibody complex is formed. Agglutination is formed when goat anti-mouse IgG polyclonal antibody interacts with the monoclonal antibody. The amount of agglutination is proportional to the amount of HbA_{1c} absorbed on to the surface of latex particles. The amount of agglutination is measured as absorbance. The HbA_{1c} value is obtained from a calibration curve.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Throughout the circulatory life of the red cell, Hemoglobin A_{1c} is formed continuously by the addition of glucose to the N-terminal of the hemoglobin beta chain. This process, which is non-enzymatic, reflects the average exposure of hemoglobin to glucose over an extended period. In a classical study, Trivelli et al¹ showed Hemoglobin A_{1c} in diabetic subjects to be elevated 2-3 fold over the levels found in normal individuals. Several investigators have recommended that Hemoglobin A_{1c} serve as an indicator of metabolic control of the diabetic, since Hemoglobin A_{1c} levels approach normal values for diabetics in metabolic control.^{2,3,4} Hemoglobin A_{1c} has been defined operationally as the "fast fraction" hemoglobins (HbA_{1a}, A_{1b}, A_{1c}) that elute first during column chromatography with cation-exchange resins. The non-glycosylated hemoglobin, which consists of the bulk of the hemoglobin has been designated HbA₀. The present procedure utilizes an antigen and antibody reaction to directly determine the concentration of the HbA_{1c}.

REAGENTS

R1	Latex 0.13%, Buffer, stabilizer.
R2	Mouse anti-human HbA _{1c} monoclonal antibody 0.05mg/ml, goat anti-mouse IgG polyclonal antibody 0.08mg/dl, Buffer, stabilizers.
R3 (Hemolysis reagent)	Water and stabilizers
Optional	Ref: 43105 HbA _{1c} CAL. HbA _{1c} (4) Calibrators. Ref: 43106 HbA _{1c} CONTROL. HbA _{1c} (2) Controls.

PRECAUTIONS

All human specimens should be regarded as potentially biohazardous. Therefore, universal precautions should be used in specimen handling (gloves, lab garments, avoid aerosol production, etc.).

PREPARATION

R1, R2 and R3 are ready to use. Mix gently before use.

CALIBRATION

Recalibrate when control results are out of specified tolerances, when using different lot of reagent and when the instrument is adjusted.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Reagents should not be left inside the analyzer after use, they must be stored refrigerated at 2-8°C. Latex may sediment. Mix reagents gently before use. Do not use reagents over the expiration date. Do not use reagents over the expiration date.

R1 and R2 are stable for at least one month after opening stored at 2-8°C.

Hemoglobin A_{1c} in whole blood collected with EDTA is stable for one week at 2-8°C.⁵

Reagent deterioration: Alterations in the physical appearance of the reagents or values of control materials outside of the manufacturer's acceptable range may be an indication of reagent instability.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spintech 240 autoanalyzer
- Laboratory equipment.

SAMPLES

Special preparation of the patient is unnecessary. Fasting specimens are not required. No special additives or preservatives other than anticoagulants are required. Collect venous blood with EDTA using aseptic technique.

To determine HbA_{1c}, a hemolysate must be prepared for each sample:

1. Dispense 1 mL Hemolysis Reagent into tubes labeled: Calibrator, Control, Patients, etc. Note: Plastic or glass tubes of appropriate size are acceptable.
2. Place 20 µL of well mixed whole blood into the appropriately labeled lyse reagent tube. Mix.
3. Allow to stand for 5 minutes or until complete lysis is evident. Hemolysates may be stored up to 10 days at 2-8°C.

REFERENCE VALUES

Recommended Values: less than 6% for a non-diabetic, less than 7% for glycemic control of a person with diabetes.

Each laboratory should establish its own expected values. In using Hemoglobin A_{1c} to monitor diabetic patients, results should be interpreted individually. That is, the patient should be monitored against him or herself. There is a 3-4 week time lag before Hemoglobin A_{1c} reflects changes in blood glucose level.

QUALITY CONTROL

HbA_{1c} Control (ref: 43106) is recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. **Controls require hemolysis pretreatment after being reconstituted.**

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

SPINTECH 240 APPLICATION

Item Name HbA _{1c} -d		CALIBRATION*	
<u>DATA INFORMATION</u>		TYPE Spline	
Units	%	STANDARD	
Decimals	2	#1 Cal.Val.1	#4 Cal.Val.4
<u>ANALYSIS</u>		#2 Cal.Val.2	#5
Type	END	#3 Cal.Val.3	#6
W.Length 1	600	<u>NORMAL RANGE</u>	
W.Length 2		SERUM MALE LOW HIGH	
Method	Turbilatex	FEMALE	
<u>CORR</u>		URINE	
SLOPE	INTER		
1.000 x +	0		
Item Name HbA _{1c} -d		<u>DATA PROCESS</u>	
<u>ASPIRATION</u>		<u>ABSORBANCE LIMIT</u>	
KIND	Single <input type="checkbox"/> Double <input checked="" type="checkbox"/>	READ	LOW -3.000
VOLUME**		START END	HIGH 3.000
SAMPLE	6 µL	MAIN 51 52	
REAGENT 1	225 µL	SUB	
REAGENT 2	75 µL	ENDPOINT LIMIT 3	
		LINEAR CHECK (%)	
<u>MONITOR</u>		<u>FACTOR</u>	
Third Mix	<input checked="" type="checkbox"/> OF <input type="checkbox"/> ON	Blank Correction	1.000
R1 Blank	<input checked="" type="checkbox"/> Water <input type="checkbox"/> R1-B	<u>PROZONE CHECK</u>	
<u>0 LEVEL POINT</u>		START END LIMIT (%)	
SPAN	3.000	FIRST	
		SECOND	<input checked="" type="checkbox"/> Low High
		THIRD	<input checked="" type="checkbox"/> Low High

** Modify reagents and sample volumes according to the range accepted but keeping always the mentioned ratio.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 2% to linearity limit of 16%.

Precision:

	Intra-assay (n=20)	
Mean (%)	5,95	12,15
SD	0,19	0,18
CV (%)	3,20	1,47

	Inter-assay (n=20)	
	5,97	12,21
	0,14	0,15
	2,31	1,24

Sensitivity: 1% = 0,056 (A)

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show differences when compared with other commercial reagent (x). The results obtained using 40 samples were the following:

Correlation coefficient (r)² 0,995 and Regression equation: y= 0,989x -0,047

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES AND LIMITATIONS

1. Bilirubin to 50mg/dL, ascorbic acid to 50mg/dL, triglycerides to 2000mg/dL, carbamylated Hb to 7.5mmol/L and acetylated Hb to 5.0mmol/L do not interfere in this assay.
2. This assay should not be used as the unique test for the diagnosis of diabetes mellitus. Other tests must be also considered to establish a correct diagnosis.
3. Patient specimens should always be assayed using a calibration curve.
4. It has been reported that results may be inconsistent in patients who have the following conditions: opiate addiction, lead-poisoning, alcoholism, ingest large doses of aspirin.^{6,7,8,9}
5. It has been reported that elevated levels of HbF may lead to underestimation of HA_{1c} and, that uremia does not interfere with HbA_{1c} determination by immunoassay.¹⁰ It has been reported that labile intermediates (Schiff base) are not detected and therefore, do not interfere with HbA_{1c} determination by immunoassay.⁵
6. It has been determined that Hemoglobin variants HbA₂, HbC and HbS do not interfere with this method.
7. Other very rare variants of hemoglobin (e.g. HbE) have not been assessed.

BIBLIOGRAPHY

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284,353 (1971).
2. Gonen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
3. Gabbay, K.H., Hasty, K., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F., and Gallop, P.M., J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 859 (1977).
4. Bates, H.M., Lab. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
5. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
6. Ceriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1982).
7. Little, R.R., et al, Clin. Chem. 32, pp. 358-360 (1986).
8. Fluckiger, R., et al, New Eng.J. Med. 304 pp. 823-827 (1981).
9. Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, pp. 466-469 (1983).
10. Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
11. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24 (Suppl. 1): S33-S55, (2001).

PACKAGING

Cont.	Ref. TK43090
R1:	1 x 24 mL
R2:	1 x 8 mL
R3:	1 x 100 mL

Determinación cuantitativa de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) en sangre humana
IVD

Conservar a 2 - 8°C.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Este método utiliza la interacción de antígeno y anticuerpo para determinar directamente HbA_{1c} en sangre total. La hemoglobina total y HbA_{1c} tienen la misma absorción inespecífica para las partículas de látex. Cuando se añade el anticuerpo monoclonal anti-HbA_{1c} (ratón) (R2), se forma el complejo latex- HbA_{1c}- anticuerpo HbA_{1c} de ratón. Se produce aglutinación cuando el anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón interactúa con el anticuerpo monoclonal. La cantidad de aglutinación es proporcional a la cantidad de HbA_{1c} absorbida en la superficie de las partículas de látex. La cantidad de aglutinación se mide como absorbancia. El valor de HbA_{1c} se obtiene de la curva de calibración.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A lo largo de la vida circulatoria de los hematíes, se forma continuamente hemoglobina A_{1c}, por la adición de glucosa al grupo N- terminal de la cadena beta de la hemoglobina. Este proceso, que es no -enzimático, refleja la exposición media de hemoglobina a glucosa durante un periodo prolongado. En un estudio clásico, Trivelli et al¹ mostró que la Hemoglobina A_{1c} se incrementa 2-3 veces en individuos con diabetes en comparación con individuos normales. Varios investigadores han recomendado que Hemoglobina A_{1c} sirve como indicador del control metabólico de diabéticos, ya que los niveles de Hemoglobina A_{1c} alcanzan valores normales para diabéticos en control metabólico.^{2,3,4} La Hemoglobina A_{1c} se ha definido como la 'fracción rápida' de hemoglobina (HbA_{1a}, A_{1b}, A_{1c}) que eluye la primera en una cromatografía de columna con resinas de intercambio catiónico. La hemoglobina no-glicosilada, que consiste en la mayor parte de hemoglobina, se ha designado como HbA₀. Este procedimiento utiliza una reacción antígeno-anticuerpo para determinar directamente la concentración de HbA_{1c}.

REACTIVOS

R1	Latex 0.13%, Tampón, estabilizante.
R2	Anticuerpo monoclonal anti-HbA _{1c} (ratón) 0.05 mg/mL, anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón 0.08 mg/dL, tampón, estabilizantes.
R3 (Reactivo hemolizante)	Agua y estabilizantes
Opcional	Ref: 43105 HbAB _{1c} CAL. HbAB _{1c} (4) Calibradores. Ref: 43106 HbAB _{1c} CONTROL. HbAB _{1c} (2) Controles.

PRECAUCIONES

Todas las muestras humanas se deben tratar como potencialmente biopeligrosas. Por tanto, se deben usar las precauciones universales de tratamiento de muestras (guantes, vestimenta de laboratorio, evitar producción de aerosoles, etc.)

PREPARACION

R1, R2 y R3 están listos para su uso. Mezclar suavemente antes de usar.

CALIBRACIÓN

Recalibrar cuando los resultados del control están fuera de especificaciones, cuando se usa diferente lote de reactivo y cuando se ajusta el instrumento.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No deben dejarse los reactivos dentro del analizador después de su uso; conservar refrigerados a 2-8°C. El látex puede sedimentar. Agitar suavemente los reactivos antes de usar.

No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

R1 y R2 una vez abiertos son estables durante al menos 1 mes si se conservan a 2-8°C. Hemoglobina A_{1c} en sangre total recogida con EDTA es estable durante una semana a 2-8°C.⁵

Indicadores de deterioro de los reactivos: Alteraciones en el aspecto físico de los reactivos o valores de los controles fuera del rango establecido.

MATERIAL ADICIONAL

- Autoanalizador Spintech 240
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

No es necesaria una preparación especial del paciente, ni condiciones de alimentación específicas. No se requiere de otros aditivos ni conservantes especiales aparte de anticoagulantes. Recoger la sangre venosa con EDTA usando técnicas asépticas.

Para determinar HbA_{1c}, se debe preparar un hemolizado para cada muestra:

1. Dispensar 1 mL de Reactivo hemolizante en tubos etiquetados: Calibrador, Control, pacientes, etc. Nota: Son válidos tubos de plástico o vidrio de tamaño apropiado.
2. Colocar 20 µL de sangre total bien mezclada en el tubo correctamente etiquetado. Mezclar.
3. Dejar reposar durante 5 minutos o hasta que sea evidente la lisis completa. Los hemolizados se pueden conservar durante 10 días a 2-8°C.

VALORES DE REFERENCIA

Valores recomendados: inferior a 6 % para no-diabéticos, inferior a 7% para control glicémico de persona con diabetes.

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. En el uso de Hemoglobina A_{1c} para el control de pacientes diabéticos, los resultados se deben interpretar individualmente. Significa que el paciente se debe controlar frente a él mismo. Hay un intervalo de tiempo de 3-4 semanas antes que Hemoglobina A_{1c} refleje cambios en el nivel de glucosa en sangre.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Spinreact dispone de sueros control HbA_{1c} (Ref: 43106). **Los Controles, una vez reconstituídos, precisan de un tratamiento hemolizante antes de su uso.**

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

APLICACIÓN AL SPINTECH 240

Item Name HbA1c-d DATA INFORMATION Units % Decimals 2 ANALYSIS Type END W.Length 1 600 W.Length 2 Method Turbilatex CORR SLOPE INTER 1.000 x + 0		CALIBRATION* TYPE Spline STANDARD #1 Cal.Val.1 #4 Cal.Val.4 #2 Cal.Val.2 #5 #3 Cal.Val.3 #6 NORMAL RANGE SERUM MALE LOW HIGH FEMALE URINE	
Item Name HbA1c-d ASPIRATION KIND Single <input checked="" type="checkbox"/> Double VOLUME** SAMPLE 6 µL REAGENT 1 225 µL REAGENT 2 75 µL Third Mix <input checked="" type="checkbox"/> OF ON R1 Blank <input checked="" type="checkbox"/> Water R1-B MONITOR 0 LEVEL POINT 1 SPAN 3.000		DATA PROCESS ABSORBANCE LIMIT READ LOW -3.000 START END HIGH 3.000 MAIN 51 52 SUB ENDPOINT LIMIT 3 LINEAR CHECK (%) FACTOR Blank Correction 1.000 PROZONE CHECK START END LIMIT (%) FIRST SECOND <input checked="" type="checkbox"/> Low High THIRD <input checked="" type="checkbox"/> Low High	

** Modificar los volúmenes de reactivos y muestra en función de los rangos aceptados, pero manteniendo siempre la ratio descrita anteriormente.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 2% hasta el límite de linealidad de 16%.

Precisión:

	Intraserie (n=20)	
Media (%)	5,95	12,15
SD	0,19	0,18
CV (%)	3,20	1,47

	Interserie (n=20)	
Media (%)	5,97	12,21
SD	0,14	0,15
CV (%)	2,31	1,24

Sensibilidad analítica: 1% = 0,056 (A)

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 40 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,995

Ecuación de la recta de regresión: y=0,989x - 0,047

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES

1. Bilirrubina hasta 50 mg/dL, ácido ascórbico hasta 50 mg/dL, triglicéridos hasta 2000 mg/dL, Hb carbamylada hasta 7.5 mmol/L y Hb acetilada hasta 5.0 mmol/L no interfieren en el ensayo.
2. Este ensayo no se debe utilizar como único elemento para el diagnóstico de diabetes mellitus. Deben considerarse también otras pruebas para establecer un correcto diagnóstico.
3. Las muestras de pacientes se deben evaluar siempre usando curva de calibración.
4. Los resultados pueden ser inconsistentes en pacientes con las siguientes condiciones: adicción de opiáceos, envenenamiento por plomo, alcoholismo, grandes ingestas de aspirina.^{6,7,8,9}
5. Se ha demostrado que valores elevados de HbF pueden conducir a una infravaloración de HA_{1c}, y que la uremia no interfiere con la determinación de HbA_{1c} por inmunoensayo.¹⁰ También se ha demostrado que intermediarios lábiles (base Schiff) no son detectados y no interfieren con la determinación de HbA_{1c} por inmunoensayo.⁵
6. Se ha determinado que las variantes de Hemoglobina HbA₂, HbC y HbS no interfieren con este método.
7. No se han evaluado otras variantes raras de hemoglobina (ej. HbE).

BIBLIOGRAFIA

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284,353 (1971).
2. Gonen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
3. Gabbay, K.H., Hasty, K., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F., and Gallop, P.M., J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 859 (1977).
4. Bates, H.M., Lab. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
5. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
6. Ceriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1982).
7. Little, R.R., et al, Clin. Chem. 32, pp. 358-360 (1986).
8. Fluckiger, R., et al, New Eng. J. Med. 304 pp. 823-827 (1981).
9. Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, pp. 466-469 (1983).
10. Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
11. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24 (Suppl. 1): S33-S55, (2001).

PRESENTACIÓN

Cont.	Ref. TK43090
R1:	1 x 24 mL
R2:	1 x 8 mL
R3:	1 x 100 mL

