

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	SERUM MALE FEMALE	
<u>CORR SLOPE</u>		URINE	
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>	
0 LEVEL POINT	1	Blank Correction	1.000
SPAN	3.000	<u>PROZONE CHECK</u>	
		START END LIMIT (%)	
		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 látex- 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 HbA _{1c} CAL. HbA _{1c} (4) Calibradores. Ref: 43106 HbA _{1c} CONTROL. HbA _{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 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.

APLICACIÓN AL SPINTECH 240

Item Name HbA _{1c} -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 HbA _{1c} -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

Détermination quantitative de l'hémoglobine glycosylée (HbA_{1c}) 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_{1c} totale dans le sang. L'hémoglobine totale et la HbA_{1c} ont la même absorption non spécifique pour les particules de latex. En cas d'ajout de l'anticorps monoclonal anti-HbA_{1c}(souris) (R2), un complexe latex - HbA_{1c} - anticorps HbA_{1c} 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_{1c} absorbée sur la surface des particules de latex. La quantité d'agglutination est mesurée comme absorbance. La valeur de HbA_{1c} est obtenue à partir de la courbe d'étalonnage.

SIGNIFICATION CLINIQUE

Tout au long de la vie circuloire des hématies, de l'hémoglobine A_{1c} 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 al¹ a montré que l'hémoglobine A_{1c} augmente de 2-3 fois chez les individus diabétiques par rapport aux individus normaux. Plusieurs chercheurs ont recommandé que l'hémoglobine A_{1c} serve d'indicateur du contrôle métabolique de diabétiques, étant donné que les niveaux d'hémoglobine A_{1c} atteignent des valeurs normales chez les diabétiques sous contrôle métabolique.^{2,3,4}

L'hémoglobine A_{1c} a été définie comme la « fraction rapide » d'hémoglobine (HbA, A_{1B}, A_{1C}) éluée 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 HbA₀. Cette procédure utilise une réaction antigène-anticorps, afin de déterminer directement la concentration de HbA_{1c}.

RÉACTIFS

R1	Latex 0,13 %, Tampon, stabilisant.
R2	Anticorps monoclonal anti-HbA _{1c} (souris) 0,05 mg/mL, anticorps polyclonal IgG de chèvre anti-souris 0,08 mg/dL, tampon, stabilisants.
R3 (réactif d'hémolyse)	Eau et stabilisants
En option	Réf : 43105 HbA _{1c} CALIBRATEUR. (4 niveaux) Réf : 43106 HbA _{1c} 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.

ÉTALONNAGE

Réévaluez lorsque les résultats du contrôle sont hors des tolérances spécifiées, lorsque vous utilisez un lot différent de réactif et lorsque l'instrument est réglé.

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

- Autoalyseur SPINTECH 240.
- Équipement classique de laboratoire.

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. Prélever le sang veineux avec de l'EDTA en utilisant des techniques aseptiques. L'hémoglobine HbA_{1c} dans le sang totale recueillie avec de l'EDTA est stable pendant une semaine à 2-8°C.⁵

Pour déterminer la HbA_{1c}, il faut préparer un hémolysat pour chaque échantillon :

1. Distribuer 0,5 ml de Réactif hémolysant dans des tubes étiquetés: Calibrateur, Contrôle, patients, etc. Remarque : Les tubes en plastique ou en verre de taille appropriée sont valides.
2. Placer 10 µL de sang total bien mélangé dans un tube correctement étiqueté. Mélanger.
3. Laisser reposer pendant 5 minutes ou jusqu'à ce que la lyse complète soit évidente. Les hémolysats peuvent être conservés pendant 10 jours à 2-8 °C.

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_{1c} (Réf : 43106). **Les Contrôles, une fois reconstitués, requièrent un traitement hémolysant 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 RÉFÉRENCE¹¹

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_{1c} 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_{1c} ne reflète des variations du niveau de glucose dans le sang.

REMARQUES

1. Afin d'éviter toute contamination, l'utilisation du matériel jetable est recommandée.
2. Utilisez la pipette jetable propre pour la dispensation.

3. SPINREACT dispose de consignes détaillées pour l'application de ce réactif dans différents analyseurs.
APLICACION AU SPINTECH 240

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

** Modifier les réactifs et les volumes d'échantillons selon la gamme acceptée mais en gardant toujours le ratio mentionné

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

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

Précision:

	Intra-série (n= 20)		Inter-série (n= 20)	
Moyenne (mg/dL)	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)²: 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

1. 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.
2. Les résultats peuvent être incohérents chez des patients avec les conditions suivantes : dépendance aux opiacés, empoisonnement au plomb, alcoolisme, fortes ingestions d'aspirine.^{6,7,8,9}
3. Il a été démontré que des valeurs élevées de HbF peuvent conduire à une sous-estimation de HbA_{1c} que l'urémie n'interfère pas dans la détermination de HbA_{1c} par immunoessai.¹⁰ 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_{1c} par immunoessai.⁵
4. Il a été déterminé que les variantes d'hémoglobine HbA₂, HbC et HbS n'interfèrent pas par cette méthode.
5. D'autres variantes rares d'hémoglobine (ex. HbE) n'ont pas été évaluées.

BIBLIOGRAPHIE

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).

PRÉSENTATION

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

Determinação quantitativa da hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) 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_{1c} em sangue total. A hemoglobina total e HbA_{1c} têm a mesma absorção inespecífica para as partículas de látex. Quando se acrescenta o anticorpo monoclonal anti- HbA_{1c} (rato) (R2), forma-se o complexo latex- HbA_{1c} - anticorpo HbA_{1c} 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_{1c} absorvida na superfície das partículas de látex. A quantidade de aglutinação mede-se como absorbência. O valor de HbA_{1c} é obtido da curva de calibração.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Ao longo da vida circulatória dos hematias, forma-se continuamente hemoglobina A_{1c}, 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_{1c} aumenta 2-3 vezes em indivíduos com diabetes em comparação com indivíduos normais. Vários investigadores recomendaram que a Hemoglobina A_{1c} serve como indicador do controlo metabólico de diabéticos, já que os níveis de Hemoglobina A_{1c} alcançam valores normais para diabéticos em controlo metabólico.^{2,3,4}

A Hemoglobina A_{1c} foi definida como a 'fração rápida' de hemoglobina (Hb_{1A}, A_{1B}, A_{1C}) 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 HbA₀. Este procedimento utiliza uma reação antígeno-anticorpo para determinar diretamente a concentração de HbA_{1c}.

REATIVOS

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

Calibre novamente quando os resultados do controle estiverem fora das tolerâncias especificadas, ao usar diferentes lotes de reagente e quando o instrumento estiver ajustado.

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.

EQUIPAMENTO ADICIONAL

- Autoanalisador SPINTECH 240.
- Equipamento habitual de laboratório.

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_{1c} em sangue total recolhido com EDTA é estável durante uma semana a 2-8°C.⁵

Para determinar HbA_{1c}, deve preparar-se um hemolizado para cada amostra:

1. Dispensar 0,5 mL de Reativo hemolizante em tubos etiquetados: Calibrador, Controlo, pacientes, etc. Nota: São válidos tubos de plástico ou vidro de tamanho apropriado.
2. Colocar 10 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.

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_{1c} (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 REFERÊNCIA¹¹

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_{1c} 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_{1c} mostre mudanças no nível de glucose no sangue.

NOTAS

1. Afin d'éviter tout contamination, l'utilisation du matériel jetable est recommandée
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.**

APLICAÇÃO AO SPINTECH 240

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

É necessário solicitar o branco neste parâmetro para obter resultados corretos no ecrã principal de CALIB.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Intervalo de medição: Do limite de deteção de 2% até ao limite de linearidade de 16%

Precisão:

	Intra-ensaios (n=20)		Inter-ensaios (n=20)	
Média (mg/dL)	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)²: 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. Este ensaio não deve utilizar-se como único elemento para o diagnóstico de diabetes mellitus. Devem ser considerados também outros testes para estabelecer um correto diagnóstico.
3. As amostras de pacientes devem avaliar-se sempre usando curva de calibração.
4. Os resultados podem ser inconsistentes em pacientes com as seguintes condições: adição de opiáceos, envenenamento por chumbo, alcoolismo, grandes ingestões de aspirina.^{6, 7, 8, 9}
5. Demonstrou-se que valores elevados de HbF podem levar a uma infra valoração de HA_{1c}, e que a uremia não interfere com a determinação de HbA_{1c} por imunoensaio.¹⁰ Também se demonstrou que intermediários lábeis (base Schiff) não são detetados e não interferem com a determinação de HbA_{1c} por imunoensaio.⁵
6. Determinou-se que as variantes de Hemoglobina HbA₂, HbC e HbS não interferem com este método.
7. Não foram avaliadas outras variantes raras de hemoglobina (ex. 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. 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. TK43090
R1:	1 x 24 mL
R2:	1 x 8 mL
R3:	1 x 100 mL