

HbA_{1c} MonlabTest®

Turbidimetría Látex.



IVD

Determinación cuantitativa de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) en sangre humanaPara uso profesional de diagnóstico *in vitro*. 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 políclonal IgG de cabra anti-ratón interacciona 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 hematies, 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 período prolongado. En un estudio clásico, Trivelli et al.¹ 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, 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	Látex 0,13%, Tampón, estabilizante.
R2	Anticuerpo monoclonal anti-HbA _{1c} (ratón) 0,05 mg/mL, anticuerpo políclonal IgG de cabra anti-ratón 0,08 mg/dL, tampón, estabilizantes.
R3 (Reactivos hemolizante)	Agua y estabilizantes
Opcional	Calibrador HbA _{1c} (4 niveles) MonlabTest – (MO-165061) Control HbA _{1c} (2 niveles) MonlabTest – (MO-165062)

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.).

PREPARACIÓN

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

CALIBRACIÓN

HbA_{1c} es trazable a patrones de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

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

No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

R1 y R2 una vez abiertos son estables durante al menos 1 mes si se conservan a 2-8°C.

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

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatizable a 37°C para lecturas a 660nm.
- Equipamiento habitual de laboratorio^(Nota 1).

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 asepticas. HbA_{1c} en sangre total recogida con EDTA es estable durante 1 semana a 2-8°C.⁵

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.

PROCEDIMIENTO

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

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

4. Mezclar e incubar 5 minutos.



5. Pipetear en la misma cubeta:

R2 (µL)

120

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

CÁLCULOS**Concentración HbA_{1c} (%)**

Representar la absorbancia (A) obtenida frente a las concentraciones de HbA_{1c} de cada Calibrador (del 1 al 4). El porcentaje de HbA_{1c} en la muestra se calcula por interpolación de su absorbancia (A) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. MONLAB dispone de sueros Control HbA_{1c} MonlabTest (MO-165062). **Los Controles, una vez reconstituidos, precisan de un tratamiento hemolizante antes de su uso.**

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

VALORES DE REFERENCIA¹¹

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 caso 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.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

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

Precisión:

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

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

Exactitud: Los reactivos MonlabTest (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 carbamilada hasta 7,5 mmol/L y Hb acetilada hasta 5,0 mmol/L no interfieren en el ensayo.
2. Los resultados pueden ser inconsistentes en pacientes con las siguientes condiciones: adicción de opioáceos, envenenamiento por plomo, alcoholismo, grandes ingestas de aspirina.^{6, 7, 8, 9}
3. Se ha demostrado que valores elevados de HbF pueden conducir a una infravaloración de HbA_{1c}, y que la uremia no interfiere con la determinación de HbA_{1c} por inmunoensayo.¹⁰ También se ha demostrado que intermedios lábiles (base Schiff) no son detectados y no interfieren con la determinación de HbA_{1c} por inmunoensayo.⁵
4. Se ha determinado que las variantes de Hemoglobina HbA₂, HbC y HbS no interfieren con este método.
5. No se han evaluado otras variantes raras de hemoglobina (ej. HbE).

NOTAS

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

BIBLIOGRAFÍA

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

MO-165035	R1: 1 x 30 mL
	R2: 1 x 10 mL
	R3: 1 x 125 mL

SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD

	Fabricante
	No reutilizar
	Contiene suficiente para <n> test
	Código
	Número de lote
	Límite de temperatura
	Fecha de caducidad

HbA_{1c} MonlabTest®

Latex Turbidimetry

Quantitative determination of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) in human blood.
Only for professional *in vitro* diagnostic use. Store at 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 antihuman 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" hemoglobin's (Hb_A, H_{A1}, H_{A2}, H_{A3}) that elutes 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 0.05 mg/mL, goat anti-mouse IgG polyclonal antibody 0.08 mg/dL, Buffer, stabilizers.
R3 (Hemolysis reagent)	Water and stabilizers
Optional	HbA _{1c} Calibrator (4 levels) MonlabTest – (MO-165061) HbA _{1c} Control (2 levels) MonlabTest – (MO-165062)

PRECAUTIONS

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

PREPARATION

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

CALIBRATION

The HbA_{1c} is traceable to reference standards of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).

STORAGE AND STABILITY

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

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

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

ADDITIONAL EQUIPMENT

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

SAMPLES

Special preparation of the patient is unnecessary. Fasting specimens are not required. No special additives or preservatives other than anticoagulants are required. Collect venous blood with EDTA using aseptic technique. HbA_{1c} in whole blood collected with EDTA is stable for one week at 2-8°C.⁵

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 lysis reagent tube. Mix.
3. Allow to stand for 5 minutes or until complete lysis is evident. Hemolysates may be stored up to 10 days at 2-8°C

PROCEDURE

1. Assay conditions:

Wavelength: 660 nm (600-660)

Temperature: 37°C

Cuvette light path: 1 cm

2. Adjust the instrument to zero with distilled water.

3. Pipette into a cuvette (Note 2):

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

4. Mix and incubate 5 minutes.

5. Pipette into the cuvette:

R2 (µL)	120
---------	-----

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

CALCULATIONS**HbA_{1c} concentration (%)**

Plot (A) obtained against the HbA_{1c} concentration of each calibrator (1 to 4 Level). HbA_{1c} percentage in the sample is calculated by interpolation of its absorbance (A) in the calibration curve.

QUALITY CONTROL

HbA_{1c} Control MonlabTest (MO-165062) is recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. **Controls require hemolysis pretreatment after being reconstituted.**

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

REFERENCE VALUES¹¹

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.

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

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

Sensitivity: 1% = 0,056 (A)

Accuracy: Results obtained using MonlabTest reagents (y) show no significant systematic differences when compared to other commercial reagents (x).

The results obtained using 40 samples were the following:

Correlation coefficient (*r*): 0,995

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

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

INTERFERENCES AND LIMITATIONS

1. Bilirubin to 50 mg/dL, ascorbic acid to 50 mg/dL, triglycerides to 2000 mg/dL, carbamylated Hb to 7.5 mmol/L and acetylated Hb to 5.0 mmol/L do not interfere in this assay.
2. It has been reported that results may be inconsistent in patients who have the following conditions: opiate addiction, lead-poisoning, alcoholism, ingest large doses of aspirin.^{6, 7, 8, 9}
3. It has been reported that elevated levels of HbF may lead to underestimation of HbA_{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
4. It has been determined that Hemoglobin variants HbA₂, HbC and HbS do not interfere with this method.
5. Other very rare variants of hemoglobin (e.g. HbE) have not been assessed.

NOTES

1. In order to avoid contamination, it is recommended to use disposable material.
2. Use clean disposable pipette for its dispensation.

3. MONLAB has instruction sheets for several automatic analyzers.**BIBLIOGRAPHY**

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284,353 (1971).
2. Gonen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
3. Gabbay, K.H., Hasty, K., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F., and Gallop, P.M., J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 859 (1977).
4. Bates, H.M., Lab. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
5. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
6. 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

MO-165035

R1: 1 x 30 mL

R2: 1 x 10 mL

R3: 1 x 125 mL

SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS

Manufacturer



For *in vitro* diagnostic use only
Consult instructions for use



Contains sufficient for <n> tests



Catalogue Code



Lot Number



Keep dry



Temperature limitation



Use by

