



## L<sup>L</sup>HbA1c

### Diagnostická reagentie pro kvantitativní *in vitro* stanovení hemoglobinu A1c v plné krvi fotometricky.

#### Katalogové číslo:

1 3329 99 10 935      45 ml (R1 2 x 15 ml + R2 1 x 10 ml + R3 1 x 5 ml)

#### Dále potřebujete:

Hemolyzační roztok:	1 4570 99 10 113	500 ml
HbA1c Kalibrační set (4 hladinový):	1 3320 99 10 043	4 x 0,25 ml
HbA1c Kontroly:      Level 1	5 9790 99 10 074	4 x 0,25 ml
Level 2	5 9800 99 10 074	4 x 0,25 ml

#### Shrnutí<sup>1,2</sup>:

Hemoglobin A1c (HbA1c) je glykovaný hemoglobin, který se tvoří ne-enzymatickou reakcí glukózy a nativního hemoglobinu. Tento proces probíhá kontinuálně po celou dobu života červených krvinek (průměrná doba života je 100 – 120 dnů). Poměr glykace je přímo úměrný koncentraci glukózy v krvi. Hladina krevního HbA1c udává průměrnou hladinu glukózy v krvi za předešlých 6 až 8 týdnů (díky kinetice přeměny erytrocytů je toto časové období více ovlivňováno hladinou glukózy v krvi než délkou uplynulého času). Z tohoto důvodu je HbA1c vhodný pro retrospektivní dlouhodobé monitorování koncentrace glukózy v krvi u osob s diabetes mellitus. Klinické studie ukazují, že snížení hladiny HbA1c může pomoci při předcházení nebo oddálení dopadu pozdních diabetických komplikací.

Množství HbA1c závisí také na celkovém množství hemoglobinu. Uváděná hodnota HbA1c je udávána jako procentní koncentrace celkového hemoglobinu.

Falešně nízké hodnoty (nízký HbA1c přestože je vysoká koncentrace glukózy v krvi) se mohou objevit u pacientů se zkrácenou dobou života červených krvinek (hemolytické onemocnění) nebo významnou nedávnou ztrátou krve (vysoký podíl „mladých“ erytrocytů). Falešně vysoké hodnoty (vysoký HbA1c přestože je normální koncentrace glukózy v krvi) jsou uváděny při anémii železa (vysoký podíl „starých“ erytrocytů). Tyto okolnosti by měly být brány do úvahy při interpretaci výsledků HbA1c.

#### Metoda:

Imunoturbidimetrické stanovení pomocí obohacených částic. HbA1c je stanovován přímo bez měření celkového hemoglobinu.

#### Princip:

Celkový Hb a HbA1c v hemolyzované krvi se vážou se stejnou afinitou na částice v R1. Navázané množství odpovídá relativní koncentraci obou složek v krvi.

Myší monoklonální protilátka proti lidskému HbA1c (R2) váže částice s navázaným HbA1c. Kozí polyklonální protilátka proti myšímu IgG (R3) reaguje s monoklonální myší protilátkou proti lidskému HbA1c za vzniku aglutinace. Měřená absorbance odpovídá navázanému HbA1c na částice, což je převedeno na procenta HbA1c ve vzorku.

#### Standardizace:

Stanovení je standardizováno v souladu se schválenou IFCC referenční metodou<sup>3</sup>. Kalibrace v souladu s DCCT/NGSP je také možná. Odpovídající hodnota kalibrátoru je uvedena v příbalovém letáku kalibračního setu HbA1c.

DCCT/NGSP a IFCC hodnoty vykazují vzájemný lineární poměr, a proto lze výsledky přepočítat:

$$\text{HbA1c (IFCC}^b) = (\text{HbA1c (NGSP}^a) - 2,15) / 0,0915$$
$$\text{HbA1c (NGSP}^a) = 0,0915 * \text{HbA1c (IFCC}^b) + 2,15$$

a: NGSP v %

b: IFCC v mmol/mol

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry<sup>3,4,9</sup>

DCCT: Diabetes Control and Complications Trial<sup>5</sup>

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program<sup>6</sup>

#### HbA1c a průměrná koncentrace glukózy<sup>10</sup>

Na základě lineární korelace mezi HbA1c a průměrnou koncentrací glukózy, lze hodnoty HbA1c přepočítat na průměrnou koncentraci glukózy podle následující rovnice:

Standardizace podle IFCC (vypočteno dle odkazu 10 v literatuře)

$$\text{Průměrná koncentrace glukózy (mg/dl)} = 2,63 \times \text{HbA1c}^b + 15,01$$

$$\text{Průměrná koncentrace glukózy (mmol/l)} = 0,146 \times \text{HbA1c}^b + 0,829$$

<sup>b</sup> HbA1c hodnota v mmol/mol IFCC

Standardizace podle NGSP:

$$\text{Průměrná koncentrace glukózy (mg/dl)} = 28,7 \times \text{HbA1c}^a - 46,7$$

$$\text{Průměrná koncentrace glukózy (mmol/l)} = 1,59 \times \text{HbA1c}^a - 2,59$$

<sup>a</sup> HbA1c hodnota v % NGSP

Nebyly pozorovány významné rozdíly u výsledků vypočítaných na základě těchto rovnic u různých typů pacientů, včetně pohlaví, přítomnosti nebo nepřítomnosti diabetu, různých typů diabetu, věku, rasy a národnostní příslušnosti. Přestože lze tuto použít pro většinu populace, každá laboratoř by si měla ověřit, jestli je tato rovnice aplikovatelná i na její skupinu pacientů.

#### Reagentie:

Diagnostické použití *in vitro*.

Reagentie skladované při 2–8°C jsou stabilní do konce měsíce deklarovaného na balení. Zabránit kontaminaci a vypařování. Chránit před světlem!

## Složení soupravy:

### - R1:

Pufr	20 mmol/l
Latex	0,14%

### - R2:

Pufr	10 mmol/l
Myší monoklonální protilátka proti lidskému HbA1c	55 mg/l

### - R3:

Pufr	10 mmol/l
Kozí polyklonální protilátka proti myššímu IgG	670 mg/l

Stabilizátory

## Příprava reagenčních roztoků:

Činidla jsou připravena k přímému použití.

Pokud analyzátor neumí pracovat se 3 reagensiemi, je nutné reagensii R2 a R3 smíchat před použitím. Přeneste 5 ml reagensie R3 s jedné lahvičky reagensie R2. Dobře promíchejte. Stabilita tohoto směsného činidla je 1 měsíc při 2–8°C

## Vzorek:

Plná krev (EDTA).

Nutno zabránit kontaminaci vzorku.

## Příprava vzorku:

Hemolyzační roztok: 1000 µl  
Vzorek/kalibrátor/kontrola 20 µl  
Smíchat a nechat stát 5 min. dokud nedojde k úplnému rozkladu.

## Stabilita vzorku<sup>7</sup>:

Plná krev	1 týden	při 2-8°C
Hemolyzátní	10 hodin	při 15-25°C
Hemolyzátní	10 dnů	při 2-8°C

## Pracovní postup:

*Aplikace pro automatické analyzátoři je dostupná na vyžádání*

Vlnová délka:	660 nm
Kyveta:	1 cm
Teplota:	37°C
Měření:	proti vzduchu

### 3-reagenční systém:

	Vzorek / µl	Standard / µl	Blank / µl
Vzorek	20	-	-
Dest. voda	-	-	20
Standard	-	20	-
R1	750	750	750

Promíchat a 2 minuty inkubovat (37 °C), potom přidat:

R2	250	250	250
----	-----	-----	-----

Promíchat a 3 minuty inkubovat (37 °C), potom přidat:

R3	125	125	125
----	-----	-----	-----

Promíchat, inkubovat (37 °C) a přesně po 2 minutách změřit absorbanci A vzorku (A<sub>s</sub>), standardu (A<sub>st</sub>) a blanku (A<sub>bl</sub>).

### 2-reagenční systém:

	Vzorek / µl	Standard / µl	Blank / µl
Vzorek	30	-	-
Dest. voda	-	-	30
Standard	-	30	-
R1	1000	1000	1000

Promíchat a 5 minut inkubovat (37 °C), potom přidat:

R2/3	500	500	500
------	-----	-----	-----

Promíchat, inkubovat (37 °C) a přesně po 5 minutách změřit absorbanci A vzorku (A<sub>s</sub>), standardu (A<sub>st</sub>) a blanku (A<sub>bl</sub>).

## Výpočet:

Koncentrace HbA1c v neznámém vzorku je odvozena z kalibrační křivky pomocí vhodného matematického modelu jako je spline. Kalibrační křivku sestrojte pomocí sady minimálně 4 kalibrátorů s různými hodnotami koncentrace a pro stanovení nulové hodnoty použijte 0,9% NaCl.

Stabilita kalibrace: 8 týdnů pro 3-reagenční systém  
6 dnů pro 2-reagenční systém

## Kalibrace:

Ke kalibraci je doporučen HbA1c Kalibrační set (kat. č. 1 3320 99 10 074). Přímá návaznost tohoto kalibrátoru je na IFCC referenční metodu.

## Řízení kvality:

Pro interní kontrolu kvality použijte kontrolní séra s deklarovanou hodnotou koncentrace HbA1c:

Level 1	4 x 0,25 ml	kat.č. 5 9790 99 10 074
Level 2	4 x 0,25 ml	kat.č. 5 9800 99 10 074

## Referenční hodnoty:

Referenční hodnoty by měly být nastaveny nebo ověřeny laboratoří na vhodném souboru pacientů ne-diabetiků.

Doporučené cílové hodnoty HbA1c<sup>8</sup>:

	%NGSP	mmol/mol IFCC
Ne-diabetici	4 - 6	20 - 42
Cíl terapie	< 7	< 53
Změna terapie	> 8	> 64

## Měřicí rozsah:

Stanovení bylo vyvinuto k měření koncentrací HbA1c v měřicím rozsahu od 15 do 150 mmol/mol podle IFCC (3-16% podle NGSP), nejméně však do hodnoty koncentrace nejvyššího kalibrátoru.

Stanovení lze použít pro vzorky s koncentrací hemoglobinu od 60 do 260 g/l.

## Funkční senzitivita/mez stanovitelnosti:

10 mmol/mol

## Analytická senzitivita/citlivost:

5 mmol/mol

## Analytická selektivita:

Díky používaným protilátkám je toto stanovení specifické pro lidský HbA1c. Stanovení není ovlivňováno kyselinou askorbovou do 3,4 mmol/l, konjugovaným a nekonjugovaným bilirubinem do 1026 µmol/l, lipémií do 22 mmol/l triacylglycerolů, RF do 250 IU/ml. Monoklonální myší protilátky nevykazují zkříženou reaktivitu s karbamylovaným Hb a acetylovaným Hb.

Nebyla pozorována interference způsobená urémií, nestabilními produkty (Schiffova báze). Alkoholismus a užití větší dávky aspirinu mohou vést k rozporným výsledkům.

Typy hemoglobinů, které vedou k nesprávným výsledkům: HbA2 v koncentraci až do 7% neinterferuje. HbF v koncentraci vyšší než 5% může vést k falešně nízkým hodnotám. U HbS až do 41%, až 21% možných falešně vysokých výsledků bylo

zaznamenáno. U HbC až do 40%, až 30% možných falešně vysokých výsledků bylo zaznamenáno. Vzorky s obsahem HbE až do 30%, vykazovaly až v 16% falešně vysoké výsledky<sup>1,7</sup>.

Pro více informací o interferujících látkách viz Young DS<sup>11</sup>.

### Přesnost: (Hitachi 917, 3-reagenční systém)

Přesnost v sérii: (n=20) (dle IFCC)

Vzorek	Průměr mmol/mol	SD mmol/mol	CV %
vzorek 1	35,0	0,48	1,37
vzorek 2	80,7	1,09	1,36
vzorek 3	114	2,04	1,80

Přesnost ze dne na den: (n=20)

Vzorek	Průměr mmol/mol	SD mmol/mol	CV %
vzorek 1	36,5	0,66	1,82
vzorek 2	83,3	1,39	1,67
vzorek 3	116	1,83	1,58

### Srovnání metod:

Srovnání stanovení mezi diagnostickou soupravou DiaSys oneHbA1c (y) a komerčně dostupnou imunoturbidimetrickou soupravou (x) bylo provedeno na 109 vzorcích (dle NGSP). Rovnice regresní přímky má tvar:  $y = 1,083 x - 0,560$  %;  $r = 0,987$ .

Srovnání stanovení mezi diagnostickou soupravou DiaSys oneHbA1c (y) a HPLC stanovením (x) bylo provedeno na 109 vzorcích (dle NGSP). Rovnice regresní přímky má tvar:  $y = 0,968 x + 0,199$  %;  $r = 0,995$ .

### Upozornění:

1. Kalibrátory nejsou součástí setu. Je možné je na přání objednat. Kalibrátory jsou připraveny k přímému použití a jsou založeny na lidské matrici. Jsou kapalné a stabilizované a koncentrace jednotlivých hladin HbA1c je označena na štítku lahvičky. Skladování: otevřených i uzavřených při 2–8°C.
2. Kontroly nejsou součástí setu. Na přání je možné je objednat. Kontroly jsou kapalné, připravené k přímému použití, založené na lidské matrici. Koncentrace HbA1c je uvedena v příbalovém letáku.
3. Kalibrátory a kontroly byly připraveny z lidského séra od dárců, kteří byli testováni na ne-přítomnost HIV protilátek, HBsAg a HCV pomocí FDA schválených testů, ovšem riziko infekce nemůže být úplně vyloučeno. S kalibrátory a kontrolami by tedy mělo být zacházeno opatrně, jako se vzorky pacientů.
4. Při práci s touto reagenční dodržujte nutná bezpečnostní opatření.
5. Likvidujte v souladu s platnými předpisy.
6. Reagencie obsahují S25: zabraňte kontaktu s očima.
7. Ve vzácných případech, vzorky pacientů s gamapathií mohou dávat falešné výsledky.
8. Prosím, prostudujte bezpečnostní list pro přijetí nezbytných preventivních opatření při používání těchto reagenčních. Určeno pro diagnostické účely, výsledky by měly být vždy hodnoceny s ohledem na zdravotní historii pacienta, klinické zkoušky a další závěry.
9. Ihned po změření HbA1c je nutné vyčistit kyvety. Použijte alkalický mycí roztok na kyvety, který je doporučen výrobcem analyzátoru.

### Literatura:

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p.142-48.
2. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999, p. 790-6.
3. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 78-89.
4. Hoelzel W, Weykamp C et al. IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in Human Blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method-Comparison Study. Clin Chem 2004; 50:1:166-74.
5. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes in the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1993; 329: 977-86.
6. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer Hm, Myers GL et al. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A Five-Years Progress Report. Clin Chem 2001; 47: 1985-92.
7. Data on file at DiaSys Diagnostic Systems GmbH.
8. Pantheghini M, John WG on behalf of the IFCC Scientific Division. Implementation of haemoglobin A1c results traceable to the IFCC reference system: the way forward. Clin Chem Lab Med 2007; 45(8): 942-4.
9. Nordin G, Dybkaer R Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c". Clin Chem Lab Med 2007; 45(8): 1081-2.
10. Sacks DB. Translating Hemoglobin A1c into Average Blood Glucose: Implications for Clinical Chemistry. Clinical Chemistry 2008; 54: 1756-8.
11. Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 5th ed. Volume 1 and 2. Washington, DC: The American Association for Clinical Chemistry Press 2000.

### Vyrobeno:

BioVendor – Laboratorní medicína, a. s.  
Karásek 1767/1, 621 00 Brno, Česká republika