

BioLyzer® Order information:

Catalog No.	BioLyzer	Contents
B11081	200 / 600	R1 1 x 60 ml
		R2 1 x 30 ml
		R3a 1 x 15 ml
		R3b 1 x 15 ml
B11083	300 / 600*	R1 1 x 60 ml
		R2 1 x 30 ml
		R3a 1 x 15 ml
		R3b 1 x 15 ml

*only for instruments with a reagent tray for 20 / 70ml bottles

Intended use:

Immunological assay for the in vitro quantitative determination of hemoglobin A1c in whole blood on automated clinical chemistry analyzers.

Summary:

Hemoglobin (Hb) consists of four protein chains with four heme portions, and is the red-pigmented protein located in the erythrocytes. Its main function is the transport of oxygen and carbon dioxide in blood. Each Hb molecule is able to bind four oxygen molecules. Hb consists of a variety of subfractions and derivatives. Among this heterogeneous group of hemoglobins HbA1c is one of the glycosylated hemoglobins, a subfraction formed by the attachment of various sugars to the Hb molecule. HbA1c is formed in two steps by the nonenzymatic reaction of glucose with the N-terminal amino group of the β -chain of normal adult Hb (HbA). The first step is reversible and yields labile HbA1c. This slowly rearranges in the second reaction step to yield stable HbA1c.

In the erythrocytes, the relative amount of HbA converted to stable HbA1c increases with the average concentration of glucose in the blood. Due to the erythrocyte's life span of approximately 100 to 120 days, HbA1c reflects the average blood glucose level during the preceding 2 to 3 months. HbA1c is thus suitable to monitor long-term blood glucose control in individuals with diabetes mellitus. More recent glucose levels have a greater influence on the HbA1c level.

The approximate relationship between HbA1c and mean blood glucose value during the preceding 2 to 3 months has been analyzed by several studies. A recent study obtained the following correlation:

DCCT / NGSP Standardization

Mean plasma glucose [mmol/l] = $1.98 \times \text{HbA1c} (\%) - 4.29$ or

Mean plasma glucose [mg/dl] = $35.6 \times \text{HbA1c} (\%) - 77.3$

IFCC Standardization (not applicable für US customers, recalculated acc. to Ref. 8)

Mean plasma glucose [mmol/l] = $1.73 \times \text{HbA1c} (\%) + 0.20$ or

Mean plasma glucose [mg/dl] = $31.2 \times \text{HbA1c} (\%) + 3.51$

The risk of diabetic complications, such as diabetic nephropathy and retinopathy increases with poor metabolic control. In accordance with its function as an indicator for the mean blood glucose level, HbA1c predicts the risk for the development of diabetic complications in diabetes patients.

For routine clinical use, testing every 3 to 4 months is generally sufficient. In certain clinical situations, such as pregnancy diabetes, or after a major change in therapy, it may be useful to measure HbA1c in 2 to 4 week intervals.

Test principle:

Immunoturbidimetric test according DCCT/NGSP protocol.

Both the concentration of HbA1c and the concentration of total hemoglobin are measured. The reported HbA1c result is calculated as a % of the total hemoglobin concentration.

The HbA1c and total hemoglobin values generated in this assay are intended for use in the calculation of the HbA1c/total hemoglobin ratio (%HbA1c) and must not be used individually for diagnostic purposes.

(a) Sample Pre-treatment

The first step of the procedure involves the pre-treatment of the whole blood sample. This lyses red blood cells and causes hydrolysis of the hemoglobin by the action of a protease enzyme in the Hemoglobin Denaturant Reagent.

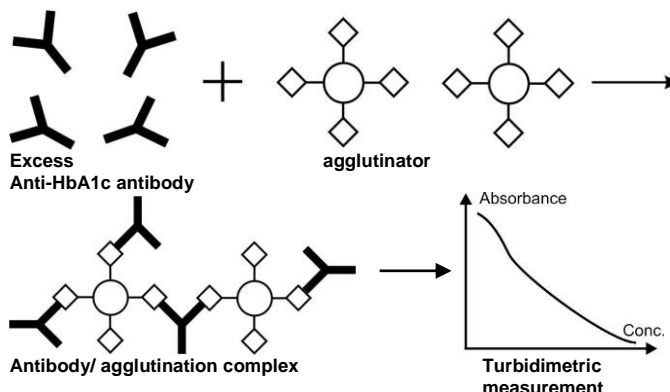
(b) Determination of Total Hemoglobin

The Total Hemoglobin reagent is used to determine the concentration of total hemoglobin. The method involves the conversion of the total heme into haematin in an alkaline solution of a non-ionic detergent as described by Wolf *et al* (1984). The reaction is initiated by the addition of the pre-treated sample to the total hemoglobin reagent, resulting in a green solution. The conversion of heme from all different hemoglobin types into alkaline haematin with one defined absorption spectrum allows the endpoint measurement of total hemoglobin at 600 nm.

(c) Determination of HbA1c

The determination of HbA1c is based on a latex agglutination inhibition assay. The agglutinator, which consists of a synthetic polymer containing multiple copies of the immunoreactive part of HbA1c, causes agglutination of latex coated with HbA1c specific mouse monoclonal antibodies. In the absence of HbA1c in the sample, the agglutinator in the HbA1c R3b Reagent and the antibody-coated micro particles in the HbA1c R3a Reagent will agglutinate, resulting in an increase in absorbance. The presence of HbA1c in the sample will slow the rate of agglutination as it competes with the HbA1c agglutinator for antibody binding sites on the latex. Hence, the increase in absorbance is inversely proportional to the concentration of HbA1c in the sample.

An increase in absorbance due to agglutination is measured at 700 nm and the extent of agglutination is used to calculate the concentration of HbA1c from a Calibration Curve. The percentage HbA1c is then calculated using the g/dl HbA1c and Total Hemoglobin values.



Working solution concentration:

R1: Hemoglobin Denaturant

Porcine Pepsin
Buffer pH 2.4
Preservative

R2: Total Hemoglobin Reagent

Sodium Hydroxide, pH 13 0.4% w/v
Triton 2.5% w/v
Octylphenoxypolyethoxyethanol 2.5% w/v

R3a: HbA1c Antibody Reagent

HbA1c Antibody (mouse) coupled particles <0.1% w/v
Bovine Serum Albumin
Buffer pH 8.1
Non ionic Surfactant 0.6% w/v
Proclin 150 0.1% w/v

R3b: HbA1c Agglutinator Reagent

HbA1c hapten covalently attached to the polymer
Bovine Serum Albumin
Buffer pH 2.0
Proclin 150 0.1% w/v
Non ionic Surfactant 0.2% w/v

Precautions and warnings:

For in vitro diagnostic use. The material safety data sheet contains further safety-related information. It is available for download from our homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com>.

Exercise the normal precautions required für handling all laboratory reagents. Total Hb Reagent and Calibrator set Level 1 contain sodium hydroxide which is caustic. Hemoglobin Denaturant contains acidic buffer which is caustic too. In the event of accidental contact, flush affected area with large quantities of water and seek immediate medical attention.

The reagents must be used only for the purpose intended by suitably qualified laboratory personnel, under appropriate laboratory conditions.

Storage and stability:

All reagents are ready for use. All reagents are stable as supplied to expiry date when stores at +2° to +8°C, stored protected from extreme heat, light, or freezing. Reagents should be mixed thoroughly and equilibrated to system temperature for approximately ½ hour prior to use on the system.

Onboard Stability: The reagents are stable for 30 days.

Specimen collection and preparation:

Capillary blood, Potassium-EDTA and Ammonium Heparin whole blood
Stability: at +15 to +25°C 3 days
at + 2 to + 8°C 5 days
at - 20°C 6 months (do not refreeze)

Sample preparation:

Capillary blood
Puncture capillary blood and put filled capillary tube into a reagent tube with 400 μ l of R1 hemoglobin denaturant reagent (1:41 dilution. 10 μ l capillary tube into 400 μ l of hemoglobin denaturant reagent). Close reagent tube and mix gently and thoroughly with vibration swirl.

Incubate for 5-15 minutes at room temperature prior to testing.

Stability of sample: at + 2 to + 8°C 48 hours
at +15 to + 25°C 8 hours

Testing procedure:

Materials provided

- Working solutions as described above

Additional materials required

- Calibrators and controls as indicated below
- 0.9% NaCl

Calculation:

The calculation of the hemoglobin A1c concentration is generated using the following equation:

$$\% \text{HbA1c} = \frac{\text{HbA1c [g/dl]}}{\text{Hb [g/dl]}} \times 100$$

Note: This test is designed for DCCT/NGSP standardisation. In order to convert the results into IFCC units according to the directive of German Medical Association 2008 use the following equation:

$$\text{HbA1c IFCC [mmol/mol]} = 10.93 \times (\% \text{HbA1c NGSP} - 2.15)$$

Limitations – interference:

The assay gives accurate and precise results for a range of total hemoglobin varying between 7g/dl and 23g/dl. Patients with severe anaemias (total hemoglobin < 7g/dl) and those with polycythemia vera (total hemoglobin > 23g/dl) should not be assayed by this method.

Any case of shortened red cell survival such as haemolytic anaemia or other haemolytic disease, pregnancy, recent significant blood loss etc. will result in a decrease in % glycated hemoglobin.

Samples containing hemoglobin variants S and C may result in up to a 40% increase of the expected HbA1c value. Also, those containing variant F (>10%) may yield a lower value than expected. Hence, samples containing variants S, C and F (>10%) should not be compared to published normal or abnormal values. A sample containing variant E was shown not to interfere.

Criterion: Recovery within ± 10% of initial value.

Icterus: No significant interference up to 100 mg/dl bilirubin (conjugated and unconjugated bilirubin).

Lipemia (Intralipid): No significant interference up to a triglyceride concentration of 55 mg/dl. There is poor correlation between turbidity and triglycerides concentration. Rheumatoid factor 2000 IU/ml, Acetylsalicylic acid < 60 mg/dl,

Sodium cyanate 50 mg/dl and Urea 500 mg/dl (83 mmol/l) do not interfere.

The labile fraction of glycated hemoglobin (Schiff base) does not interfere as the antibody is specific for the stable ketamine.

The effect of drugs or their metabolic products on the test is not known in all cases. In case of doubt it is recommended to repeat the test after the medication has been discontinued. However, the medication may only be discontinued according to instructions of the attending physician.

Analytical range:

The analytical range for total hemoglobin is 2 g/dl to 25 g/dl.

The analytical range for HbA1c is 0.7 g/dl to 2.5 g/dl.

The analytical range for % HbA1c is the concentration that corresponds to the level 6 HbA1c calibrator (2.06 g/dl HbA1c, 14.7% HbA1c at a total Hemoglobin of 14g/dl). Samples with values above 14.7% HbA1c should not be diluted and results should be reported as >14.7% HbA1c.

Sensitivity:

The assay is sensitive to a level of 0.29 g/dl HbA1c, 1.3 g/dl total hemoglobin. The % HbA1c sensitivity was found to be 2.57%. This corresponds to 0.3 g/dl HbA1c and 11.67 g/dl total hemoglobin.

Expected values:

Depending upon the assay used, HbA1c is approximately

4 – 6% (DCCT/NGSP) or 20 – 42 mmol/mol (IFCC) in nondiabetics

6 – 8% (DCCT/NGSP) or 42 – 64 mmol/mol (IFCC) in controlled diabetics

As much as 20% (DCCT/NGSP) or 195 mmol/mol (IFCC) in uncontrolled diabetics.

It is recommended that each laboratory establish its own reference range to reflect the age, sex, diet and geographical location of the population.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference range. For diagnostic purposes, hemoglobin A1c results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examinations and other findings.

Imprecision:

Reproducibility was determined using controls and pooled whole blood in an internal protocol. The following results were obtained.

%HbA1c	Within run			Run to run		
	Mean	SD	CV	Mean	SD	CV
Sample	%	%	%	%	%	%
Level 1	5.21	0.059	1.1	4.99	0.265	5.3
Level 2	11.86	0.109	0.9	11.61	0.403	3.5

Method comparison:

A comparison of the Analyticon HbA1c (y) with another commercially available assay (x) gave the following result:

$$y = 0.948x - 0.3427; \quad r = 0.9689$$

Calibration:

Calibration Type: Logit-Log

Standardization:

HbA1c

S1: 0.9% NaCl

S2-6: Bio Cal[®] HbA1c Calibration set- Level 2 – Level 6 #14081

Total Hemoglobin

S1: 0.9% NaCl

S2: Bio Cal[®] HbA1c Calibration set – Level 1 only #14081

A multipoint calibration is recommended for HbA1c every 30 days, with change of reagent lot/bottle or as indicated by quality control procedures.

Note: Calibrators DO NOT REQUIRE PRETREATMENT.

The calibrators are referenced to an HPLC method for HbA1c and the Drabkin's method for total Hb.

Quality control:

HbA1c Control Set 2 x 0.25 ml #1508

Note: Controls REQUIRE PRETREATMENT (see sample preparation).

The control intervals and limits must be adapted to the individual laboratory and country-specific requirements. Values obtained should fall within established limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the limits.

Disposal:

Please note the legal regulations.

References:

1. Cohen P.M. Perspective: measurement of Circulating Glycated Protein to Monitor Intermediate – Term Changes in Glycaemic Control Eur J Clin Chem. Clin. Biochem. 1992;30 (12): 851 – 859
2. The Diabetes Control of complications Trial Research on the Development and Progression of Long – Term Complicity of insulin – Dependant Diabetes Mellitus. The New England Journal of Medicine 1993;329 (14):977 – 986.
3. Mayer T.K. and Freedman Z.R.: Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility. Clin. Chem. Acta 127: 147 – 184 (1983)
4. Baynes J.W., Bunn H.F., Goldstein D.E. *et al*: National Diabetes Group: Report of the expert committee on glucosylated hemoglobin. Diabetes Care 7: 602-606 (1984).
5. Koenig R.J., Petersen C.M., Kilo C *et al*: Hemoglobin A1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. Diabetes 25: 230 – 232 (1976).
6. Nathan D.M., Singer D.E., Hurxthal K. and Goodson J.D.: The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. NE J Med 310: 341-346 (1984).
7. M^cCarren M: DCCT and its works: Intensive therapy reduces the risk of diabetic eye, kidney, and nerve disease. Diabetes Forecast 49 – 51 (September 1993).
8. Larsen M.L., Horder M, and Mogensen E.F.: Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. NE J Med. 323: 1021 – 1025 (1990).
9. Nathan D.M.: Hemoglobin A1c – Infatuation or the real thing? NE J Med. 323: 1062 – 1063 (1990).
10. Wolf HU, Lang W., and Zander R/: Alkaline haematin D-575, a new tool for the determination of hemoglobin as an alternative to the Cyanhemoglobin method. Clin. Chem. Acta 136: 83 – 104 (1984).
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture – third edition: approved standard. NCCLS Publication H4 – A3 Villanova, PA: NCCLS 1991.
12. Goldstein D.E., Little R.R., Wiedmeyer H.M., *et al*. Glycated Hemoglobin: Methodologies and clinical applications. Clin. Chem. 32: B64 – B70 (1986).
13. Ellis G., Diamonds E.P., Giesbrecht E.E., *et al*: An automated “high-pressure” liquid chromatographic assay for hemoglobin A1c. Clin. Chem 30: 1746-1752 (1984).
14. Burtis C.A. and Ashwood E.R. (eds.) : Tietz textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. W.B. Sanders Company, Philadelphia, PA, p.2021 (1994)
15. Knowles W.J., Haigh W.B., and Michaud G.C. : A monoclonal antibody-based immunoassay for hemoglobin A1c Diabetes 35 Supplement 94A (1986).

Text passages with grey background were changed in the latest revision of this package insert.

BioLyzer® Bestellinformation:

Katalog-Nr.	BioLyzer	Inhalt
B11081	200 / 600	R1 1 x 60 ml
		R2 1 x 30 ml
		R3a 1 x 15 ml
		R3b 1 x 15 ml
B11083	300 / 600*	R1 1 x 60 ml
		R2 1 x 30 ml
		R3a 1 x 15 ml
		R3b 1 x 15 ml

*nur für Instrumente mit Reagenzteller für 20 / 70ml Flaschen

Anwendungszweck:

Immunologischer Test zur quantitativen in vitro Bestimmung von Hämoglobin A1c im Vollblut mit klinisch-chemischen Analysenautomaten für die Glykämiezeitkontrolle.

Zusammenfassung:

Hämoglobin (Hb) besteht aus vier Proteinketten mit vier Hämanteilen und ist das rot pigmentierte Protein in den Erythrozyten. Seine Hauptfunktion liegt im Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid im Blut. Jedes B-Molekül kann vier Sauerstoffmoleküle binden. Hb besteht aus einer Vielzahl von Unterfraktionen und Derivaten. Innerhalb dieser heterogenen Gruppe von Hämoglobinen ist HbA1c eines der glycosylierten Hämoglobine, eine Unterfraktion, die durch Anlagerung verschiedener Zucker an das Hämoglobinmolekül gebildet wird. Die Bildung von HbA1c ist ein zweistufiger Prozess, bei dem eine nichtenzymatische Reaktion zwischen Glukose und der N-terminalen Aminogruppe der β -Kette von normalem, adultem Hb (HbA) stattfindet. Der erste Schritt ist reversibel und ergibt instabiles HbA1c. Dieses wird in einem zweiten Schritt langsam in das stabile HbA1c überführt. In den Erythrozyten nimmt der relative HbA-Anteil, der in stabiles HbA1c umgewandelt wird, mit der durchschnittlichen Glukosekonzentration im Blut zu. Die Umwandlung in stabiles HbA1c wird durch die Lebensdauer der Erythrozyten von etwa 100 bis 120 Tagen eingeschränkt. Daher spiegelt HbA1c den durchschnittlichen Blutzuckerspiegel der letzten 2 bis 3 Monate wider. HbA1c ist somit zur langfristigen Blutzuckerspiegelüberwachung bei Diabetes mellitus geeignet. Jüngere Glukosespiegel haben einen größeren Einfluss auf die HbA1c-Konzentration. Die enge Beziehung zwischen HbA1c und dem mittleren Blutzuckerspiegel während der letzten 2 bis 3 Monate wurde in mehreren Studien untersucht. In einer kürzlich durchgeführten Studie ergab sich folgende Korrelation:

DCCT / NGSP Standardisierung

Mittlere Plasmaglukose [mmol/l] = $1,98 \cdot \text{HbA1c} (\%) - 4,29$ oder

Mittlere Plasmaglukose [mg/dl] = $35,6 \cdot \text{HbA1c} (\%) - 77,3$

IFCC Standardisierung (nicht für USA, berechnet gem. Literaturangabe Nr. 8)

Mittlere Plasmaglukose [mmol/l] = $1,73 \cdot \text{HbA1c} (\%) + 0,20$ oder

Mittlere Plasmaglukose [mg/dl] = $31,2 \cdot \text{HbA1c} (\%) + 3,51$

Das Risiko diabetischer Komplikationen, wie einer diabetischen Nephropathie und Retinopathie, nimmt bei schlechter Stoffwechseleinstellung zu. Gemäß seiner Funktion als Indikator des mittleren Blutzuckerspiegels ermöglicht HbA1c Aussagen über die Entwicklung diabetischer Komplikationen bei Diabetikern. Für die klinische Routine ist ein Test alle 3 bis 4 Monate in der Regel ausreichend. Unter bestimmten klinischen Umständen, wie bei Schwangerschaftsdiabetes oder einer grundlegenden Therapieumstellung, kann eine Messung von HbA1c in Abständen von 2 bis 4 Wochen sinnvoll sein.

Testprinzip:

Immunoturbidimetrischer Test nach DCCT/NGSP Protokoll.

Die Konzentrationen des Gesamthämoglobins und der HbA1c-Fraktion werden bestimmt und aus den Ergebnissen dieser Bestimmungen wird der prozentuale Anteil von HbA1c am Gesamthämoglobin errechnet.

(a) Probenvorbereitung

Im ersten Arbeitsschritt wird Vollblut in das Denaturierungsreagenz R1 gegeben.

Dieses führt zur Lyse von zellulären Bestandteilen und der Denaturierung von Hämoglobin, das durch Proteasen abgebaut wird.

(b) Bestimmung des Gesamthämoglobins

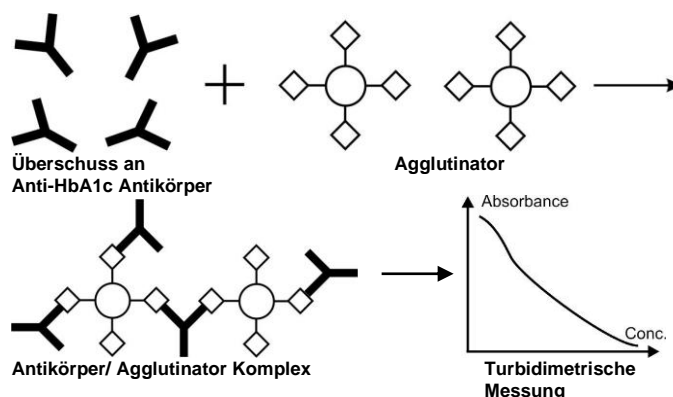
Freigesetztes Hämoglobin aus der hämolysierten Probe wird mit dem Gesamthämoglobinreagenz R2 bestimmt. Die Reaktion wird durch die Zugabe der vorbehandelten Probe zum Hb-Reagenz (R2) gestartet und ergibt einen grünen Farbumschlag. Dabei wird die gesamte Häm-Menge in ein alkalisches Hämatin-Derivat mit charakteristischem Spektrum überführt, wie bei Wolf et al. beschrieben. Dies ermöglicht die anschließende Endpunktbestimmung des Gesamthämoglobins bei 600nm.

(c) Hämoglobin A1c

Die HbA1c-Bestimmung beruht auf dem turbidimetrischen immunologischen Inhibitionsassay für hämolysiertes Vollblut.

Das Agglutinationsreagenz besteht aus synthetischen Polymeren mit gebundenen immunoreaktiven HbA1c-Strukturen. Diese bilden mit den auf den Latexpartikeln gebundenen monoklonalen Maus-HbA1c-Antikörpern einen Agglutinationskomplex. In Abwesenheit von HbA1c in der Probe wird ein unlöslicher Antikörper-Agglutinator-Komplex gebildet, der turbidimetrisch gemessen wird (hohe Absorption).

Durch vorhandenes HbA1c in der Probe wird die Agglutination verhindert, da das HbA1c mit dem Anti-HbA1c-Antikörper einen löslichen Antigen-Antikörper-Komplex bildet und mit dem Agglutinator konkurriert. Dadurch ist die Absorptionsabnahme proportional zur HbA1c-Konzentration in der Probe und wird bei 700nm gemessen.



Konzentrationen der gebrauchsfertigen Lösungen:

R1: Hämoglobin Denaturierungsreagenz

Pepsin
Puffer pH 2,4
Konservierungsmittel

R2: Gesamthämoglobinreagenz

Natriumhydroxid, pH 13 0,4% w/v
Triton 2,5% w/v
Octylphenoxypolyethoxyethanol 2,5% w/v

R3a: HbA1c Antikörperreagenz

Latexgekoppelte HbA1c Antikörper (Maus) <0,1% w/v
Rinder Serum Albumin
Puffer pH 8,1
Nichtionische Tenside 0,6% w/v
Proclin 150 0,1% w/v

R3b: HbA1c Agglutinator Reagenz

HbA1c Haptene kovalent an Polymere gebunden
Rinder Serum Albumin
Puffer pH 2,0
Proclin 150 0,1% w/v
Nichtionische Tenside 0,2% w/v

Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

In vitro Diagnostikum.

Weitere sicherheitsrelevante Informationen sind im Sicherheitsdatenblatt enthalten. Dieses steht auf unserer Homepage <http://www.analyticon-diagnostics.com> zum Download bereit.

Die beim Umgang mit Laborreagenzien üblichen Vorsichtsmaßnahmen beachten.

Für die Herstellung dieses Produkts wird nur Blut von einzeln getesteten Spendern verwendet, bei denen mit den von der FDA zugelassenen Tests kein HBSAg und keine Antikörper gegen HIV 1, HIV 2 und HCV nachzuweisen sind. Da trotzdem eine Infektionsgefahr nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, muss das Produkt mit der gleichen Sorgfalt behandelt werden wie eine Patientenprobe. Im Falle einer Exposition ist entsprechend den Anweisungen der zuständigen Gesundheitsbehörden vorzugehen.

Handhabung, Lagerung und Haltbarkeit:

Alle Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Ungeöffnete Packungsbestandteile sind bei 2-8°C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.

Die Reagenzien sollen vor Gebrauch gründlich gemischt werden und zur Equilibrierung eine halbe Stunde vor Benutzung auf das Gerät gebracht werden.

Onboard Stabilität: R2, R3a und R3b sind ca. 30 Tage haltbar.

Probenentnahme und Vorbereitung:

Kapillarblut, EDTA- oder Heparin-Blut Haltbarkeit:

bei +15 bis +25°C 3 Tage
bei +2 bis +8°C 5 Tage
bei -20°C 6 Monate (Nur einmal einfrieren)

Probenvorbereitung:

Kapillarblut

Blut mit einem Einmalkapillarröhrchen entnehmen und das gefüllte Röhrchen in ein Reagenzglas mit der 40-fachen Menge an R1 Denaturierungsreagenz geben (z.B. 10 μ l Kapillarröhrchen in 400 μ l Denaturierungsreagenz).

Reagenzglas verschließen und durch kräftiges Schütteln das Blut aus dem Kapillarröhrchen spülen. Danach durch Verwenden eines Vibrationsmischers oder durch leichtes Schwenken mischen.

Vor der Verwendung mindestens 5-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Haltbarkeit der Probe: bei +2 bis +8°C 48 Stunden
bei +15 bis +25°C 8 Stunden

Testverfahren:

Gelieferte Materialien

• Gebrauchsfertige Lösungen wie vorher angegeben

zusätzlich benötigte Materialien

- Kalibrations- und Kontrollmaterialien wie nachfolgend beschrieben
- NaCl-Lösung (0,9%)

Berechnung:

Berechnung der Hämoglobin A1c-Konzentration in Prozent über den Quotienten:

$$\% \text{ HbA1c} = \frac{\text{HbA1c [g/dl]}}{\text{Hb [g/dl]}} \times 100$$

Hinweis: Dieser Test ist für DCCT/NGSP-Standardisierung abgestimmt. Die Umrechnung der Ergebnisse in IFCC-Einheiten nach der Richtlinie der Deutschen Bundesärztekammer 2008 erfolgt mittels folgender Gleichung:

$$\text{HbA1c IFCC [mmol/mol]} = 10,93 \times (\% \text{ HbA1c NGSP} - 2,15)$$

Einschränkungen des Verfahrens – Interferenzen:

Für diagnostische Zwecke sind die HbA1c-Werte (%) im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren und klinischer Untersuchungen zu werten.

Der Test dient zur genauen und präzisen Bestimmung von HbA1c (%). Die Einzelergebnisse für die Gesamt-Hb- und HbA1c-Konzentrationen dürfen nicht angegeben werden.

Der Test ist nicht für die Diagnose von Diabetes mellitus oder die Beurteilung der Tagesschwankungen der Glucoseeinstellung vorgesehen und darf nicht als Ersatz für die tägliche Selbstkontrolle des Urin- oder Blutglucosespiegels verwendet werden.

Bei verkürzter Erythrozytenlebensdauer werden diese weniger stark der Glucose ausgesetzt, was selbst dann zu erniedrigten HbA1c-Werten (%) führt, wenn der durchschnittliche Blutglucosespiegel während dieses Zeitraums erhöht war. Ursachen für eine verkürzte Erythrozytenlebensdauer können eine hämolytische Anämie oder andere hämolytische Erkrankungen, homozygot vererbtes Sichelzellanämie, Schwangerschaft, ein kürzlich erfolgter größerer oder chronischer Blutverlust usw. sein. Die HbA1c-Ergebnisse von Patienten mit diesen Bedingungen sollten unter Vorbehalt ausgewertet werden.

Der Test ist für Gesamthämoglobinkonzentrationen von 7 g/dl bis 23 g/dl. Patienten mit schweren Anämie (Gesamthämoglobin < 7 g/dl) und Patienten mit Polyglobulie (Gesamthämoglobin > 23 g/dl) sollten mit dieser Methode nicht untersucht werden.

Fälle mit einer verkürzten Lebenszeit der Erythrozyten wie hämolytischer Anämie, Schwangerschaft oder bei einem kürzlichen signifikantem Blutverlust können zu niedrigen prozentualen Ergebnissen für HbA1c führen.

Proben, die die Hämoglobin Varianten S und C enthalten, können 40% höhere Werte ergeben als zu erwarten ist. Die Variante F kann zu niedrigen Ergebnissen führen. Generell sollten auf diese Varianten nicht die publizierten Normalwerte angewendet werden. Die Variante E beeinflusst die Ergebnisse nicht.

Icterus: Keine signifikante Interferenz bis 100 mg/dl Bilirubin (direktes und Gesamtbilirubin).

Lipämie (Intralipid): Keine signifikante Interferenz bis zu einer Triglyceridkonzentration von 55 mg/dl.

Rheumatoide Faktor 2000 IU/ml, Acetylsalicylsäure < 60 mg/dl, Natriumcyanat 50 mg/dl und Harnstoff 500 mg/dl (83 mmol/l) interferieren nicht.

Die Auswirkung von Medikamenten oder deren Metaboliten auf den Test ist nicht in allen Fällen bekannt. Im Zweifelsfall wird deshalb empfohlen, den Test nach Absetzen der Medikation zu wiederholen. Ein Absetzen der Medikation darf allerdings nur nach Anweisung des behandelnden Arztes erfolgen.

Messbereich:

Der Messbereich für das Gesamthämoglobin beträgt 2 g/dl bis 25 g/dl.

Der Messbereich für HbA1c beträgt 0,7 g/dl bis 2,5 g/dl.

Der Messbereich für % HbA1c ist die Konzentration, die dem Level 6 der Kalibratoren entspricht. Eine Probenverdünnung kann zu falschen Ergebnissen führen.

Sensitivität:

Die Testsensitivität beträgt 0,29 g/dl HbA1c, bzw. 1,33 g/dl Gesamthämoglobin.

Die untere Nachweisgrenze für % HbA1c liegt bei 2,57%.

Normalbereich:

Der Normalbereich ist abhängig von der verwendeten Bestimmungsmethode und liegt zwischen

4 – 6% (DCCT/NGSP) oder 20 – 42mmol/mol (IFCC) bei Nichtdiabetikern

6 – 8% (DCCT/NGSP) oder 42 – 64mmol/mol (IFCC) bei kontrollierten Diabetikern

Bei unkontrollierten Diabetikern kann der Anteil bis zu 20% (DCCT/NGSP) oder 195mmol/mol (IFCC) betragen.

Es wird für jedes Labor empfohlen eigene Referenzbereiche, die das Alter, Geschlecht, Ernährung und die geographische Lage reflektieren, zu erstellen. In jedem Fall muss die Übertragbarkeit der Normalwerte auf die jeweilige Patientenpopulation geprüft werden und die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Anamnese des Patienten und anderen klinischen Untersuchungen und Ergebnissen geprüft werden.

Methodenvergleich:

Ein Vergleich der Hämoglobin A1c-Bestimmung von Analyticon mit einer kommerziell erhältlichen Methode ergab folgende Korrelation für 54 Patienten:

$$y = 0,948x - 0,3427; \quad r = 0,9689$$

Impräzision:

Die Präzision wurde mit Kontrollen und nach einem internen Protokoll mit Vollblutproben bestimmt.

%HbA1c	In der Serie			Tag zu Tag		
	MW %	SD %	VK %	MW %	SD %	VK %
Probe						
Level 1	5,21	0,059	1,1	4,99	0,265	5,3
Level 2	11,86	0,109	0,9	11,61	0,403	3,5

Kalibration:

Die HbA1c-Methode wurde gegen die von der IFCC-Referenzmethode zur Messung von HbA1c in Humanblut standardisiert und kann durch Berechnung auf Ergebnisse, die auf DCCT/NGSP rückführbar sind, übertragen werden.

Kalibrations Typ: Logit-Log

Standardisierung:

HbA1c

S1: 0,9% NaCl

S2-6: Bio Cal® HbA1c Calibration set- Level 2 – Level 6 #14081

Total Hemoglobin

S1: 0,9% NaCl

S2: Bio Cal® HbA1c Calibration set – Nur Level 1 #14081

Wichtig: Die Kalibratoren erfordern KEINE VORBEHANDLUNG

Kalibrationshäufigkeit:

Eine Kalibration wird empfohlen alle 30 Tage bei Reagenzchargenwechsel und wenn Qualitätskontrollverfahren dies erfordern.

Qualitätskontrolle:

HbA1c Control Set 2 x 0,25 ml #1508

Wichtig: Die Kontrollen erfordern VORBEHANDLUNG (siehe Probenvorbereitung).

Die Kontrollintervalle und Kontrollgrenzen sind den individuellen Anforderungen jedes Labors anzupassen. Die Ergebnisse müssen innerhalb der festgesetzten Bereiche liegen. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall beschreiben, dass Werte außerhalb der Grenzen liegen.

Entsorgung:

Bitte beachten Sie die gesetzlichen Bestimmungen.

Literatur:

1. Cohen P.M. Perspective: measurement of Circulating Glycated Protein to Monitor Intermediate – Term Changes in Glycaemic Control Eur J Clin Chem. Clin. Biochem. 1992;30 (12): 851 – 859
2. The Diabetes Control of complications Trial Research on the Development and Progression of Long – Term Complicity of insulin – Dependant Diabetes Mellitus. The New England Journal of Medicine 1993;329 (14):977 – 986.
3. Mayer T.K. and Freedman Z.R.: Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility. Clin. Chem. Acta 127: 147 – 184 (1983)
4. Baynes J.W., Bunn H.F., Goldstein D.E. et al: National Diabetes Group: Report of the expert committee on glycosylated hemoglobin. Diabetes Care 7: 602 – 606 (1984).
5. Koenig R.J., Petersen C.M., Kilo C et al: Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. Diabetes 25: 230 – 232 (1976).
6. Nathan D.M., Singer D.E., Hurxthal K. and Goodson J.D.: The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. NE J Med 310: 341-346 (1984).
7. McCarren M: DCCT and its works: Intensive therapy reduces the risk of diabetic eye, kidney, and nerve disease. Diabetes Forecast 49 – 51 (September 1993).
8. Larsen M.L., Horder M, and Mogensen E.F.: Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. NE J Med. 323: 1021 – 1025 (1990).
9. Nathan D.M.: Hemoglobin A_{1c} – Infatuation or the real thing? NE J Med. 323: 1062 – 1063 (1990).
10. Wolf HU, Lang W., and Zander R/: Alkaline haematin D – 575, a new tool for the determination of hemoglobin as an alternative to the Cyanhemoglobin method. Clin. Chem. Acta 136: 83 – 104 (1984).
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture – third edition: approved standard. NCCLS Publication H4 – A3 Villanova, PA: NCCLS 1991.
12. Goldstein D.E., Little R.R., Wiedmeyer H.M., et al. Glycated Hemoglobin: Methodologies and clinical applications. Clin. Chem. 32: B64 – B70 (1986).
13. Ellis G., Diamonds E.P., Giesbrecht E.E., et al: An automated "high-pressure" liquid chromatographic assay for hemoglobin A_{1c}. Clin. Chem 30: 1746-1752 (1984).
14. Burtis C.A. and Ashwood E.R. (eds.): Tietz textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. W.B. Sands Company, Philadelphia, PA, p.2021 (1994)
15. Knowles W.J., Haigh W.B., and Michaud G.C. : A monoclonal antibody-based immunoassay for hemoglobin A_{1c} Diabetes 35 Supplement 94A (1986).

Grau hinterlegte Textpassagen wurden in der letzten Überarbeitung dieser Gebrauchsanweisung geändert.