

### Quantitative determination of glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) 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<sub>1c</sub> in whole blood. Total hemoglobin and HbA<sub>1c</sub> have the same unspecific absorption rate to latex particles. When mouse antihuman HbA<sub>1c</sub> monoclonal antibody is added (R2), latex-HbA<sub>1c</sub>-mouse anti human HbA<sub>1c</sub> 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<sub>1c</sub> absorbed on to the surface of latex particles. The amount of agglutination is measured as absorbance. The HbA<sub>1c</sub> value is obtained from a calibration curve.

#### CLINICAL SIGNIFICANCE

Throughout the circulatory life of the red cell, Hemoglobin A<sub>1c</sub> is formed continuously by the adduction 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 al<sup>1</sup> showed Hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetic subjects to be elevated 2-3 fold over the levels found in normal individuals. Several investigators have recommended that Hemoglobin A<sub>1c</sub> serve as an indicator of metabolic control of the diabetic, since Hemoglobin A<sub>1c</sub> levels approach normal values for diabetics in metabolic control.<sup>2,3,4</sup> Hemoglobin A<sub>1c</sub> has been defined operationally as the "fast fraction" hemoglobins (Hb<sub>1A</sub>, A<sub>1B</sub>, A<sub>1c</sub>) 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 HbA<sub>0</sub>. The present procedure utilizes an antigen and antibody reaction to directly determine the concentration of the HbA<sub>1c</sub>.

#### REAGENTS

<b>R1</b>	Latex 0,13%, Buffer, stabilizer.
<b>R2</b>	Mouse anti-human HbA <sub>1c</sub> monoclonal antibody 0,05mg/ml, goat anti-mouse IgG polyclonal antibody 0,08mg/dl, Buffer, stabilizers.
<b>R3 (Hemolysis reagent)</b>	Water and stabilizers
<b>Optional</b>	Ref: 43105 HbA <sub>1c</sub> CALIBRATOR. (4 levels). Ref: 43106 HbA <sub>1c</sub> CONTROL. (2 levels).

#### 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

The HbA<sub>1c</sub> is traceable to reference standards of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).

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

**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

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 660 nm filter.
- General laboratory equipment (Note 1)

#### 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. HbA<sub>1c</sub> in whole blood collected with EDTA is stable for one week at 2-8°C<sup>5</sup>.

To determine HbA<sub>1c</sub>, 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.

#### PROCEDURE

1. Assay conditions:

Wavelength: 660 nm (600 - 660)  
Temperature: 37°C  
Cuvette lighth path: 1 cm

2. Adjust the instrument to zero with distilled water.

3. Pipette into a cuvette: (Note 2)

R1 (µL)	360
Calibrator or sample (µL)	10

4. Mix and incubate 5 minutes.

5. Pipette into the cuvette:

R2 (µL)	120
---------	-----

6. Mix and read the absorbance after 5 minutes (A) of the R2 addition.

#### CALCULATIONS

##### HbA<sub>1c</sub> concentration (%)

Plot (A) obtained against the HbA<sub>1c</sub> concentration of each calibrator (1 to 4 Level). HbA<sub>1c</sub> percentage in the sample is calculated by interpolation of its absorbance (A) in the calibration curve.

#### QUALITY CONTROL

HbA<sub>1c</sub> 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.

#### REFERENCE VALUES<sup>11</sup>

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<sub>1c</sub> 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<sub>1c</sub> reflects changes in blood glucose level.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

##### Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	Mean (%)	SD	Mean (%)	SD
Mean (%)	5,95	12,15	5,97	12,21
SD	0,19	0,18	0,14	0,15
CV (%)	3,20	1,47	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)<sup>2</sup> 0,995

Regression equation: y = 0,989x - 0,047

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

#### INTERFERENCES

1. Bilirubin to 50 mg/dL, ascorbic acid to 50 mg/dL, triglycerides to 2000 mg/dL, carbamylated Hb to 7,5 mmol/L and acetylated Hb to 5,0 mmol/L do not interfere in this assay.
2. 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.<sup>6, 7, 8, 9</sup>
3. It has been reported that elevated levels of HbF may lead to underestimation of HbA<sub>1c</sub> and, that uremia does not interfere with HbA<sub>1c</sub> determination by immunoassay.<sup>10</sup> It has been reported that labile intermediates (Schiff base) are not detected and therefore, do not interfere with HbA<sub>1c</sub> determination by immunoassay.<sup>5</sup>
4. It has been determined that Hemoglobin variants HbA<sub>2</sub>, HbC and HbS do not interfere with this method.
5. Other very rare variants of hemoglobin (e.g. HbE) have not been assessed.

#### NOTES

1. In order to avoid contamination, it is recommended to use disposable material.
2. Use clean disposable pipette for its dispensation.
3. **SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers.**

#### 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. Ceniello, 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. 43099	Ref: 43100	Ref: 43101
R1:	1x15 mL	1 x 30 mL	1 x 90 mL
R2:	1x5 mL	1 x 10 mL	1 x 30 mL
R3 :	1x65 mL	1 x 125 mL	3 x 125 mL

**Determinación cuantitativa de la hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) 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<sub>1c</sub> en sangre total. La hemoglobina total y HbA<sub>1c</sub> tienen la misma absorción inespecífica para las partículas de látex. Cuando se añade el anticuerpo monoclonal anti-HbA<sub>1c</sub> (ratón) (R2), se forma el complejo latex- HbA<sub>1c</sub>- anticuerpo HbA<sub>1c</sub> de ratón. Se produce aglutinación cuando el anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón interacciona con el anticuerpo monoclonal. La cantidad de aglutinación es proporcional a la cantidad de HbA<sub>1c</sub> absorbida en la superficie de las partículas de látex. La cantidad de aglutinación se mide como absorbancia. El valor de HbA<sub>1c</sub> se obtiene de la curva de calibración.

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

A lo largo de la vida circulatoria de los hematíes, se forma continuamente hemoglobina A<sub>1c</sub>, 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 período prolongado. En un estudio clásico, Trivelli et al<sup>1</sup> mostró que la Hemoglobina A<sub>1c</sub> se incrementa 2-3 veces en individuos con diabetes en comparación con individuos normales. Varios investigadores han recomendado que Hemoglobina A<sub>1c</sub> sirve como indicador del control metabólico de diabéticos, ya que los niveles de Hemoglobina A<sub>1c</sub> alcanzan valores normales para diabéticos en control metabólico.<sup>2,3,4</sup> La Hemoglobina A<sub>1c</sub> se ha definido como la 'fracción rápida' de hemoglobina (HbA, A<sub>1</sub>B, A<sub>1</sub>C) 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 HbA<sub>0</sub>. Este procedimiento utiliza una reacción antígeno-anticuerpo para determinar directamente la concentración de HbA<sub>1c</sub>.

**REACTIVOS**

<b>R1</b>	Latex 0,13%, Tampón, estabilizante.
<b>R2</b>	Anticuerpo monoclonal anti-HbA <sub>1c</sub> (ratón) 0,05 mg/mL, anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón 0,08 mg/dL, tampón, estabilizantes.
<b>R3 (Reactivo hemolizante)</b>	Agua y estabilizantes
<b>Opcional</b>	Ref: 43105 HbA <sub>1c</sub> CALIBRADOR (4 niveles). Ref: 43106 HbA <sub>1c</sub> CONTROL. (2 niveles)

**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**

HbA<sub>1c</sub> es trazable a patrones de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

**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.

**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**

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 660 nm.
- Equipamiento habitual de laboratorio<sup>(Nota 1)</sup>.

**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. HbA<sub>1c</sub> en sangre total recogida con EDTA es estable durante 1 semana a 2-8°C.<sup>5</sup>

Para determinar HbA<sub>1c</sub>, 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.

**PROCEDIMIENTO**

1. Condiciones de ensayo:  
Longitud de onda: 660 nm (600 – 660)  
Temperatura: 37°C  
Paso de luz de la cubeta: 1 cm
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta<sup>(Nota 2)</sup>.

R1 (µL)	360
Calibrador o muestra (µL)	10

4. Mezclar e incubar 5 minutos.

5. Pipetear en la misma cubeta:

R2 (µL)	120
---------	-----

6. Mezclar y leer la absorbancia (A) a los 5 minutos de la adición del Reactivo R2.

**CALCULOS**
**Concentración HbA<sub>1c</sub> (%)**

Representar la absorbancia (A) obtenida frente a las concentraciones de HbA<sub>1c</sub> de cada Calibrador (del 1 al 4). El porcentaje de HbA<sub>1c</sub> en la muestra se calcula por interpolación de su absorbancia (A) en la curva de calibración.

**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<sub>1c</sub> (Ref: 43106). **Los Controles, una vez reconstituidos, 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.

**VALORES DE REFERENCIA<sup>11</sup>**

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<sub>1c</sub> 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<sub>1c</sub> refleje cambios en el nivel de glucosa en sangre.

**CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO**
**Rango de medida:** Desde el límite de detección de 2% hasta el límite de linealidad de 16%.

**Precisión:**

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (%)	5,95	12,15	5,97	12,21
SD	0,19	0,18	0,14	0,15
CV (%)	3,20	1,47	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:

Coeficiente de correlación (r)<sup>2</sup>: 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. Los resultados pueden ser inconsistentes en pacientes con las siguientes condiciones: adición de opiáceos, envenenamiento por plomo, alcoholismo, grandes ingestas de aspirina.<sup>6, 7, 8, 9</sup>
3. Se ha demostrado que valores elevados de HbF pueden conducir a una infravaloración de HbA<sub>1c</sub>, y que la uremia no interfiere con la determinación de HbA<sub>1c</sub> por inmunoensayo.<sup>10</sup> También se ha demostrado que intermediarios lábiles (base Schiff) no son detectados y no interfieren con la determinación de HbA<sub>1c</sub> por inmunoensayo.<sup>5</sup>
4. Se ha determinado que las variantes de Hemoglobina HbA<sub>2</sub>, HbC y HbS no interfieren con este método.
5. No se han evaluado otras variantes raras de hemoglobina (ej. HbE).

**NOTAS**

1. Para evitar la contaminación, se recomienda el uso de material desechable.
2. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
3. **SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

**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. 43099	Ref: 43100	Ref: 43101
R1:	1x15 mL	1 x 30 mL	1 x 90 mL
R2:	1x5 mL	1 x 10 mL	1 x 30 mL
R3 :	1x65 mL	1 x 125 mL	3 x 125 mL

**Détermination quantitative de l'hémoglobine glycosylée (HbA<sub>1c</sub>) dans le sang humain**
**IVD**

Conserver à 2 - 8 °C

**PRINCIPE DE LA MÉTHODE**

Cette méthode utilise l'interaction entre l'antigène et l'anticorps, afin de déterminer directement la HbA<sub>1c</sub> totale dans le sang. L'hémoglobine totale et la HbA<sub>1c</sub> ont la même absorption non spécifique pour les particules de latex. En cas d'ajout de l'anticorps monoclonal anti-HbA<sub>1c</sub>(souris) (R2), un complexe latex - HbA<sub>1c</sub> - anticorps HbA<sub>1c</sub> de souris est formé. Une agglutination a lieu lorsque l'anticorps polyclonal IgG de chèvre anti-souris interagit avec l'anticorps monoclonal. La quantité d'agglutination est proportionnelle à la quantité de HbA<sub>1c</sub> absorbée sur la surface des particules de latex. La quantité d'agglutination est mesurée comme absorbance. La valeur de HbA<sub>1c</sub> est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

**SIGNIFICATION CLINIQUE**

Tout au long de la vie circulatoire des hématies, de l'hémoglobine A<sub>1c</sub> est continuellement formée en ajoutant du glucose au groupe N-extrême de la chaîne bêta de l'hémoglobine. Ce processus, qui n'est pas enzymatique, reflète l'exposition moyenne de l'hémoglobine au glucose au cours d'une période prolongée. Dans une étude classique, Trivelli et al<sup>1</sup> a montré que l'hémoglobine A<sub>1c</sub> augmente de 2-3 fois chez les individus diabétiques par rapport aux individus normaux. Plusieurs chercheurs ont recommandé que l'hémoglobine A<sub>1c</sub> serve d'indicateur du contrôle métabolique de diabétiques, étant donné que les niveaux d'hémoglobine A<sub>1c</sub> atteignent des valeurs normales chez les diabétiques sous contrôle métabolique.<sup>2,3,4</sup>

L'hémoglobine A<sub>1c</sub> a été définie comme la « fraction rapide » d'hémoglobine (HbA<sub>1</sub>, A<sub>1B</sub>, A<sub>1c</sub>) éluee la première dans une chromatographie sur colonne avec des résines échangeuses de cations. L'hémoglobine non glycosylée, qui représente la plus grande part d'hémoglobine, est désignée comme HbA<sub>0</sub>. Cette procédure utilise une réaction antigène-anticorps, afin de déterminer directement la concentration de HbA<sub>1c</sub>.

**RÉACTIFS**

<b>R1</b>	Latex 0,13 %, Tampon, stabilisant.
<b>R2</b>	Anticorps monoclonal anti-HbA <sub>1c</sub> (souris) 0,05 mg/mL, anticorps polyclonal IgG de chèvre anti-souris 0,08 mg/dL, tampon, stabilisants.
<b>R3 (Réactif hémolyisant)</b>	Eau et stabilisants
<b>En option</b>	Réf : 43105 HbA <sub>1c</sub> CALIBRATEUR. (4 niveaux) Réf : 43106 HbA <sub>1c</sub> CONTRÔLE. (4 niveaux)

**PRÉCAUTIONS**

Tous les échantillons humains doivent être traités comme potentiellement biodangereux. Il faut donc utiliser les précautions universelles de traitement d'échantillons (gants, vêtements de laboratoire, éviter la production d'aérosols, etc.).

**PRÉPARATION**

R1, R2 et R3 sont prêts à être utilisés. Mélanger doucement avant utilisation.

**CALIBRATION**

**HbA<sub>1c</sub> est traçable aux normes de référence de la Fédération Internationale de Chimie Clinique (IFCC).**

**CONSERVATION ET STABILITÉ**

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage, lorsque les flacons sont maintenus bien fermés à 2-8 °C, et en évitant leur contamination lors de leur utilisation. Les réactifs ne doivent pas être laissés à l'intérieur de l'analyseur après utilisation; conserver au réfrigérateur à 2-8 °C. Le latex peut sédimenter. Agitez doucement les réactifs avant utilisation. Ne pas utiliser de réactifs après leur date d'expiration. R1 et R2, une fois ouverts, sont stables pendant au moins 1 mois s'ils sont conservés à 2-8°C.

**Indicateurs de détérioration des réactifs :** Altérations de l'aspect physique des réactifs ou valeurs de contrôle hors de la plage établie.

**MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE**

- Bain-marie à 37 °C.
- Spectrophotomètre ou photomètre avec cuvette thermostable à 37 °C pour lectures à 660 nm.
- Équipement habituel de laboratoire<sup>(Remarque 1)</sup>.

**ÉCHANTILLONS**

Aucune préparation particulière du patient ni de conditions spécifiques d'alimentation ne sont nécessaires. Aucun additif ni conservateurs particuliers ne sont requis, à l'exception d'anticoagulants. Prélèver le sang veineux avec de l'EDTA en utilisant des techniques aseptiques. L'hémoglobine HbA<sub>1c</sub> dans le sang totale recueillie avec de l'EDTA est stable pendant une semaine à 2-8°C.<sup>5</sup>

Pour déterminer la HbA<sub>1c</sub>, il faut préparer un hémolyat pour chaque échantillon :

- Distribuer 1 ml de Réactif hémolyisant dans des tubes étiquetés : Calibrateur, Contrôle, patients, etc. Remarque : Les tubes en plastique ou en verre de taille appropriée sont valides.
- Placer 20 µL de sang total bien mélangé dans un tube correctement étiqueté. Mélanger.
- Laisser reposer pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que la lyse complète soit évidente. Les hémolyats peuvent être conservés pendant 10 jours à 2-8 °C.

**PROCÉDURE**

1. Conditions d'essai:

Longueur d'onde: 660 nm (600 – 660)

Température : 37 °C

Passage de lumière de la cuvette. 1 cm

2. Ajuster le spectrophotomètre à zéro par rapport à l'eau distillée.

3. Pipeter dans une cuvette: <sup>(Remarque 2)</sup>

R1 (µL)	360
---------	-----

Calibrateur ou échantillon (µL)	10
---------------------------------	----

4. Mélanger et incuber pendant 5 minutes à température ambiante.

5. Pipeter dans la même cuvette :

R2 (µL)	120
---------	-----

6. Mélanger et lire l'absorbance (A) 5 minutes après l'ajout du Réactif R2.

**CALCULS**
**Concentration HbA<sub>1c</sub> (%)**

Représenter l'absorbance (A) obtenue par rapport aux concentrations de HbA<sub>1c</sub> de chaque Calibrateur (du 1 au 4). Le pourcentage de HbA<sub>1c</sub> dans l'échantillon est calculé par interpolation de son absorbance (A) dans la cuve d'étalonnage.

**CONTRÔLE DE QUALITÉ**

Il est recommandé d'utiliser des sérums de contrôle pour contrôler les essais aussi bien lors de procédure manuel qu'automatique, Spinreact dispose de sérums de contrôles HbA<sub>1c</sub> (Réf : 43106). **Les Contrôles, une fois reconstitués, requièrent un traitement hémolyisant avant leur utilisation.**

Chaque laboratoire doit établir son propre Contrôle de Qualité et des corrections en cas de non-conformité des contrôles en termes de tolérances exigées.

**VALEURS DE RÉFÉRENCE<sup>11</sup>**

Valeurs recommandées : inférieure à 6 % pour non-diabétiques, inférieure à 7 % pour contrôle glycémique de personnes diabétiques.

Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence. En cas d'utilisation d'hémoglobine A<sub>1c</sub> pour le contrôle de patients diabétiques, les résultats doivent être individuellement interprétés. Ceci signifie que le patient doit être contrôlé par rapport à ses propres valeurs. Il existe un intervalle de temps de 3-4 semaines avant que l'hémoglobine A<sub>1c</sub> ne reflète des variations du niveau de glucose dans le sang.

**CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE**

**Gamme de mesures:** Depuis la *limite de détection* de 2% jusqu'à la limite de linéarité de 16%.

**Précision:**

Moyenne (mg/dL)	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
	5,95	12,15	5,97	12,21
SD	0,19	0,18	0,14	0,15
CV (%)	3,20	1,47	2,31	1,24

**Sensibilité analytique:** 1 % = 0,056 A.

**Exactitude:** Les réactifs SPINREACT (y) ne montrent pas de différences systématiques significatives lorsqu'on les compare à d'autres réactifs commerciaux (x).

Les résultats obtenus avec 40 échantillons ont été les suivants:

Coefficient de corrélation (r)<sup>2</sup>: 0,995.

Equation de la Courbe de régression: y=0,989x – 0,047.

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier suivant l'analyseur employé.

**INTERFÉRENCES ET LIMITATIONS**

- La bilirubine jusqu'à 50 mg/dL l'acide ascorbique jusqu'à 50 mg/dL, les triglycérides jusqu'à 2000 mg/dL, la Hb carbamylée jusqu'à 7,5 mmol/L et la Hb acétylée jusqu'à 5,0 mmol/L n'interfèrent pas dans l'essai.
- Les résultats peuvent être incohérents chez des patients avec les conditions suivantes : dépendance aux opiacés, empoisonnement au plomb, alcoolisme, fortes ingestions d'aspirine.<sup>6, 7, 8, 9</sup>
- Il a été démontré que des valeurs élevées de HbF peuvent conduire à une sous-estimation de HbA<sub>1c</sub> que l'urémie n'interfère pas dans la détermination de HbA<sub>1c</sub> par immunoessai.<sup>10</sup> Il a également été démontré que des intermédiaires labiles (base de Schiff) ne sont pas détectés et n'interfèrent pas dans la détermination de HbA<sub>1c</sub> par immunoessai.<sup>5</sup>
- Il a été déterminé que les variantes d'hémoglobine HbA<sub>2</sub>, HbC et HbS n'interfèrent pas par cette méthode.
- D'autres variantes rares d'hémoglobine (ex. HbE) n'ont pas été évaluées.

**REMARQUES**

- Afin d'éviter toute contamination, l'utilisation du matériel jetable est recommandée.
- Utilisez la pipette jetable propre pour la dispensation.
- SPINREACT dispose de consignes détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.**

**BIBLIOGRAPHIE**

- Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284,353 (1971).
- Gonen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
- 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).
- Bates, H.M., Lab. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
- Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
- Ceriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1982).
- Little, R.R., et al, Clin. Chem. 32, pp. 358-360 (1986).
- Fluckiger, R., et al, New Eng. J. Med. 304 pp. 823-827 (1981).
- Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, pp. 466-469 (1983).
- Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
- American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24 (Suppl. 1): S33-S55, (2001).

**PRÉSENTATION**

Cont..	Réf. 43099	Réf : 43100	Réf : 43101
R1 :	1x15 mL	1 x 30 mL	1 x 90 mL
R2 :	1x5 mL	1 x 10 mL	1 x 30 mL
R3 :	1x65 mL	1 x 125 mL	3 x 125 mL



**Determinação quantitativa da hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) em sangue humano**
**IVD**

Conservar a 2 - 8°C.

**PRINCÍPIO DO MÉTODO**

Este método utiliza a interação de antígeno e anticorpo para determinar diretamente HbA<sub>1c</sub> em sangue total. A hemoglobina total e HbA<sub>1c</sub> têm a mesma absorção inespecífica para as partículas de látex. Quando se acrescenta o anticorpo monoclonal anti-HbA<sub>1c</sub> (rato) (R2), forma-se o complexo latex-HbA<sub>1c</sub>-anticorpo HbA<sub>1c</sub> de rato. Produz-se aglutinação quando o anticorpo policlonal IgG de cabra anti-rato interage com o anticorpo monoclonal. A quantidade de aglutinação é proporcional à quantidade de HbA<sub>1c</sub> absorvida na superfície das partículas de látex. A quantidade de aglutinação mede-se como absorbância. O valor de HbA<sub>1c</sub> é obtido da curva de calibração.

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

Ao longo da vida circulatória dos hematias, forma-se continuamente hemoglobina A<sub>1c</sub>, pela adição de glucose ao grupo N-terminal da cadeia beta da hemoglobina. Este processo, que é não-enzimático, reflete a exposição média de hemoglobina a glucose durante um período prolongado. Num estudo clássico, Trivelliet al1 mostrou que a Hemoglobina A<sub>1c</sub> aumenta 2-3 vezes em indivíduos com diabetes em comparação com indivíduos normais. Vários investigadores recomendaram que a Hemoglobina A<sub>1c</sub> serve como indicador do controlo metabólico de diabéticos, já que os níveis de Hemoglobina A<sub>1c</sub> alcançam valores normais para diabéticos em controlo metabólico.<sup>2,3,4</sup> A Hemoglobina A<sub>1c</sub> foi definida como a 'fração rápida' de hemoglobina (HbA, A<sub>1</sub>B, A<sub>1</sub>C) que elui a primeira numa cromatografia de coluna com resinas de intercambio catiónico. A hemoglobina não-glicosilada, que consiste na maior parte de hemoglobina, foi designada como HbA<sub>0</sub>. Este procedimento utiliza uma reação antígeno-anticorpo para determinar diretamente a concentração de HbA<sub>1c</sub>.

**REATIVOS**

<b>R1</b>	Latex 0,13%, Tampão, estabilizante.
<b>R2</b>	Anticorpo monoclonal anti-HbA <sub>1c</sub> (rato) 0,05 mg/mL, anticorpo policlonal IgG de cabra anti-rato 0,08 mg/dL, tampão, estabilizantes.
<b>R3 (Reativo hemolizante)</b>	Água e estabilizantes
<b>Opcional:</b>	Ref: 43105 HbA <sub>1c</sub> CALIBRADOR (4 níveis). Ref: 43106 HbA <sub>1c</sub> CONTROL (4 níveis).

**PRECAUÇÕES**

Todas as amostras humanas devem tratar-se como potencialmente bioperigosas. Portanto, devem ser usadas as precauções universais de tratamento de amostras (luvas, vestimenta de laboratório, evitar produção de aerossóis, etc.)

**PREPARAÇÃO**

R1, R2 e R3 estão prontos para o seu uso. Misturar suavemente antes de usar.

**CALIBRAÇÃO**

O HbA<sub>1c</sub> é rastreável aos padrões de referência da Federação Internacional de Química Clínica (IFCC).

**CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE**

Todos os componentes do kit são estáveis até à data de validade quando se mantêm os recipientes bem fechados a 2-8°C, e se evita a contaminação durante o seu uso. Os reagentes não devem ser deixados dentro do analisador após o uso; mantenha refrigerado a 2-8°C. O látex pode sedimentar. Agite suavemente os reagentes antes de usar. Não utilizar reativos que tenham passado a data de validade. Depois de abertos, R1 e R2 são estáveis durante pelo menos 1 mês caso se se conservem a 2-8°C.

**Indicadores de deterioração dos reativos:** Alterações no aspeto físico dos reativos ou valores dos controlos fora do intervalo estabelecido.

**MATERIAL ADICIONAL**

- Banho de água a 37°C.
- Espectrofotómetro ou fotómetro com cuba termostática a 37°C para leituras a 660 nm.
- Equipamento habitual de laboratório.<sup>(Nota 1)</sup>

**AMOSTRAS**

Não é necessária uma preparação especial do paciente, nem condições de alimentação específicas. Não requerem outros aditivos nem conservantes especiais além de anticoagulantes. Recolher o sangue venoso com EDTA usando técnicas assépticas. HbA<sub>1c</sub> em sangue total recolhido com EDTA é estável durante uma semana a 2-8°C.<sup>5</sup> Para determinar HbA<sub>1c</sub>, deve preparar-se um hemolizado para cada amostra:

1. Dispensar 1 mL de Reativo hemolizante em tubos etiquetados: Calibrador, Controlo, pacientes, etc. Nota: São válidos tubos de plástico ou vidro de tamanho apropriado.
2. Colocar 20 µL de sangue total bem misturado no tubo corretamente etiquetado. Misturar.
3. Deixar repousar durante 5 minutos ou até que seja evidente a lises completa. Os hemolizados podem conservar-se durante 10 dias a 2-8°C.

**PROCEDIMENTO**

1. Condições do ensaio:  
Comprimento de onda: 660 nm (600 – 660)  
Temperatura: - 37°C  
Passagem de luz da cuba: 1 cm
2. Ajustar o espectrofotómetro a zero perante água destilada.
3. Pipetear numa cuba:<sup>(Nota 2)</sup>

R1 (µL)	360
Calibrador ou amostra (µL)	10

4. Misturar e incubar 5 minutos.

5. Pipetear na mesma cuba:

R2 (µL)	120
---------	-----

6. Misturar e ler a absorbância (A<sub>2</sub>) depois de 5 minutos de adicionar o reativo R2.

**CÁLCULOS**
**Concentração HbA<sub>1c</sub> (%)**

Representar a absorbância (A) obtida perante as concentrações de HbA<sub>1c</sub> de cada Calibrador (do 1 ao 4). A concentração de HbA<sub>1c</sub> na amostra calcula-se por interpolação da sua absorbância (A) na curva de calibração.

**CONTROLO DE QUALIDADE**

Recomenda-se utilizar soros controlo para controlar os ensaios tanto em procedimento manual como em automático. Spinreact dispõe de soros controlo HbA<sub>1c</sub> (Ref:43106). **Os Controlos, uma vez reconstituídos, precisam de um tratamento hemolizante antes do seu uso.**

Cada laboratório deveria estabelecer o seu próprio Controlo de Qualidade e determinar correções no caso de que os controlos não cumpram as tolerâncias exigidas.

**VALORES DE REFERÊNCIA<sup>11</sup>**

Valores recomendados: inferior a 6% para não-diabéticos, inferior a 7% para controlo glicémico de pessoa com diabetes.

É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência. No uso de Hemoglobina A<sub>1c</sub> para o controlo de pacientes diabéticos, os resultados devem ser interpretados individualmente. Significa que o paciente se deve controlar perante si mesmo. Há um intervalo de tempo de 3-4 semanas antes que Hemoglobina A<sub>1c</sub> mostre mudanças no nível de glucose no sangue.

**CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO**

**Intervalo de medição:** Do limite de detecção de 2% até ao limite de linearidade de 16%  
**Precisão:**

Média (mg/dL)	Intra-ensaios (n=20)		Inter-ensaios (n=20)	
	5,95	12,15	5,97	12,21
SD	0,19	0,18	0,14	0,15
CV (%)	3,20	1,47	2,31	1,24

**Sensibilidade analítica:** 1 % = 0,056 (A).

**Exactidão:** Os resultados obtidos utilizando reagentes SPINREACT (y) não demonstraram diferenças sistemáticas quando comparados com outros reagentes comerciais (x).

Os resultados obtidos com 40 amostras foram os seguintes:

Coefficiente de correlação (r<sup>2</sup>): 0,995.

Equação de regressão: y=0,989x - 0,047.

Os resultados das características de desempenho dependem do analisador utilizado.

**INTERFERÊNCIAS E LIMITAÇÕES**

1. Bilirrubina até 50 mg/dL, ácido ascórbico até 50 mg/dL, triglicéridos até 2000 mg/dL, Hbcarbamilada até 7,5 mmol/L e Hb acetilada até 5,0 mmol/L não interferem no ensaio.
2. Os resultados podem ser inconsistentes em pacientes com as seguintes condições: adição de opiáceos, envenenamento por chumbo, alcoolismo, grandes ingestões de aspirina.<sup>6, 7, 8, 9</sup>
3. Demonstrou-se que valores elevados de HbF podem levar a uma infra valoração de HbA<sub>1c</sub>, e que a uremia não interfere com a determinação de HbA<sub>1c</sub> por imunoensaio.<sup>10</sup> Também se demonstrou que intermédios lábeis (base Schiff) não são detetados e não interferem com a determinação de HbA<sub>1c</sub> por imunoensaio.<sup>5</sup>
4. Determinou-se que as variantes de Hemoglobina HbA<sub>2</sub>, HbC e HbS não interferem com este método.
5. Não foram avaliadas outras variantes raras de hemoglobina (ex. HbE).

**NOTAS**

1. A fim de evitar a contaminação, recomenda-se a utilização de material descartável.
2. Utilizar pontas de pipeta descartáveis limpas para a sua dispensação.
3. **A SPINREACT dispõe de instruções detalhadas para a aplicação deste reagente em diferentes analisadores.**

**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. 08008005000
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).

**APRESENTAÇÃO**

Cont.	Ref. 43099	Ref. 43100	Ref. 43101
R1:	1x15 mL	1 x 30 mL	1 x 90 mL
R2:	1x5 mL	1 x 10 mL	1 x 30 mL
R3:	1x65 mL	1 x 125 mL	3 x 125 mL