



HbA1c v.2

Método de inhibición inmunoturbidimétrica para la determinación cuantitativa de HbA1c

SIGNIFICACION CLINICA

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, que comprende un conjunto de desórdenes del metabolismo de los hidratos de carbono que cursan con una manifestación común: la hiperglicemia.

El control glicémico periódico permite prevenir los trastornos agudos y reducir el riesgo de las complicaciones tardías de la enfermedad (retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedades cardiovasculares).

La relación entre el desarrollo y progresión de las complicaciones microvasculares y el control glicémico ha sido debatida por muchos años, en parte debido a los métodos inadecuados para realizar un control glicémico retrospectivo. Los métodos tradicionales de medición de glucosa en sangre y orina tienen un valor limitado para este propósito, y sólo fue con el desarrollo de determinaciones para proteínas glicosiladas o glicadas, que se ha logrado un conocimiento exacto y objetivo del estado glicémico a largo plazo.

Las glicohemoglobinas, también llamadas hemoglobinas glicosiladas o glicadas, fueron descritas por primera vez en 1968 por Rahbar como "hemoglobinas diabéticas". Su producción depende de la concentración de glucosa y ocurre a través de un proceso no enzimático post-traducciona llamado glicación, donde el azúcar es unido a los grupos amino de las moléculas de hemoglobina (Hb). La glicación de los aminoácidos N-terminales de las cadenas α y β como así también los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina en la molécula de hemoglobina, resultan en una variedad de hemoglobinas glicadas, incluyendo HbA1c, que es la especie glicosilada en la valina N-terminal de la cadena β .

Los niveles de HbA1c son proporcionales a la concentración de glucosa en sangre durante las últimas 6-8 semanas. Así, la determinación de HbA1c provee un parámetro integral para el control glicémico a largo plazo en el paciente diabético.

FUNDAMENTOS DEL METODO

HbA1c v.2 Turbitest AA es un método de inhibición inmunoturbidimétrica para determinar la cantidad de hemoglobina A1c (HbA1c) como una proporción de la hemoglobina total, en sangre entera humana (% o mmol/mol HbA1c). Para ello, es necesario liberar la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos, mediante la hemólisis de la muestra. La sangre del paciente se pone en contacto con el **Reactivo Hemolizante** que contiene un detergente (bromuro de tetradeciltrimetilamonio - TTAB) que lisa los glóbulos rojos específicamente. A partir del hemolizado obtenido, se determina mediante dos reacciones independientes, el nivel de HbA1c y Hb de la muestra.

HbA1c

Durante la primera fase de la reacción, la HbA1c de la muestra reacciona con el anticuerpo específico anti-HbA1c (Reactivo A₁), formando complejos antígeno-anticuerpo solubles. Dado que la molécula de HbA1c posee un solo epítopo por β -globina para la fijación del anticuerpo específico, no pueden formarse redes de inmunocomplejos.

Con la adición del polihapteno (Reactivo A₂), que posee numerosos epítopos por molécula, se produce la reacción de dichas moléculas con el exceso de anticuerpo específico de la primera reacción, dando lugar a inmunocomplejos insolubles que pueden ser medidos turbidimétricamente a 340 nm. De esta manera, cuanto mayor es el contenido de HbA1c de la muestra, menor es la formación de inmunocomplejos insolubles y menor la señal turbidimétrica obtenida.

Hb

La hemoglobina liberada al hemolizar la muestra, es convertida en un derivado que puede ser medido espectrofotométricamente (Reactivo B).

Este método es capaz de detectar todas las variantes de hemoglobina glicadas en la porción N-terminal de la cadena β , cuya región reconocida por el anticuerpo es idéntica a la HbA1c. De esta manera permite controlar el estado metabólico del diabético con hemoglobinopatías y uremia.

REACTIVOS PROVISTOS

A₁. Reactivo A₁: anticuerpos monoespecíficos anti-HbA1c en buffer pH 6,2.

A₂. Reactivo A₂: polihapteno-HbA1c en buffer pH 6,2.

B. Reactivo B: buffer fosfato pH 7,4.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- **HbA1c Calibrator Turbitest AA** de Wiener lab.

- **Reactivo Hemolizante**, de Wiener lab.

- Agua desmineralizada.

- Solución fisiológica.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos A₁, A₂ y B: listos para usar.

Reactivo Hemolizante: listo para usar.

HbA1c Calibrator Turbitest AA: ver reconstitución en el manual de instrucciones correspondiente. El calibrator no requiere tratamiento previo con el Reactivo Hemolizante.

PRECAUCIONES

Los Reactivos Provistos son para uso diagnóstico "in vitro". El detergente TTAB es corrosivo. H314: Provoca quema-

duras graves en la piel y lesiones oculares graves. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los **Reactivos Provistos** son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Reactivos A₁, A₂ y B: una vez abiertos y en uso son estables 1 mes en refrigerador (2-10°C). Se recomienda conservar los reactivos en heladera bien cerrados cuando no se usan, para evitar recalibraciones frecuentes. No congelar.

Reactivo Hemolizante: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en el rótulo. Evitar contaminaciones (no introducir pipetas u otros elementos en su interior) y cerrar el frasco luego de su uso.

MUESTRA

Sangre entera anticoagulada

a) Recolección: obtener la muestra de la manera usual.

b) Aditivos: se recomienda el uso de heparina o EDTA (**Anticoagulante W** de Wiener lab) como anticoagulante.

c) Sustancias interferentes conocidas: no se observan interferencias por bilirrubina (conjugada y no conjugada) hasta 40 mg/dL, triglicéridos hasta 13 g/L, ácido ascórbico hasta 50 mg/dL y factor reumatoideo hasta 500 U/mL.

Deberán interpretarse con cuidado los valores de HbA1c obtenidos en aquellas patologías o situaciones que alteran la vida media de los eritrocitos, como anemias hemolíticas, anemias ferropénicas, transfusiones, pérdidas de sangre, etc. Referirse a las bibliografías de Young para los efectos de las drogas y las enfermedades en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: la muestra es estable 3 días a temperatura ambiente (15-25°C), 7 días refrigerada (2-10°C) o 6 meses congelada (-20°C). Sólo puede ser descongelada una vez.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Permitir que el Reactivo Hemolizante tome temperatura ambiente antes de usar. Homogeneizar la muestra de sangre por inversión repetida, evitando la formación de espuma. En un tubo de Kahn o hemólisis, agregar:

| | |
|-----------------------------|---------|
| Reactivo Hemolizante | 1000 uL |
| Muestra | 10 uL |

Mezclar, agitando por inversión repetida o bien emplear vortex. Evitar la formación de espuma. Después del cambio de color rojo a marrón verdoso (1-2 minutos), la muestra hemolizada podrá ser empleada.

Estabilidad de muestras hemolizadas: estables 4 horas a temperatura ambiente (15-25°C), 24 horas refrigeradas (2-10°C) o 6 meses congeladas (-20°C). Sólo pueden ser descongeladas una vez.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Analizador automático.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de Kahn o hemólisis.

CONDICIONES DE REACCION

Parámetros generales para analizadores automáticos:

| Nombre del test | HbA1c |
|---------------------------------------|--|
| Tipo de reacción | punto final |
| Long. de onda primaria | 340 nm |
| Temperatura | 37°C |
| Volumen de muestra | 10 uL |
| Volumen de Reactivo A ₁ | 250 uL |
| Volumen de Reactivo A ₂ | 50 uL |
| Incubación de Reactivo A ₁ | 300" |
| Incubación de Reactivo A ₂ | 300" |
| Calibración | 5 puntos |
| Calibradores | Diluciones del Calibrador: 10, 20, 40, 60 y 100%* |

*Las diluciones de HbA1c Calibrator se realizan con Reactivo Hemolizante.

| Nombre del test | Hb |
|--------------------------|------------------------|
| Tipo de reacción | punto final |
| Long. de onda primaria | 570 nm |
| Long. de onda secundaria | 660 nm |
| Temperatura | 37°C |
| Volumen de muestra | 20 uL |
| Volumen de Reactivo B | 230 uL |
| Incubación de Reactivo B | 300" |
| Calibración | 2 puntos |
| Calibradores | C0* y HbA1c Calibrator |

*Como C0 (calibrador cero) puede utilizarse solución fisiológica o Reactivo Hemolizante.

Los volúmenes de muestra y reactivos pueden variarse proporcionalmente, sin que se alteren los factores de cálculo. Solicitar adaptaciones para los analizadores comercializados por Wiener lab. Las adaptaciones no provistas por Wiener lab. deben ser validadas.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

1) Expresión de resultados según IFCC:

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \times 1000$$

2) Expresión de resultados según DCCT/NGSP:

$$\text{HbA1c (%) = } 91,5 \times \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} + 2,15$$

Se recomienda el empleo de un decimal para la expresión de resultados NGSP (%) y sin decimales para los resultados IFCC (mmol/mol).

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

HbA1c Control normal-patológico Turbitest AA.

Los controles no requieren tratamiento previo con el Reactivo Hemolizante.

VALORES DE REFERENCIA

Personas con metabolismo normal:

1- HbA1c (mmol/mol): 29 - 42 (según IFCC)

2- HbA1c (%): 4,8 - 5,9 (según DCCT/NGSP)

En base a los estudios de DCCT y UKPDS se considera que niveles mayores a 7% (DCCT/NGSP) o 53 mmol/mol (IFCC) de HbA1c se asocian a mayor riesgo de complicaciones crónicas.

En general se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia, dentro de su población de pacientes.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Los componentes del kit HbA1c v.2 Turbitest AA son lote-específicos por lo que no pueden intercambiarse con otros lotes. Se recomienda realizar una recalibración completa (HbA1c y Hb), cuando se cambia de lote de reactivo o cuando el control de calidad así lo determina.

Este método fue diseñado para informar HbA1c (mmol/mol) o HbA1c (%), por lo que no deben ser informados individualmente los valores de HbA1c y Hb.

Para preservar la integridad de los reactivos debe evitarse todo tipo de contaminaciones, empleando para la medición únicamente micropipetas perfectamente limpias y secas.

PERFORMANCE

a) Imprecisión: fue evaluada a través del protocolo EP5-A de CLSI. Para ello se procesaron en Konelab 60i, 3 muestras con niveles diferentes de HbA1c (%), obteniéndose los siguientes resultados:

Precisión intraensayo

Hb

| Nivel | D.S. | C.V. |
|-----------|------------|-------|
| 15,1 g/dL | 0,093 g/dL | 0,6 % |
| 13,2 g/dL | 0,061 g/dL | 0,5 % |
| 17,7 g/dL | 0,152 g/dL | 0,9 % |

HbA1c

| | | |
|-----------|------------|-------|
| 0,58 g/dL | 0,006 g/dL | 1,1 % |
| 0,68 g/dL | 0,006 g/dL | 0,9 % |
| 1,23 g/dL | 0,016 g/dL | 1,3 % |

%HbA1c

| | | |
|-------|---------|-------|
| 5,7 % | 0,049 % | 0,9 % |
| 6,9 % | 0,054 % | 0,8 % |
| 8,5 % | 0,087 % | 1,0 % |

Precisión total

Hb

| Nivel | D.S. | C.V. |
|-----------|------------|-------|
| 15,1 g/dL | 0,132 g/dL | 0,9 % |
| 13,2 g/dL | 0,081 g/dL | 0,6 % |
| 17,7 g/dL | 0,203 g/dL | 1,2 % |

HbA1c

| | | |
|-----------|------------|-------|
| 0,58 g/dL | 0,013 g/dL | 2,2 % |
| 0,68 g/dL | 0,013 g/dL | 1,9 % |
| 1,23 g/dL | 0,036 g/dL | 2,9 % |

%HbA1c

| | | |
|-------|---------|-------|
| 5,7 % | 0,076 % | 1,3 % |
| 6,9 % | 0,092 % | 1,3 % |
| 8,5 % | 0,195 % | 2,3 % |

b) Rango de medición de HbA1c: se pueden obtener valores de HbA1c entre 0,3 g/dL y la concentración del HbA1c Calibrator (2,6 g/dL), que corresponde a un rango dinámico aproximado de 23 a 200 mmol/mol de HbA1c según IFCC y de 4,3 a 20,5% según DCCT/NGSP, considerando un nivel de Hb normal (13 g/dL).

Si la concentración de HbA1c es menor a 0,3 g/dL, se aconseja hemolizar la muestra original 1 + 50 con el Reactivo Hemolizante y repetir las determinaciones de HbA1c y Hb, no requiriendo corrección de los resultados obtenidos.

Si la concentración de HbA1c es mayor a la concentración del calibrador más alta, se aconseja diluir el hemolizado 1+1 o hemolizar la muestra original 1 + 200 con el Reactivo Hemolizante y repetir las determinaciones de HbA1c y Hb, no requiriendo corrección de los resultados obtenidos.

c) Rango de medición de Hb: 6 a 30 g/dL.

PRESENTACION

1 x 50 mL Reactivo A₁
1 x 10 mL Reactivo A₂
1 x 50 mL Reactivo B
(Cód. 1453861)

2 x 35 mL Reactivo A₁
2 x 7 mL Reactivo A₂
2 x 35 mL Reactivo B
(Cód. 1008126)*

2 x 50 mL Reactivo A₁
2 x 10 mL Reactivo A₂
2 x 50 mL Reactivo B
(Cód. 1009270)

2 x 52 mL Reactivo A₁
2 x 12 mL Reactivo A₂
2 x 52 mL Reactivo B
(Cód. 1009385)

2 x 60 mL Reactivo A₁
2 x 12 mL Reactivo A₂
2 x 60 mL Reactivo B
(Cód. 1009651)

2 x 60 mL Reactivo A₁
2 x 12 mL Reactivo A₂
2 x 60 mL Reactivo B
(Cód. 1009960)

Wiener lab. provee separadamente:

Reactivo Hemolizante:


- 1 x 500 mL (Cód.1999701)

BIBLIOGRAFIA

- Rahbar, S. - Clin. Chim. Acta 22: 296 (1968).
- Bunn, H. et al - Science 200: 21 (1978).
- Goldstein, D. et al - Diabetes Care 17 : 938 (1994).
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group - N. Engl. J. Med. 329: 977 (1993).
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group - Lancet 352: 837 (1998).
- Sacks, D. et al - Clin Chem 48: 436 (2002).
- Weykamp CW et al. - Clin. Chem. 41: 82 (1995).
- Sacks, D. - Clin Chem 49: 1245 (2003).
- Martina, W et al - Clin Chem 39 : 2259 (1993).
- Karl, J. et al - Klin. Lab 39:991 (1993).
- American Diabetes Association. Diabetes Care [Suppl] 24/1 (2001).
- John, G - Clin. Chem. Lab. Med. 41: 1199 (2003).
- Jeppsson, J. et al. - Clin. Chem. Lab. Med. 40: 78 (2002).
- Jarausch, J et al - Clin Chem. 42 :116 (Abstract 094) (1996).
- Junge, W et al. - Poster presentation 18th International Diabetes Federation Congress, Paris 2003.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Burtis, C.; Ashwood, E. (5^o Edition) WB Saunders, 2001.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5 th ed., 2000.
- Hanas, R. - Clin Chem Lab Med 48 (6) 775-776 (2010).

SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución


 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso

 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo



HbA1c v.2

Método de inibição imunoturbidimétrica para a determinação quantitativa de HbA1c

SIGNIFICADO CLÍNICO

A diabetes mellitus é uma enfermidade crônica, que compreende um conjunto de desordens do metabolismo dos hidratos de carbono que cursam com uma manifestação comum: a hiperglicemia.

O Controle glicêmico periódico permite prevenir os transtornos agudos e reduzir o risco das complicações tardias da enfermidade (retinopatia, nefropatia, neuropatia e enfermidades cardiovasculares).

A relação entre o desenvolvimento e progressão das complicações microvasculares e o controle glicêmico foi debatida por muitos anos, em parte devido aos métodos inadequados para realizar um controle glicêmico retrospectivo.

Os métodos tradicionais de medição de glicose no sangue e na urina tem um valor limitado para este propósito, e só foi com o desenvolvimento de determinações para proteínas glicosiladas ou glicadas, que foi alcançado um conhecimento exato e objetivo do estado glicêmico a longo prazo.

As glicohemoglobinas, também chamadas hemoglobinas glicosiladas, foram descritas pela primeira vez em 1968 por Rahbar como "hemoglobinas diabéticas". Sua produção depende da concentração de glicose e ocorre através de um processo não enzimático pós-traducional chamado glicação, onde o açúcar é unido aos grupos amino das moléculas de hemoglobina (Hb). A glicação dos aminoácidos N-terminais das cadeias α e β , como assim também dos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina na molécula de hemoglobina, resultam em uma variedade de hemoglobinas glicadas, incluindo HbA1c, que constitui a espécie glicosilada na valina N-terminal da cadeia β .

Os níveis de %HbA1c são proporcionais à concentração de glicose no sangue durante as últimas 6-8 semanas. Assim a determinação de %HbA1c provê um parâmetro integral para monitorar o curso do controle de glicose a longo prazo.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

HbA1c v.2 Turbitest AA é um método de inibição imunoturbidimétrica para determinar a quantidade de hemoglobina A1c (HbA1c) como uma proporção da hemoglobina total em sangue total humano (% ou mmol/mol HbA1c). Para isto é necessário liberar a hemoglobina contida nos glóbulos vermelhos, mediante a hemólise da amostra. O sangue do paciente é posta em contato com o **Reactivo Hemolizante** (reagente hemolisante) que contém um detergente (brometo de tetradeciltrimetil amônia - TTAB) que lisa os glóbulos vermelhos especificamente. A partir do hemolisado obtido, é determinado mediante duas reações independentes, o nível de HbA1c e Hb da amostra.

HbA1c

Durante a primeira fase da reação, a HbA1c da amostra reage com o anticorpo específico anti-HbA1c (Reagente A₁), formando complexos antígeno-anticorpo solúveis. Dado que a molécula de HbA1c possui um só epitopo por β -globina para a fixação de anticorpos específicos, não podem ser formadas redes de imunocomplexos. Com a adição de polihapteno (Reagente A₂), que possui numerosos epitopos por molécula, se produz a reação destas moléculas com o excesso de anticorpo específico da primeira reação, dando lugar a imunocomplexos insolúveis que podem ser medidos turbidimetricamente a 340 nm. Desta maneira, quanto maior é o conteúdo de HbA1c na amostra menor é a formação de imunocomplexos insolúveis e menor o sinal turbidimétrico obtido.

Hb

A hemoglobina liberada ao hemolisar a amostra, é convertida em um derivado que pode ser medido espectrofotometricamente (Reagente B).

Este método é capaz de detectar todas as variantes de hemoglobina glicadas na porção N-terminal da cadeia β cuja região reconhecida pelo anticorpo é idêntica a da HbA1c. Desta maneira permite controlar o estado metabólico do diabético com hemoglobinopatias e uremia.

REAGENTES FORNECIDOS

A₁. Reagente A₁: anticorpos monoespecíficos anti-HbA1c em tampão pH 6,2.

A₂. Reagente A₂: polihapteno-HbA1c em tampão pH 6,2.

B. Reagente B: tampão fosfato pH 7,4.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- **HbA1c Calibrador Turbitest AA** de Wiener lab.

- **Reactivo Hemolizante**, de Wiener lab.

- Água desmineralizada.

- Solução fisiológica.

INSTRUÇÕES DE USO

Reagentes A₁, A₂ e B: prontos para uso.

Reactivo Hemolizante: pronto para uso.

HbA1c Calibrador Turbitest AA: vide reconstituição nas instruções de uso correspondente. O Calibrador não requiere tratamento prévio com o **Reactivo Hemolizante**.

PRECAUÇÕES

Os Reagentes Fornecidos são para uso diagnóstico "in vitro". O detergente TTAB é corrosivo. H314 Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. P305 + P351 + P338 SE

ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. P280 Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas. Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Os **Reagentes Fornecidos** são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

Reagentes A₁, A₂ e B: uma vez abertos e em uso, são estáveis 1 mês sob refrigeração (2-10°C). É recomendável conservar os reagentes em geladeira bem fechados quando não são usados, para evitar recalibrações freqüentes. Não congelar.

Reactivo Hemolizante: estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada no rótulo. Evitar contaminações (não introduzir pipetas ou qualquer outro elemento no seu interior) e fechar o frasco após o seu uso.

AMOSTRA

Sangue total anticoagulado

a) Coleta: obter a amostra da maneira usual.

b) Aditivos: é recomendável utilizar heparina ou EDTA (**Anticoagulante W** da Wiener lab.) como anticoagulante.

c) Substâncias interferentes conhecidas: não são observadas interferências por bilirrubina (conjugada e não conjugada) até 40 mg/dL, triglicerídeos até 13 g/L, ácido ascórbico até 50 mg/dL nem fator reumatóide até 500 U/mL. Deverão se interpretar com precaução os valores de HbA1c obtidos naquelas patologias ou situações que alteram a vida média dos eritrócitos, como anemias hemolíticas, anemias ferropênicas, transfusões, perda de sangue, etc. Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas e enfermidades neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra é estável por até 3 dias a temperatura ambiente (15-25°C), até 7 dias sob refrigeração (2-10°C) ou até 6 meses congelada (-20°C). Só pode ser descongelada uma vez.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Permitir que o **Reactivo Hemolizante** fique a temperatura ambiente antes de usar. Homogeneizar a amostra de sangue por inversão repetida, evitando a formação de espuma. Em um tubo de Kahn ou hemólise, colocar:

| | |
|-----------------------------|---------|
| Reactivo Hemolizante | 1000 µL |
| Amostra | 10 µL |

Misturar, agitando por inversão repetida ou bem utilizar vortex. Evitar a formação de espuma. Depois da mudança de cor vermelho para o marrom esverdeado (1-2 minutos), a amostra hemolisada poderá ser utilizada.

Estabilidade de amostras hemolisadas: são estáveis por até 4 horas a temperatura ambiente (15-25°C), até 24 horas sob refrigeração (2-10°C) ou até 6 meses congelada (-20°C). Só podem-se descongelar uma vez.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Analisador automático.
- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.
- Tubos de Kahn ou hemólise.

CONDIÇÕES DE REAÇÃO

Parâmetros gerais para analisadores automáticos:

| Nome do test | HbA1c |
|--------------------------------------|--|
| Tipo de reação | ponto final |
| Comprimento de onda 1 ^a | 340 nm |
| Temperatura | 37°C |
| Volume de amostra | 10 µl |
| Volume de Reagente A ₁ | 250 µl |
| Volume de Reagente A ₂ | 50 µl |
| Incubação de Reagente A ₁ | 300" |
| Incubação de Reagente A ₂ | 300" |
| Calibração | 5 pontos |
| Calibradores | Diluições do Calibrador: 10, 20, 40, 60 e 100%* |

*As diluições de HbA1c Calibrador são realizadas com **Reactivo Hemolizante**.

| Nome do test | Hb |
|------------------------------------|------------------------|
| Tipo de reação | ponto final |
| Comprimento de onda 1 ^a | 570 nm |
| Comprimento de onda 2 ^a | 660 nm |
| Temperatura | 37°C |
| Volume de amostra | 20 µl |
| Volume de Reagente B | 230 µl |
| Incubação de Reagente B | 300" |
| Calibração | 2 pontos |
| Calibradores | C0* e HbA1c Calibrador |

*Como C0 (calibrador zero) pode ser utilizada solução fisiológica ou **Reactivo Hemolizante**.

Os volumes de amostra e reagentes podem ser variados proporcionalmente, sem que sejam alterados os fatores de cálculo.

Solicitar as aplicações para os analisadores comercializados pela Wiener lab. As aplicações não fornecidas pela Wiener lab. devem ser avaliadas.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

1) Expressão de resultados segundo IFCC:

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \times 1000$$

2) Expressão de resultados segundo DCCT/NGSP:

$$\text{HbA1c (\%)} = 91,5 \times \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} + 2,15$$

É recomendável o uso de um decimal na expressão de resultados NGSP (%) e sem decimais nos resultados IFCC (mmol/mol).

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

HbA1c Control normal-patológico Turbitest AA.

Os controles não requerem tratamento prévio com o **Reativo Hemolizante**.

VALORES DE REFERÊNCIA

Pessoas com metabolismo normal:

1- HbA1c (mmol/mol): 29-42 (segundo IFCC)

2- HbA1c (%): 4,8-5,9 (segundo DCCT/NGSP)

Baseado nos estudos de DCCT e UKPDS, é considerado que níveis maiores a 7% (DCCT/NGSP) ou 53 mmol/mol (IFCC) de HbA1c estão associados a maior risco de complicações crônicas.

Em geral, é recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios intervalos de referência, dentro da sua população de pacientes.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. Os componentes do kit HbA1c v.2 Turbitest AA são lote-específicos, portanto não podem ser intercambiados com outros lotes. É recomendável realizar uma recalibração completa (HbA1c e Hb) quando é mudado o lote de reagente ou quando o controle de qualidade assim o determina.

Este método foi desenvolvido para informar HbA1c (mmol/mol) ou HbA1c (%), de modo que não devem ser informados por separado os valores de HbA1c e Hb.

Para preservar a integridade dos reagentes deve ser evitada todo tipo de contaminação, utilizando para a medição unicamente micropipetas perfeitamente limpas e secas.

DESEMPENHO

a) Imprecisão: fora avaliada através do protocolo EP5-A da CLSI. Para isso foram processadas em Konelab 60i, 3 amostras com diferentes níveis de HbA1c (%), obtendo-se os seguintes resultados:

Precisão intra-ensaio

Hb

| Nível | D.P. | C.V. |
|-----------|------------|-------|
| 15,1 g/dL | 0,093 g/dL | 0,6 % |
| 13,2 g/dL | 0,061 g/dL | 0,5 % |
| 17,7 g/dL | 0,152 g/dL | 0,9 % |

HbA1c

| | | |
|-----------|------------|-------|
| 0,58 g/dL | 0,006 g/dL | 1,1 % |
| 0,68 g/dL | 0,006 g/dL | 0,9 % |
| 1,23 g/dL | 0,016 g/dL | 1,3 % |

%HbA1c

| | | |
|-------|---------|-------|
| 5,7 % | 0,049 % | 0,9 % |
| 6,9 % | 0,054 % | 0,8 % |
| 8,5 % | 0,087 % | 1,0 % |

Precisão total

Hb

| Nível | D.P. | C.V. |
|-----------|------------|-------|
| 15,1 g/dL | 0,132 g/dL | 0,9 % |
| 13,2 g/dL | 0,081 g/dL | 0,6 % |
| 17,7 g/dL | 0,203 g/dL | 1,2 % |

HbA1c

| | | |
|-----------|------------|-------|
| 0,58 g/dL | 0,013 g/dL | 2,2 % |
| 0,68 g/dL | 0,013 g/dL | 1,9 % |
| 1,23 g/dL | 0,036 g/dL | 2,9 % |

%HbA1c

| | | |
|-------|---------|-------|
| 5,7 % | 0,076 % | 1,3 % |
| 6,9 % | 0,092 % | 1,3 % |
| 8,5 % | 0,195 % | 2,3 % |

b) Faixa de medição de HbA1c: podem ser obtidos valores de HbA1c entre 0,3 g/dL e a concentração do HbA1c Calibrator (2,6 g/dL) que corresponde a uma faixa dinâmica aproximada de 23 a 200 mmol/mol de HbA1c segundo a IFCC e de 4,3 a 20,5% segundo a DCCT/NGSP, considerando um nível de Hb normal (13 g/dL).

Se a concentração de HbA1c é menor a 0,3 g/dL, é recomendável hemolisar a amostra original 1 + 50 com o **Reativo Hemolizante** e repetir as determinações de HbA1c e Hb, não requerendo correção dos resultados obtidos.

Se a concentração de HbA1c é maior à concentração do calibrador mais alta, é recomendável diluir o hemolisado 1 + 1 ou hemolisar a amostra original 1 + 200 com o **Reativo Hemolizante** e repetir as determinações de HbA1c e Hb, não requerendo correção dos resultados obtidos.

d) Faixa de medição de Hb: 6 a 30 g/dL.

APRESENTAÇÃO

1 x 50 mL Reagente A₁
1 x 10 mL Reagente A₂
1 x 50 mL Reagente B
(Cód. 1453861)

2 x 35 mL Reagente A₁
2 x 7 mL Reagente A₂
2 x 35 mL Reagente B
(Cód. 1008126)*

2 x 50 mL Reagente A₁
2 x 10 mL Reagente A₂
2 x 50 mL Reagente B
(Cód. 1009270)

2 x 52 mL Reagente A₁
2 x 12 mL Reagente A₂
2 x 52 mL Reagente B
(Cód. 1009385)

2 x 60 mL Reagente A₁
2 x 12 mL Reagente A₂
2 x 60 mL Reagente B
(Cód. 1009651)

2 x 60 mL Reagente A₁
2 x 12 mL Reagente A₂
2 x 60 mL Reagente B
(Cód. 1009960)

Wiener lab. fornece separadamente:

Reactivo Hemolizante:


- 1 x 500 mL (Cód. 1999701)

REFERÊNCIAS

- Rahbar, S. - Clin. Chim. Acta 22: 296 (1968).
- Bunn, H. et al - Science 200: 21 (1978).
- Goldstein, D. et al - Diabetes Care 17 : 938 (1994).
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group - N. Engl. J. Med. 329: 977 (1993).
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group - Lancet 352: 837 (1998).
- Sacks, D. et al - Clin Chem 48: 436 (2002).
- Weykamp CW et al. - Clin. Chem. 41: 82 (1995).
- Sacks, D. - Clin Chem 49: 1245 (2003).
- Martina, W et al - Clin Chem 39 : 2259 (1993).
- Karl, J. et al - Klin. Lab 39:991 (1993).
- American Diabetes Association. Diabetes Care [Suppl] 24/1 (2001).
- John, G - Clin. Chem. Lab. Med. 41: 1199 (2003).
- Jeppsson, J. et al. - Clin. Chem. Lab. Med. 40: 78 (2002).
- Jarausch, J et al - Clin Chem. 42 :116 (Abstract 094) (1996).
- Junge, W et al. - Poster presentation 18th International Diabetes Federation Congress, Paris 2003.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Burtis, C.; Ashwood, E. (5^o Edition) WB Saunders, 2001.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5 th ed., 2000.
- Hanas, R. - Clin Chem Lab Med 48 (6) 775-776 (2010).


SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.

 Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"


 Representante autorizado na Comunidade Europeia

 Uso médico-diagnóstico "in vitro"


 Conteúdo suficiente para <n> testes

 Data de validade

 Limite de temperatura (conservar a)

 Não congelar

 Risco biológico

 Volume após a reconstituição

 Conteúdo


 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante

 Consultar as instruções de uso

 Calibrador

 Controle

 Controle Positivo

 Controle Negativo

 Número de catálogo



HbA1c v.2

Turbidimetric inhibition immunoassay for quantitative determination of HbA1c

SUMMARY

Diabetes mellitus is a chronic disease, comprising a group of carbohydrates metabolism disorders that are related to a common manifestation: hyperglycemia. Periodic monitoring of blood glucose levels prevents the occurrence of acute disorders and reduces the risk of long-term complications of the disease (retinopathy, neuropathy, nephropathy and cardiovascular diseases).

The relationship between the development and progression of microvascular complications and glycemic control has long been debated, partly due to inadequate methods to perform a retrospective glycemic control. The usual methods to measure glucose in blood and in urine employed to monitoring the disease have limited value for this purpose. The development of methods to determine glycosylated or glycated proteins leads to an accurate knowledge of the long-term glycemic state.

Glycohemoglobins also called glycosylated or glycated hemoglobins, were first described by Rahbar in 1968 as "diabetic hemoglobins". The glycated hemoglobins production depends on blood glucose concentration and they are formed by the non-enzymatic mechanism called glycation, where glucose is attached to the amino groups of the hemoglobin (Hb). The glycation of the N-terminal amino acids of the hemoglobin a and b chains as well as the e amino groups of lysine residues in hemoglobin molecules, result in a variety of glycated hemoglobins, including HbA1c. HbA1c is formed by glycation of free amino groups at the N-terminal amino acid valine of the hemoglobin β -chain.

HbA1c levels are proportional to blood glucose concentration during the last 6-8 weeks. Therefore, HbA1c determination provides reliable information for long-term glycemia monitoring in the diabetic patient.

PRINCIPLE

HbA1c v.2 Turbitest AA is a turbidimetric inhibition immunoassay to determine hemoglobin concentration A1c (HbA1c) as a percentage of a total hemoglobin in human whole blood (% or mmol/mol HbA1c). Consequently, the hemoglobin contained in red blood cells is released by hemolysis of the sample.

Reactivo Hemolizante (Hemolyzing Reagent) containing a detergent (tetradecyltrimethylammonium bromide - TTAB) to specifically lyse red blood cells is added to the patient's blood. HbA1c and Hb levels in the sample are determined from the obtained hemolysate by two independent reactions.

HbA1c

During the first stage of the reaction, the HbA1c in the sample reacts with the anti-HbA1c specific antibody (Reagent A₁) to form soluble antigen-antibody complexes. Since the HbA1c molecule has only one epitope per b-globin for specific antibody binding, immune complex formation does not take place.

Then, the polyhapten is added (Reagent A₂), which has numerous epitopes per molecule and reacts with the specific antibody excess from the first reaction, producing insoluble immune complexes which can be measured turbidimetrically at 340 nm. Therefore, the greater the HbA1c content in the sample, the lesser is the insoluble immune complex formation and the lesser the obtained turbidimetric signal.

Hb

Released hemoglobin in the hemolyzed sample is converted to a derivate that can be spectrophotometrically measured (Reagent B).

This method is capable of detecting all hemoglobin variants which are glycated at the N-terminal of the β -chain N-terminus and which have antibody-recognizable regions identical to that of HbA1c. Thus, the metabolic state of diabetic patients having hemoglobinopathies and uremia can be monitored using this assay.

PROVIDED REAGENTS

A₁. Reagent A₁: monospecific antibodies anti-HbA1c in pH 6.2 buffer.

A₂. Reagent A₂: polyhapten-HbA1c in pH 6.2 buffer.

B. Reagent B: pH 7.4 phosphate buffer.

NON-PROVIDED REAGENTS

- Wiener lab's **HbA1c Calibrator Turbitest AA**

- Wiener lab's **Reactivo Hemolizante**.

- Demineralized water.

- Saline solution.

INSTRUCTIONS FOR USE

Reagents A₁, A₂ and B: ready to use.

Reactivo Hemolizante: ready to use.

HbA1c Calibrator Turbitest AA: refer to the reconstitution process in the corresponding package insert. The calibrator does not require pretreatment with **Reactivo Hemolizante**.

WARNINGS

Provided Reagents are for "in vitro" diagnostic use.

The TTAB detergent is corrosive. H314 Causes severe skin

burns and eye damage. P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.

Use the reagents according to the working procedures for clinical laboratories.

All reagents and samples should be discarded according to the local regulations in force.

STABILITY AND STORAGE INSTRUCTIONS

The **Provided Reagents** are stable in refrigerator (2-10°C) until the expiration date stated on the box. Do not freeze.

Reagents A₁, A₂ and B: once opened the reagents are stable for one month in refrigerator (2-10°C). Keep the reagents in refrigerator and tightly closed when unused to avoid frequent recalibrations. Do not freeze.

Reactivo Hemolizante: stable in refrigerator (2-10°C) until the expiration date stated on the box. Avoid contamination (do not introduce pipettes or other elements) and close the bottle after use.

SAMPLE

Anticoagulated whole blood

a) Collection: obtain in the usual way.

b) Additives: use heparin or EDTA (Wiener lab's **Anticoagulante W**) as anticoagulant.

c) Known interfering substances: no interferences have been observed by bilirubin (conjugated and non-conjugated) up to 40 mg/dl, triglycerides up to 13 g/l, ascorbic acid up to 50 mg/dl and rheumatoid factor up to 500 U/ml.

Mind the HbA1c values obtained in those pathologies and situations that alter the mean life of erythrocytes, as hemolytic anemia, ferropenic anemia, transfusions, blood loss, etc. See Young, D.S. in References for effect of drugs on the present method.

d) Stability and storage instructions: the sample is stable for 3 days at room temperature (15-25°C), for 7 days refrigerated (2-10°C) or for 6 months frozen (-20°C). Samples can only be frozen and thawed once.

SAMPLE PREPARATION

Bring **Reactivo Hemolizante** to room temperature prior to use. Homogenize the blood sample by repeated inversion, avoiding foam formation.

In a Kahn or hemolysis tube, add:

| | |
|-----------------------------|---------|
| Reactivo Hemolizante | 1000 ul |
| Sample | 10 ul |

Mix using a vibration mixer or by gentle swirling. Avoid foam formation. The hemolyzed sample can be used after the solution has changed color from red to brownish-green (1-2 minutes).

Stability of the hemolyzed sample: stable for 4 hours at room temperature (15-25°C), for 24 hours refrigerated (2-10°C) or for 6 months frozen (-20°C). Samples can only be frozen and thawed once.

REQUIRED MATERIAL (non-provided)

- Autoanalyzer.

- Micropipettes and pipettes for measuring stated volumes.

- Kahn or hemolysis tubes.

ASSAY CONDITIONS

General parameters for automatic analyzers:

| Test name | HbA1c |
|-----------------------------------|---|
| Reaction type | endpoint |
| Primary wavelength | 340 nm |
| Temperature | 37°C |
| Sample volume | 10 ul |
| Reagent A ₁ volume | 250 ul |
| Reagent A ₂ volume | 50 ul |
| Reagent A ₁ incubation | 300" |
| Reagent A ₂ incubation | 300" |
| Calibration | 5 points |
| Calibrators | Calibrator dilutions: 10, 20, 40, 60 and 100%* |

*HbA1c Calibrator dilutions are performed with Reactivo Hemolizante

| Test name | Hb |
|----------------------|--------------------------|
| Reaction type | endpoint |
| Primary wavelength | 570 nm |
| Secondary wavelength | 660 nm |
| Temperature | 37°C |
| Sample volume | 20 ul |
| Reagent B volume | 230 ul |
| Reagent B incubation | 300" |
| Calibration | 2 points |
| Calibrators | C0* and HbA1c Calibrator |

*Use saline solution or **Reactivo Hemolizante** as "C0" (Calibrator 0).

Sample and reagent volumes may proportionally change without affecting the calculation factors.

Refer to the appropriate applications for Wiener lab auto-analyzers. The applications not provided by Wiener lab. must be validated.

CALCULATIONS

1) According to IFCC:

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \times 1000$$

2) According to DCCT/ NGSP:

$$\text{HbA1c (%) = } 91.5 \times \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} + 2.15$$

We recommend the use of a decimal place to express NGSP results (%) and no decimal places for IFCC results (mmol/mol).

QUALITY CONTROL METHOD

HbA1c Control normal-patológico Turbitest AA.

The controls do not require pretreatment with the **Reactivo Hemolizante**.

REFERENCE VALUES

Metabolically healthy patients:

1- HbA1c (mmol/mol): 29-42 (according to IFCC)

2- HbA1c (%): 4.8-5.9 (according to DCCT/NGSP)

Based on DCCT and UKPDS studies, the HbA1c levels above 7% (DCCT/NGSP) or 53 mmol/mol (IFCC) are related to a higher risk for chronic complications.

Each laboratory should determine its own reference range for its patient population.

PROCEDURE LIMITATIONS

See Known interfering substances under SAMPLE.

The components of the HbA1c v.2 Turbitest AA kit are lot-specific; therefore they cannot be exchanged with other lots. Perform a complete recalibration when the reagent lot is changed or when determined by the QC department.

This method was designed to report HbA1c (mmol/mol) or HbA1c (%), therefore HbA1c and Hb values should be reported separately. Avoid contamination to preserve the integrity of the reagents. Use only thoroughly clean and dry micropipettes for measurements.

PERFORMANCE

a) Imprecision: evaluated by protocol EP5-A from CLSI. Three samples with different HbA1c (%) levels were tested in Konelab 60i. The following results were obtained:

Intra-assay precision

| Hb | Level | S.D. | C. V. |
|----|-----------|------------|-------|
| | 15.1 g/dl | 0.093 g/dl | 0.6% |
| | 13.2 g/dl | 0.061 g/dl | 0.5% |
| | 17.7 g/dl | 0.152 g/dl | 0.9% |

| HbA1c | Level | S.D. | C. V. |
|-------|-----------|------------|-------|
| | 0.58 g/dl | 0.006 g/dl | 1.1% |
| | 0.68 g/dl | 0.006 g/dl | 0.9% |
| | 1.23 g/dl | 0.016 g/dl | 1.3% |

| %HbA1c | Level | S.D. | C. V. |
|--------|-------|---------|-------|
| | 5.7 % | 0.049 % | 0.9 % |
| | 6.9 % | 0.054 % | 0.8 % |
| | 8.5 % | 0.087 % | 1.0 % |

Total precision

| Hb | Level | S.D. | C.V. |
|----|-----------|------------|------|
| | 15.1 g/dl | 0.132 g/dl | 0.9% |
| | 13.2 g/dl | 0.081 g/dl | 0.6% |
| | 17.7 g/dl | 0.203 g/dl | 1.2% |

| HbA1c | Level | S.D. | C.V. |
|-------|-----------|------------|------|
| | 0.58 g/dl | 0.013 g/dl | 2.2% |
| | 0.68 g/dl | 0.013 g/dl | 1.9% |
| | 1.23 g/dl | 0.036 g/dl | 2.9% |

| %HbA1c | Level | S.D. | C.V. |
|--------|-------|---------|------|
| | 5.7 % | 0.076 % | 1.3% |
| | 6.9 % | 0.092 % | 1.3% |
| | 8.5 % | 0.195 % | 2.3% |

b) HbA1c measuring range: HbA1c values may be obtained between 0.3 g/dl and the highest HbA1c calibrator concentration (2.6 g/dl), corresponding to an approximate dynamic range of 23 to 200 mmol/mol HbA1c according to IFCC and of 4.3 to 20.5% according to DCCT/NGSP, considering a normal Hb level (13 g/dl). If HbA1c concentration is below 0.3 g/dl, the original sample must be hemolyzed 1 + 50 with **Reactivo Hemolizante** and repeat HbA1c and Hb determinations, without correcting the obtained results.

If HbA1c concentration is above the highest calibrator concentration, dilute the hemolysate 1+1 or hemolyze the original sample 1 + 200 with **Reactivo Hemolizante** and repeat HbA1c and Hb determinations, without correcting the obtained results.

c) Hb measuring range: 6 to 30 g/dl.

WIENER LAB. PROVIDES

1 x 50 mL Reagent A₁
1 x 10 mL Reagent A₂
1 x 50 mL Reagent B
(Cat. N° 1453861)

2 x 35 mL Reagent A₁
2 x 7 mL Reagent A₂
2 x 35 mL Reagent B
(Cat. N° 1008126)*

2 x 50 mL Reagent A₁
2 x 10 mL Reagent A₂
2 x 50 mL Reagent B
(Cat. N° 1009270)

2 x 52 mL Reagent A₁
2 x 12 mL Reagent A₂
2 x 52 mL Reagent B
(Cat. N° 1009385)

2 x 60 mL Reagent A₁
2 x 12 mL Reagent A₂
2 x 60 mL Reagent B
(Cat. N° 1009651)

2 x 60 mL Reagent A₁
2 x 12 mL Reagent A₂
2 x 60 mL Reagent B
(Cat. N° 1009960)

Separately provided:

Reactivo Hemolizante:

- 1 x 500 ml (Cat. N° 1999701)


REFERENCES

- Rahbar, S. - Clin. Chim. Acta 22: 296 (1968).
- Bunn, H. et al - Science 200: 21 (1978).
- Goldstein, D. et al - Diabetes Care 17 : 938 (1994).
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group - N. Engl. J. Med. 329: 977 (1993).
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group - Lancet 352: 837 (1998).
- Sacks, D. et al - Clin Chem 48: 436 (2002).
- Weykamp CW et al. - Clin. Chem. 41: 82 (1995).

- Sacks, D. - Clin Chem 49: 1245 (2003).
- Martina, W et al - Clin Chem 39 : 2259 (1993).
- Karl, J. et al - Klin. Lab 39:991 (1993).
- American Diabetes Association. Diabetes Care [Suppl] 24/1 (2001).
- John, G - Clin. Chem. Lab. Med. 41: 1199 (2003).
- Jeppsson, J. et al. - Clin. Chem. Lab. Med. 40: 78 (2002).
- Jarausch, J et al - Clin Chem. 42 :116 (Abstract 094) (1996).
- Junge, W et al. - Poster presentation 18th International Diabetes Federation Congress, Paris 2003.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Burtis, C.; Ashwood, E. (5^o Edition) WB Saunders, 2001.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5 th ed., 2000.
- Hanas, R. - Clin Chem Lab Med 48 (6) 775-776 (2010).


SYMBOLS

The following symbols are used in the packaging for Wiener lab. diagnostic reagents kits.

 This product fulfills the requirements of the European Directive 98/79 EC for "in vitro" diagnostic medical devices

 Authorized representative in the European Community

 "In vitro" diagnostic medical device

 Contains sufficient for <n> tests

 Use by

 Temperature limitation (store at)

 Do not freeze

 Biological risks


 Volume after reconstitution

 Contents

 Batch code

 Manufactured by:

 Harmful

 Corrosive / Caustic

 Irritant

 Consult instructions for use

 Calibrator

 Control

 Positive Control

 Negative Control

 Catalog number



HbA1c v.2

Turbidymetryczna immunochemiczna metoda inhibicji do ilościowego oznaczania HbA1c

Nr. kat. 1453861 Nr. kat. 1009651
Nr. kat. 1009270 Nr. kat. 1009960
Nr. kat. 1009385 Nr. kat. 1008126

WSTĘP

Cukrzyca jest przewlekłą chorobą zawierającą zaburzeń metabolizmu węglowodanów, które pojawiają się wraz ze wspólną manifestacją: hiperglikemię. Monitoring poziomu cukru we krwi zapobiega wystąpieniu ostrych stanów i zmniejsza ryzyko przewlekłych powikłań chorobowych (retinopatii, neuropatii, nefropatii oraz powikłań sercowo naczyniowych).

Związek pomiędzy kontrolą glikemii a rozwojem i progresją powikłań mikronaczyniowych przez długi czas pozostawał kontrowersyjny częściowo ze względu na brak właściwych metod oceny długoterminowej kontroli glikemii.

Zwykle metody służące do pomiaru glukozy we krwi i moczu mają ograniczoną wartość w monitoringu. Prawidłową długoterminową ocenę stanu glikemii przyniósł dopiero rozwój metod oznaczania glikolizowanych i glikowanych białek.

Glikohemoglobina, zwana również hemoglobina glikolizowaną lub glikowaną, po raz pierwszy została opisana przez Rahbar w 1968 jako hemoglobina cukrzyków. Tworzenie się hemoglobiny glikowanej związane jest z przyłączeniem się glukozy do grup aminowych hemoglobiny (Hb) w mechanizmie nieenzymatycznym określanym jako glikowanie. Proces ten zachodzi na zakończeniach N-aminokwasów łańcuchów α i β hemoglobiny jak również grup ϵ aminowych lizyny dając różnorodność glikowanych hemoglobin typu HbA1c.

HbA1c jest utworzona przez glikowanie wolnych grup aminowych bieguna N-aminokwasu waliny łańcucha β hemoglobiny.

Poziomy HbA1c są proporcjonalne do stężenia glukozy w ciągu ostatnich 6-8 tygodni. Zatem oznaczenie HbA1c stanowi integralny parametr do długoterminowym monitoringu glikemii u pacjentów z cukrzycą.

ZASADA DZIAŁANIA

HbA1c v.2 Turbitest AA jest badaniem immunochemicznym (immunoassay) turbidymetrycznej inhibicji do oznaczania ilości hemoglobiny A1c (HbA1c) w stosunku do całkowitej hemoglobiny w pełnej krwi (% o mmol/mol HbA1c). W trakcie hemolizy krwinek czerwonych hemoglobina jest stale uwalniana do próbki. Metoda ta wykorzystuje **Reactivo Hemolizante** (Odczynnik hemolizujący) zawierający detergent TTAB (tetradecyltrimethylammonium bromide) do lizy czerwonych komórek krwi. Poziom HbA1c i Hb w próbce otrzymujemy z hemolizatu w dwóch niezależnych reakcjach.

HbA1c

W czasie pierwszego etapu reakcji HbA1c w próbce reaguje z przeciwciałami anti-HbA1c, które jest specyficznym przeciwciałem (Odczynnik A1) tworzącym rozpuszczalny kompleks antygen-przeciwciało. Przeciwciało anti HbA1c reaguje wyłącznie w jednym miejscu z HbA1c i dalsze tworzenie kompleksów nie zachodzi. Następnie dodawany jest polihapten (Odczynnik A2), który na cząsteczce ma wiele epitopów reagujących z przeciwciałem, wiążąc nadmiar specyficznych przeciwciał z pierwszej reakcji, tworząc równocześnie nierozpuszczalne immunokompleksy mierzone turbidymetrycznie przy 340 nm. Z powyższych reakcji wynika, że im więcej HbA1c w materiale badanym, tym mniej jest tworzonych nierozpuszczalnych kompleksów i równocześnie sygnał turbidymetryczny jest słabszy.

Hb

Uwolniona hemoglobina w trakcie hemolizy w badanej próbce daje produkt, który można zmierzyć spektrofotometrycznie (Odczynnik B).

Ta metoda pozwala na wykrycie wszystkich odmian hemoglobiny glikowanej na biegunie N-łańcucha β , których rejon rozpoznany przez przeciwciała jest taki sam jak w HbA1c.

Dzięki temu możemy również określać zaburzenia metaboliczne u pacjentów z cukrzycą z towarzyszącą mocznicą i hemoglobinopatiami.

DOSTARCZANE ODCZYNNIKI

A₁. Odczynnik A₁: monospecyficzne przeciwciała anti-HbA1c w buforze pH 6,2.

A₂. Odczynnik A₂: polihapten-HbA1c w buforze pH 6,2.

B. Odczynnik B: pH 7,4 Bufor fosforanowy.

NIEDOSTARCZANE ODCZYNNIKI

- **HbA1c Calibrator Turbitest AA** Wiener lab.

- **Reactivo Hemolizante** Wiener lab.

- Dejonizowana woda.

- Roztwór soli fizjologicznej.

INSTRUKCJA UŻYCIA

Odczynniki A₁, A₂ i B: gotowe do użycia.

Reactivo Hemolizante: gotowy do użycia.

HbA1c Calibrator Turbitest AA: należy rozpuścić według odpowiednich instrukcji. Kalibrator nie wymaga obróbki wstępnej z odczynnikiem Reactivo Hemolizante.

OSTRZEŻENIA

Odczynniki tylko do diagnostyki "in vitro".

TTAB detergent jest żrący. H314 Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. P305 + P351 + P338 W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. P280 Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. Stosować odczynniki zgodnie z procedurami dla laboratoriów klinicznych.

Odczynniki i materiał badany odrzucać zgodnie z lokalnymi przepisami.

TRWAŁOŚĆ I WARUNKI PRZECHOWYWANIA

Dostarczane odczynniki są trwałe w lodówce (2-10°C) do końca daty ważności umieszczonej na opakowaniu. Nie zamrażać.

Odczynniki A₁, A₂ i B: po otwarciu są trwałe przez 1 miesiąc w lodówce (2-10°C). Kiedy nie są używane trzymać odczynniki zamknięte w lodówce w celu uniknięcia częstej kalibracji. Nie zamrażać.

Reactivo Hemolizante: jest trwały w lodówce (2-10°C) do końca daty ważności umieszczonej na opakowaniu. Unikać zanieczyszczenia (nie wkładać pipetek lub inne elementy w ich wnętrzu) i zamknąć fiolkę po użyciu.

MATERIAŁ BADANY

Pełna krew z dodatkiem antykoagulantu

a) Pobranie: pobrać w klasyczny sposób.

b) Substancje dodatkowe: stosować heparynę lub EDTA (**Anticoagulante W** Wiener lab) jako antykoagulant.

c) Znane interakcje: nie obserwuje się interakcji z bilirubiną (związaną i niezwiązaną) do stężenia 40 mg/dL, trójglicerydami do stężenia 13 g/l, kwasem askorbinowym do stężenia 50 mg/dL i czynnika reumatoidalnego do stężenia 500 U/mL.

Należy zachować ostrożność w ocenie wartościach HbA1c w stanach, które zmieniają średnią żywotność erytrocytów takich jak: anemia hemolityczna, anemia syderopeniczna, przetoczenia, utrata krwi, itp. Zobacz źródło: Young, D.S. w sprawie wpływu leków w tej metodzie.

d) Trwałość i instrukcja przechowywania: materiał jest stabilny do 3 dni w temperaturze pokojowej (15-25°C), do 7 dni w lodówce (2-10°C) lub przez 6 miesięcy zamrożony (-20°C). Materiał może być tylko jednokrotnie zamrożony i rozmrożony.

PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BADANEGO

Reactivo Hemolizante doprowadzić do temperatury pokojowej przed użyciem. Homogenizować próbkę krwi poprzez odwracanie unikając spienienia. Do próbki Kahna lub do hemolizy dodać:

| | |
|----------------------|---------|
| Reactivo Hemolizante | 1000 uL |
| Materiał badany | 10 uL |

Wymieszać używając wirówki lub poprzez łagodne odwracanie. Unikać spienienia. Hemolizat może być użyty jeśli roztwór zmieni barwę czerwoną na brązowo-zieloną (ok. 1-2 minuty).

Trwałość hemolizatu stabilny do 4 godz. w temperaturze pokojowej (15-25°C), do 24 godz. w lodówce (2-10°C) lub do 6 miesięcy zamrożony (-20°C). Materiał badany może być tylko jednokrotnie zamrożony i rozmrożony.

WYMAGANE MATERIAŁY I SPRZĘT (niedostarczane)

- Analizator automatyczny.
- Mikropipety i pipety.
- Probówki Kahna lub do hemolizy.

WARUNKI DLA PRZEPROWADZENIA TESTU

Ogólne parametry dla analizatorów automatycznych:

| Nazwa testu | HbA1c |
|-----------------------------|--|
| Typ reakcji | Punkt końcowy |
| Długość fali | 340 nm |
| Temperatura | 37°C |
| Objętość materiału badanego | 10 uL |
| Objętość Odczynnika A1 | 250 uL |
| Objętość Odczynnika A2 | 50 uL |
| Inkubacja Odczynnika A1 | 300" |
| Inkubacja Odczynnika A2 | 300" |
| Kalibracja | 5 punktowa |
| Kalibratory | Rozcieńczenia kalibratora: 10, 20, 40, 60 y100%* |

*Rozcieńczenia kalibratora HbA1c Calibrator wykonane są z odczynnikiem Reactivo Hemolizante.

| Nazwa testu | Hb |
|-----------------------------|------------------------|
| Typ reakcji | Punkt końcowy |
| Pierwotna długość fali | 570 nm |
| Wtórna długość fali | 660 nm |
| Temperatura | 37°C |
| Objętość materiału badanego | 20 uL |
| Objętość Odczynnika B | 230 uL |
| Inkubacja Odczynnika B | 300" |
| Kalibracja | 2 punktowa |
| Kalibratory | C0* i HbA1c Calibrator |

*Użyć roztworu soli fizjologicznej lub Reactivo Hemolizante jako C0 (Kalibrator 0).

Objętości materiału badanego i Odczynnika można proporcjonalnie zmieniać bez zmiany współczynnika w obliczeniach.

Należy zażądać aplikacje dla analizatorów automatycznych Wiener lab. Aplikacje niedostarczone przez Wiener lab. muszą zostać zatwierdzone.

OBLICZENIA

1) Obliczenie wyników zgodnie z IFCC:

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \times 1000$$

2) Obliczenie wyników zgodnie z DCCT/NGSP:

$$\text{HbA1c (\%)} = 91,5 \times \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} + 2,15$$

Zaleca się stosowanie jednego miejsca po przecinku dla wyników obliczonych zgodnie z NGSP (%) i bez miejsc po przecinku dla wyników obliczonych zgodnie z IFCC (mmol/mol).

METODA KONTROLI JAKOŚCI

HbA1c Control Turbitest AA Wiener lab.

Próby kontrolne nie wymagają obróbki wstępnej z odczynnikami Reactivo Hemolizante.

WARTOŚCI REFERENCYJNE

Pacjenci bez zaburzeń metabolicznych:

1- HbA1c (mmol/mol): 29 - 42 (zgodnie z IFCC)

2- HbA1c (%): 4,8 - 5,9 (zgodnie z DCCT/NGSP)

Na podstawie prac DCCT i UKPDS, poziomy powyżej 7% (DCCT/NGSP) lub 53 mmol/mol (IFCC) de HbA1c powiązane są z wysokim ryzykiem chorób przewlekłych.

Zaleca się dla każdego laboratorium ustalenie własnego zakresu wartości referencyjnych dla danej populacji.

OGRANICZENIA PROCEDURY

Zobacz znane interakcje w rozdziale MATERIAŁ BADANY. Składniki zestawu HbA1c Turbitest AA są zależne od danej serii, dlatego nie powinny być zamieniane z innymi.

Zaleca się pełną kalibrację (HbA1c i Hb), przy zmianie odczynnika lub na polecenie działu kontroli jakości.

Ta metoda jest przeznaczona do określenia HbA1c (mmol/mol) lub HbA1c (%), oddzielne wartości HbA1c i Hb nie powinny zostać przedstawiane.

Unikać zanieczyszczenia, utrzymać czystość odczynników. Używać zupełnie czystych i suchych mikropipet do analizy.

CHARAKTERYSTYKA TESTU

a) Nieprecyzyjność: określono zgodnie z protokołem EP5-A z CLSI. Trzy próbki z różnymi poziomami HbA1c zostały przetestowane w Konelab 60i. Uzyskano następujące wyniki:

Precyzja w trakcie badania

Hb

| Poziom | S.D. | C.V. |
|-----------|------------|-------|
| 15,1 g/dL | 0,093 g/dL | 0,6 % |
| 13,2 g/dL | 0,061 g/dL | 0,5 % |
| 17,7 g/dL | 0,152 g/dL | 0,9 % |

HbA1c

| | | |
|-----------|------------|-------|
| 0,58 g/dL | 0,006 g/dL | 1,1 % |
| 0,68 g/dL | 0,006 g/dL | 0,9 % |
| 1,23 g/dL | 0,016 g/dL | 1,3 % |

%HbA1c

| | | |
|-------|---------|-------|
| 5,7 % | 0,049 % | 0,9 % |
| 6,9 % | 0,054 % | 0,8 % |
| 8,5 % | 0,087 % | 1,0 % |

Precyzja całkowita

Hb

| Poziom | S.D. | C.V. |
|-----------|------------|-------|
| 15,1 g/dL | 0,132 g/dL | 0,9 % |
| 13,2 g/dL | 0,081 g/dL | 0,6 % |
| 17,7 g/dL | 0,203 g/dL | 1,2 % |

HbA1c

| | | |
|-----------|------------|-------|
| 0,58 g/dL | 0,013 g/dL | 2,2 % |
| 0,68 g/dL | 0,013 g/dL | 1,9 % |
| 1,23 g/dL | 0,036 g/dL | 2,9 % |

%HbA1c

| | | |
|-------|---------|-------|
| 5,7 % | 0,076 % | 1,3 % |
| 6,9 % | 0,092 % | 1,3 % |
| 8,5 % | 0,195 % | 2,3 % |

b) Zakres pomiaru HbA1c: uzyskane wartości HbA1c zawierają się pomiędzy 0,3 g/dL a stężeniem kalibratora HbA1c Calibrator (2,6 g/dL), co odpowiada, przy prawidłowym poziomie Hb (13 g/dL), przybliżonym wartościom zakresu dynamicznego od 23 do 200 mmol/mol HbA1c zgodnie z IFCC i od 4,3 do 20,5% zgodnie z DCCT/NGSP.

Jeżeli stężenie HbA1c wynosi poniżej 0,3 g/dL, pierwotna próbka musi być rozcieńczona 1+50 z Reactivo Hemolizante. Należy ponownie oznaczyć HbA1c i Hb, bez korekcji otrzymanych wyników.

Jeżeli stężenie HbA1c jest wyższe niż stężenie kalibratora HbA1c Calibrator, należy rozcieńczyć hemolizat 1+1 lub rozcieńczyć pierwotną próbkę 1 + 200 z Reactivo Hemolizante i ponownie oznaczyć HbA1c i Hb bez korekcji otrzymanych wyników.

c) Zakres pomiaru Hb: od 6 do 30 g/dL.

WIENER LAB DOSTARCZA

1 x 50 mL Odczynnik A₁
1 x 10 mL Odczynnik A₂
1 x 50 mL Odczynnik B
(Nr. kat. 1453861)

2 x 35 mL Odczynnik A₁
2 x 7 mL Odczynnik A₂
2 x 35 mL Odczynnik B
(Nr. kat. 1008126)

2 x 50 mL Odczynnik A₁
2 x 10 mL Odczynnik A₂
2 x 50 mL Odczynnik B
(Nr. kat. 1009270)

2 x 52 mL Odczynnik A₁
2 x 12 mL Odczynnik A₂
2 x 52 mL Odczynnik B
(Nr. kat. 1009385)

2 x 60 mL Odczynnik A₁
2 x 12 mL Odczynnik A₂
2 x 60 mL Odczynnik B
(Nr. kat. 1009651)

2 x 60 mL Odczynnik A₁
2 x 12 mL Odczynnik A₂
2 x 60 mL Odczynnik B
(Nr. kat. 1009960)

DOSTARCZANE OSOBNO:

Reactivo Hemolizante (Odczynnik hemolizujący):
1 x 500 ml (Nr. kat. 1999701)

ŹRÓDŁA

- Rahbar, S. - Clin. Chim. Acta 22: 296 (1968).
- Bunn, H. et al - Science 200: 21 (1978).
- Goldstein, D. et al - Diabetes Care 17 : 938 (1994).
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group - N. Engl. J. Med. 329: 977 (1993).
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group - Lancet 352: 837 (1998).
- Sacks, D. et al - Clin Chem 48: 436 (2002).
- Weykamp CW et al. - Clin. Chem. 41: 82 (1995).
- Sacks, D. - Clin Chem 49: 1245 (2003).
- Martina, W et al - Clin Chem 39 : 2259 (1993).
- Karl, J. et al - Klin. Lab 39:991 (1993).
- American Diabetes Association. Diabetes Care [Suppl] 24/1 (2001).
- John, G - Clin. Chem. Lab. Med. 41: 1199 (2003).
- Jeppsson, J. et al. - Clin. Chem. Lab. Med. 40: 78 (2002).
- Jarausch, J et al - Clin Chem. 42 :116 (Abstract 094) (1996).
- Junge, W et al. - Poster presentation 18th International Diabetes Federation Congress, Paris 2003.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Burtis, C.; Ashwood, E. (5th Edition) WB Saunders, 2001.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- Hanas, R. - Clin Chem Lab Med 48 (6) 775-776 (2010).

Oznaczenia

Następujące symbole są zastosowane na opakowaniach zestawów odczynników diagnostycznych.



Ten produkt spełnia wymagania Dyrektywy Europejskiej 98/79 EC dla wyrobów medycznych używanych do diagnozy "in vitro"



Autoryzowany przedstawiciel we Wspólnocie Europejskiej



Wyrób do diagnostyki "in vitro"



Zawartość wystarczająca dla <n> badań



Użyć przed



Ograniczenie dopuszczalnych temperatur



Nie zamrażać



Ryzyko biologiczne



Objętość po rozpuszczeniu



Zawartość



numer serii



Wytwórca



Substancja szkodliwa



Substancja żrąca



Substancja drażniąca



Przed użyciem zapoznać się z instrukcją



Kalibrator



Próba kontrolna



Próba kontrolna dodatnia



Próba kontrolna ujemna



Numer katalogowy

Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-85



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina