



HEMOGLOBIN A1C



kód 11044 20 testů	kód 11045 100 testů
SKLADOVÁNÍ PŘI 15-30°C	
Reagenty pro měření koncentrace hemoglobinu A1C Pouze pro laboratorní <i>in vitro</i> diagnostiku	

HEMOGLOBIN A1C

Chromatografie - spektrofotometrie
Iontová výměna

PRINCIP METODY

Po přípravě hemolyzátu, kdy je odstraněna labilní frakce hemoglobinu jsou hemoglobiny zachyceny na katexové pryskyřici. Poté je hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) specificky vymyt a po promytí je frakce HbA_{1a+b1} je tato stanovena přímým fotometrickým měřením při 415 nm. Pro zjištění relativní koncentrace (HbA_{1c}) je třeba udělat ještě měření koncentrace celkového hemoglobinu přímým fotometrickým měřením při 415 nm.

OBSAH

	kód 11044	kód 11045
1. Reagent	1 x 30 mL	1 x 30 mL
2. Reagent	1 x 50 mL	1 x 240 mL
3. Reagent	1 x 450 mL	4 x 450 mL
4. Mikrokolony	1 x 20	1 x 100

SLOŽENÍ

- Reagent.** Ftalát draselný 50 mmol/l, detergent 5 g/l, pH 5,0 a azid sodný 0,95 g/L.
 - Reagent.** Fosfátový pufr 30 mmol/l, pH 6,5 a azid sodný 0,95 g/l.
 - Reagent.** Fosfátový pufr 72 mmol/l, pH 6,5 a azid sodný 0,95 g/l.
 - Mikrokolony.** Obsahují přesně navážené množství pufované pryskyřice pH 6,5 fosfátovým pufr 72 mmol/L, azid sodný 0,95 g/L
- Upozornění:** Používejte pouze mikrokolony (4) a reagenty 2 a 3 se stejným číslem šarže!

SKLADOVÁNÍ

Skladujte při teplotě 15-30°C. Reagenty jsou stabilní do data expirace uvedené na štítku, pokud jsou těsně uzavřené a je zabráněno jejich kontaminaci během jejich použití.

Známky zhoršení kvality:

Reagencie: přítomnost částic, zákal.

Mikrokolony (4): ztráta (nepřítomnost) pufru nad pryskyřici.

PŘÍDAVNÁ ZAŘÍZENÍ

- Spektrofotometr nebo fotometr s filtrem 415 nm (405-425)

VZORKY

Plná krev odebraná standardním způsobem. Hemoglobin HbA_{1c} je stabilní 7 dní při 2-8°C. Heparin nebo EDTA může být použit jako antikoagulant.

POSTUP

Příprava hemolysátu a odstranění labilní frakce

- Vytemperujte kolony a reagenty na pokojovou teplotu (21-26°C) (Poznámka 1)
- Pipetujte do testovací zkumavky:

Krev	50 µL
Reagent (1)	200 µL

- Promíchejte a nechejte stát 10-15 minut při pokojové teplotě. Tento hemolysát použijte v kroku 6 a 11.

Příprava kolonek (Poznámka 2 a 3)

- Nejdříve odstraňte horní uzávěr mikrokolony, poté uzávěr její spodní části.
- Zatlačte horní disk, který uzavírá pryskyřici tupým předmětem (skleněnou tyčinkou) těsně nad její povrch. Nestlačujte pryskyřici! Kapalínu nad pryskyřici nechejte prokapat přes spodní uzávěr.

Oddělení a odečtení frakce HbA_{1c} :

- Opatrně napipetujte na filtr kolony:

Hemolysát	50 µL	Ponechte volně odtékat ven
-----------	-------	----------------------------

- Pro odstranění všech zbytků vzorku zanechaných nad horním filtrem, pipetujte:

Reagent (2)	200 µL	Ponechte volně odtékat ven
-------------	--------	----------------------------

- Pipetujte:

Reagent (2)	2,0 mL	Ponechte volně odtékat ven
-------------	--------	----------------------------

- Umístěte zkumavku pod kolonu a přidejte:

Reagent (3)	4,0 mL	Sbírejte eluát (frakce HbA _{1c})
-------------	--------	---

- Eluát důkladně promíchejte a odečtěte absorbanci (A) frakce HbA_{1c} při 415 nm proti destilované vodě (A_{HbA_{1c}}). Absorbance je stabilní nejméně po dobu jedné hodiny.

Odečtení Hb_{TOTAL}

- Pipetujte do testovací zkumavky:

Reagent (3)	12,0 mL
Hemolysát	50 µL

- Eluát důkladně promíchejte a odečtěte absorbanci (A) při 415 nm proti destilované vodě (A_{HbTOTAL}). Absorbance je stabilní nejméně po dobu jedné hodiny.

VÝPOČET

Procento relativní koncentrace HbA_{1c} ve vzorku se vypočítá podle vzorce:

$$\frac{A_{HbA1c} \times V_{HbA1c}}{A_{HbTOTAL} \times V_{HbTOTAL}} \times 100 = \% HbA1C$$

Objem HbA_{1c} (V_{HbA_{1c}}) je 4 mL, objem Hb total (V_{HbTOTAL}) je 12 mL. Následující rovnice uvádí výpočet koncentrace:

$\frac{A_{HbA1c}}{A_{HbTOTAL}}$	$\times \frac{100}{3} = \% HbA1C$
---------------------------------	-----------------------------------

Výsledek získané touto metodou jsou ekvivalentní podle „US National Glycohemoglobin Standardization Program“ certifikační metody (NGSP) a nebo mohou být přepočítány na ekvivalent podle „International Federation of Clinical Chemistry“ standardizované metody (IFCC) za použití mezinárodně doporučeného přepočítávacího vzorce^{2,3}

%HbA_{1c} - IFCC (mmol/mol) = 10,93 x HbA_{1c} - NGSP-DCCT(%) - 23,5

REFERENČNÍ HODNOTY

Následující cut-off hodnoty byly stanoveny Skupinou experimentálního vývoje komplikací a kontroly diabetu (Diabetes Control and Complications Trial Research Group - DCCT) a přijaty mnoha zeměmi pro referenční meze pro populaci bez diabetu a pro zhodnocení stupně kontroly glukózy v krvi diabetiků^{4,5}

NGSP-DCCT (%)	IFCC (mmol/mol)	Referenční hodnoty/ stupeň kontroly
4,0 – 6,5	20 - 48	Bez diabetu
6,0 – 7,0	42 – 53	Cílená kontrola
7,0 – 8,0	53 - 64	Vhodná kontrola
> 8,0	> 64	Doporučená kontrola

KONTROLA KVALITY

Pro ověření provedení a kontrolu postupu měření Hemoglobinu A_{1c} se doporučuje použít kontroly: normální hladina (kód 18001) a zvýšená hladina (kód 18002).

Každá laboratoř by si měla stanovit svoji vlastní vnitřní kontrolu kvality a postupy pro nápravná jednání, jestliže kontroly nejsou v tolerančním rozpětí.

METROLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA

- Detekční limit: Nižší jak 4,0 % = 20 mmol/mol.
- Linearita: Nejméně 17,0 % = 162 mmol/mol.
- Opakovatelnost (jednoho vzorku):

Průměrná koncentrace	CV	n
7,2 % = 55 mmol/mol	5,4 %	25
9,9 % = 85 mmol/mol	6,3 %	25

Reprodukovatelnost (run to run):

Průměrná koncentrace	CV	n
7,2 % = 55 mmol/mol	7,3 %	25
9,9 % = 85 mmol/mol	5,9 %	25

- Správnost: Výsledky získané touto metodou nevykazovaly systematické rozdíly ve srovnání s referenční metodou. Porovnávací zkoušky jsou na požádání k dispozici.
- Interference: Bilirubin do 20 mg/dl a lipemie (triglyceridy) do 10 g/L neinterferují. Některé druhy léků a jiné látky mohou interferovat⁶. Při iontové výměně u chromatografických metod může přítomnost hemoglobinu C nebo S ve vzorku nepatrně změnit výsledky, ale rozdíly nejsou klinicky významné⁵. Jiné varianty hemoglobinu jako HbE, HbF, carbamyl-Hb a acetyl-Hb mohou interferovat. Inkubace s Reagentem (1) eliminuje interference způsobené labilním HgA_{1c}. Při hemolytické anemii, anemii z nedostatku železa a transfúzi se průměrně stáří červených krvinek mění. U těchto pacientů by se měla věnovat větší opatrnost při interpretaci výsledků HbA_{1c}.

DIAGNOSTICKÁ CHARAKTERISTIKA

HbA_{1c} je produktem nezvratné kondenzace glukózy s N-konečným zbytkem β-řetězce hemoglobinu A.

HbA_{1c} koncentrace je přímo úměrná průměrné koncentraci glukózy v krvi převládající v krvi v předchozích 6–8 týdnech, ekvivalent průměrné životnosti červených krvinek⁴. Průměrná hodnota glukózy (eAG) během této periody může být vypočítána podle vzorce⁹:

$$\begin{aligned} eAG \text{ (mg/dl)} &= 28,7 \times \text{HgA}_{1c} - \text{NGSP} - \text{DCCT} (\%) - 46,7 \\ eAG \text{ (mmol/l)} &= 1,59 \times \text{HgA}_{1c} - \text{NGSP} - \text{DCCT} (\%) - 2,59 \\ eAG \text{ (mg/dl)} &= 2,64 \times \text{HgA}_{1c} - \text{IFCC} \text{ (mmol/mol)} + 15,0 \\ eAG \text{ (mmol/l)} &= 0,146 \times \text{HgA}_{1c} - \text{IFCC} \text{ (mmol/mol)} + 0,843 \end{aligned}$$

Hladiny HbA_{1c} jsou hodnotným doplňkem určení glukózy v krvi při stanovení glykemických kontrol u jednotlivců s diabetes mellitus za předpokladu provádění dalších stanovení, které poskytují více spolehlivých informací pro monitorování glykemie než jen určení hladiny glukózy. Četné studie ukázaly, že komplikace související s diabetem mohou být redukovány dlouhodobým monitorováním a přísnou kontrolou hladiny glukózy v krvi.

Koncentrace HbA_{1c} mohou být také užitečnou hodnotou pro stanovení diagnostiky diabetu.¹⁰

Klinická diagnóza by však neměla být uzavřena jen na základě tohoto výsledku, ale měly by být propojeny klinické a laboratorní výsledky.

POZNÁMKY

1. Získané výsledky jsou nezávislé na teplotě, pokud pracujete v doporučeném teplotním intervalu (21-26°C). Jestliže je pracovní teplota mimo doporučený interval, vynásobte získané hodnoty odpovídajícím faktorem uvedeným v následující tabulce:

Pracovní teplota	Faktor
18-20°C	1,15
27-30°C	0,90

2. Dlouhé uskladnění kolonek vede k utlačení pryskyřice a tím i ke zpomalení jejich průtoku. Pro obnovu jejich funkce obraťte kolonu před stanovením na 10 minut tak, aby se pryskyřice přesypala. Poté kolonu umístěte do pracovní polohy a pryskyřici nechejte usadit.
3. V pryskyřičné koloně se mohou objevit vzduchové bubliny. Jejich přítomnost neovlivňuje stanovení.

LITERATURA

1. Bissé E, Abraham EC. New less temperature-sensitive microchromatographic method for the separation and quantitation of glycosylated hemoglobins using a non-cyanide buffer system. *J Chromatogr* 1985; 344: 81-91.
2. Hoelzel W, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A_{1c} in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004; 50: 166-174
3. Hanas R, et al. 2010 Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A_{1c} measurement. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 775-776
4. Tiez Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
5. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AACC Press, 2000.
7. Roberts WL et al. Effects of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. *Clin Chem* 2002; 48: 383-385.
8. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-163.
9. Nanthan DM, et al. Translating the A_{1c} assay into estimated average glucose values. *Diabetes care* 2008; 31: 1473-1478.
10. Nanthan DM, et al. International Expert Committee report on the role of the HbA_{1c} assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes care* 2009; 2: 1327-1334.

UPOZORNĚNÍ

Překlad byl revidován k datu: 23.9.2010

Vzhledem k možné inovaci výrobku Vám doporučujeme překontrolovat český překlad s originálním příbalovým letákem. Více informací naleznete na internetové adrese: www.biosystems-sa.com nebo na adrese výhradního distributora pro ČR: www.jktrading.cz

VÝROBCE

BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona (Spain)
ISO 13485 - TÜV Rheinland - Reg.: SX 60010383 0001
ISO 9001 - TÜV CERT - Reg.: 01 100 6696