

CONTINUT

REF 3155105 Glycated HbA1c 25 Teste

Doar pentru diagnosticul profesional *in vitro*.

GLYCATED HbA1c

Determinare cromatografica in tuburi preumplute cu rasina schimbatoare de ioni

INDICATII

De-a lungul vietii circulatorii a celulelor rosii, hemoglobina A1c este formata continuu prin adugarea glucozei la terminalul N al lantului hemoglobinei beta. Acest proces, care este nonenzimatic, reflecta expunerea hemoglobinei la glucoza pentru o perioada extinsa. Intr-un studiu clasic, Trivelli sa au artat ca la pacientii diabetici, nivelul Hemoglobinei A1c este crescut de 2-3 ori peste nivelul gasit la indivizii normali. Cateva investigatii au recomandat ca nivelul Hemoglobin A1c serveste ca un indicator al controlului metabolic al diabetului.

Hemoglobina A1c a fost definita operational ca "cea mai rapida fractiune" (HbA1a, A1b, A1c) care se separa prima in timpul cromatografiei pe coloane cu rasini schimbatoare de cationi. Hemoglobina neglicozilata care consta in restul hemoglobinelor a fost stabilita ca HbA0.

Cu toate acestea, pana la publicarea "Diabetes Care & Complications Trial (DCCT) in 1993, ideea ca un control glicemic mai bun conduce la o mai buna prognoza pe termen lung a fost doar o teorie. DCCT a comparat pacientii care au primit terapie intensiva cu pacientii care au primit ingrijire pentru diabetul de tip 1. Determinarea HbA1c a fost un factor cheie in acest studiu. A fost descoperit ca pacientii aflati sub tratament intensiv si-au mentinut un nivel mai redus al glucozei sangvine, indicat prin valori semnificativ mai mici ale HbA1c.

Acesti pacienti au demonstrat ulterior morbiditate si mortalitate mai buna decat pacientii supusi terapiei conventionale. Riscul lor de retinopatie, nefropatie si neuropatie a fost redus cu aproximativ 40-75%. HbA1c a fost stabilit ca un indicator critic al controlului glicemic pe termen lung la pacientii cu diabet de tipul 1.

PRINCIPIU

Procedura de fata utilizeaza o rasina schimbatoare de ioni cationica, cu legare slaba pentru separare rapida a hemoglobinei glicozilate de celelalte hemoglobine.

Un preparat hemolizat din sange integral este amestecat continuu pentru 5 minute cu o rasina schimbatoare de ioni. In acest timp, HbA0 se leaga de rasina. HbA0 consta din toata celelalte hemoglobine cu exceptia A1c, care ramane in solutie. Dupa perioada de amestecare, este folosit un filtru pentru separarea supernatantului ce contine A1c de rasina.

Procentul de glicohemoglobina este determinat prin masurarea absorbantei la 415 nm pentru fractia A1c si pentru de fractia de hemoglobina totala.

Raportul celor doua absorbante ne da procentul de HbA1c.

COMPOZITIA REACTIVULUI

REAGENT A: Rasina Impachetare 25 x 2 mL

Rasian schimbatoare cationica, 8 mg/ml, tamponata la pH 6.9. Precantata in tuburi, gata de utilizare.

REAGENT B: Solutie de lizare Impachetare: 1 x 12.5 mL

Solutia de lizare: Cianura de potasiu 10 mM, surfactanti.

STANDARD: Liofilizat, Glicohemoglobina A1c 10%.

FILTRE SEPARATOARE: Impachetare 25 bucati

PREPARAREA REACTIVILOR

- Reactivul A si Reactivul B sunt gata de utilizare.
- Standard Glicohemoglobina: adaugati 1 mL de apa deionizata, asteptati 30 minute, amestecati usor prin inversiune.

PASTRARE SI STABILITATE

Toti reactivi sunt stabili pana la data de expirare imprimata pe etichete. Rasina si reactivul lizant trebuie pastrate la rece (2-8 °C). Standardul reconstituit este stabil cel putin 30 zile daca este inghetat la -20 °C. Alterarea aspectului fizic al reactivului poate fi o indicatie a instabilitatii reactivului.

ECHIPAMENT AUXILIAR
MATERIALE NECESARE DAR NEFURNIZATE

- Pipete semiautomate de 10, 200 si 1000 µL.
- Cronometru.
- Tuburi de sticla sau plastic cu capacitatea de 0.6 ml si 5 mL.
- Mixer sau rotator.
- Spectrofotometru sau colorimetru cu lungimea de unda 415 nm.
- Materiale de control al calitatii testelor de glicohemoglobina.

PROBELE

Nu este necesare pregatirea speciala a pacientului. Nu sunt necesare probe recoltate pe nemancate. Nu sunt necesare substante speciale pentru conservare in afara anticoagulantului. Recoltati sangele prin metoda aseptica pe un vacutainer cu EDTA. Glicohemoglobina este stabila pe EDTA timp de 1 saptamana la 2 - 8 °C. Evitati utilizarea probelor lipemice.

Este recomandabil ca recoltarea probelor sa fie facuta in conformitate cu Documentul NCCLS H11-A37.

CONTROLUL DE CALITATE INTERN

Increderea in rezultatul testelor trebuie monitorizata periodic prin folosirea unor materiale de control strabile, analizate in acelasi mod ca si probele de pacient necunoscute.

PROCEDURA

Prepararea hemolizatului:

1. Pipetati 500 µL Reactiv lizare (Reactivul B) in tuburi etichetate: Standard, Control, Proba 1, etc.
2. Pipetati 100 µL din proba de sange bine omogenizata, standard sau control in tuburile corespunzatoare. Amestecati bine.

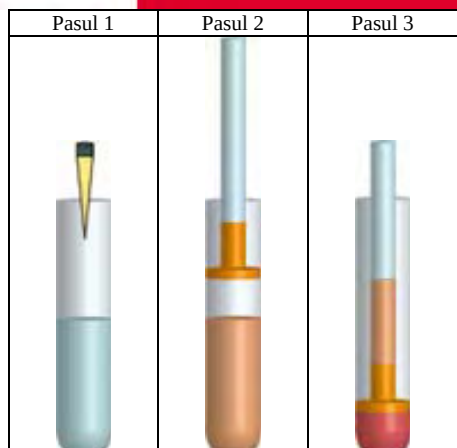
Prepararea glicohemoglobinei:

1. Adaugati 70 µL de hemolizat in tubul cu rasina (RA).
2. Amplasati filtrul separator in tub astfel incat manseta de cauciuc sa fie amplasata la aproximativ 1 cm deasupra nivelului lichidului.
3. Puneti tuburile pe agitator sau mixer si lasati sa se amestece continuu timp de 5 minute.
4. Indepartati tuburile din agitator.
5. Impingeti filtrul separator in tuburi pana ce rasina este apasata ferm.



CS/00/034

Joaquim Costa, 18, 2ª planta. 08390 Montgat – Barcelona (Spain). Tel. (+34) 93 4694990 Fax (+34) 93 4693435
Almacén: Sant Antoni Mª Claret, 8 bis. 08390 Montgat – Barcelona (Spain) www.linear.es e-mail: info@linear.es



6. Supernatantul poate fi transferat în alt tub sau direct într-o cuveta pentru determinarea absorbantei.

7. Reglați absorbanta fotometrului la zero la lungimea de undă de 415nm cu apă deionizată. (domeniul lungimilor de undă: 390-420 nm).

8. Citiți și înregistrați valorile de absorbanta pentru Standard, Control, Proba 1, etc. Aceste citiri sunt pentru glicohemoglobina.

Fractia de hemoglobina totala:

1. Pipetați 5.0 mL apă deionizată în tuburi etichetate:

Standard, Control, Proba 1, etc.

2. Pipetați 20 µL de hemolizat în tuburile corespunzătoare. Amestecați.

3. Reglați absorbanta fotometrului la zero la lungimea de undă de 415nm cu apă deionizată.

4. Citiți și înregistrați valorile de absorbanta pentru Standard, Control, Proba 1, etc. Aceste citiri sunt pentru hemoglobina totală.

CALCULUL REZULTATELOR

Rezultatele se determină conform relațiilor:

$$\% \text{ HbA1c (necunoscut)} = \frac{R (\text{necunoscut})}{R (\text{standard})} \times \text{standard conc}$$

în care :

$$R (\text{necunoscut}) = \text{Raport (necunoscut)} = \frac{\text{Abs HbA1c (necunoscut)}}{\text{Abs Hb Tot (necunoscut)}}$$

$$R (\text{standard}) = \text{Raport (standard)} = \frac{\text{Abs HbA1c (standard)}}{\text{Abs of Hb Tot (standard)}}$$

Exemplu:

Un standard cu concentrația de glicohemoglobina 8.0% a avut Abs. = 0.480 pentru HbA1c și Abs. = 0.575 pentru Hb Tot.

O proba necunoscută a avut

Abs. HbA1c = 0.962 și Abs. Hb Tot = 0.746.

Concentrația de glicohemoglobina necunoscută este calculată astfel:

$$R (\text{necunoscut}) = \frac{0.962}{0.746} = 1.289$$

$$R (\text{standard}) = \frac{0.480}{0.575} = 0.835$$

$$\% \text{ Glyco (necunoscut)} = \frac{1.289}{0.835} \times 8.0 = 12.4$$

VALORI AȘTEPTATE

6.0 – 8.6%. Domeniul reprezintă intervalul de încredere de 95% pentru 100 de pacienți cu valori normale ale glucizei sangvine și fără istoric diabetic.

Un studiu pe 31 de pacienți diabetici a dus la obținerea unor rezultate cuprinse între 8.4% și 16.0%.

Pentru populația diabetică a fost efectuat un test comparativ cu glucoza determinată din plasma recoltată pe nemancate și a fost obținut un coeficient de intercorelație de 0.84.

Fiecare laborator trebuie să-și stabilească propriile valori de referință corespunzătoare populației explorate.

PERFORMANȚA ANALITICĂ

Precizia

Evaluările intratest au fost obținute prin testarea a trei probe de sânge în mod repetat, de 20 de ori în aceeași zi. Precizia inter teste a fost determinată prin efectuarea a două teste pe zi, din aceleași materiale, în duplicat, pe o perioadă de 20 de zile. Rezultatele sunt prezentate în tabelul de mai jos.:

a- Precizie intra-test

Probe	n	Media (%)	SD (%)	%CV
Proba #1	20	5.7	0.18	3.2
Proba #2	20	7.7	0.19	2.4
Proba #3	20	13.1	0.24	1.8

b- Precizie inter-teste

Probe	n	Media (%)	SD (%)	%CV
Proba #1	40	5.5	0.22	3.9
Proba #2	40	7.5	0.23	3.1
Proba #3	40	12.9	0.31	2.4

Linearitate

Metoda prezentată are linearitate în domeniul de determinare 4.0 - 20.0%. Probele de sânge cu hemoglobina totală mai mare de 18g/L trebuie diluate x 2 cu apă deionizată înainte de testare.

Sensibilitate

Sensibilitatea metodei, în sensul limitei de detecție este de 4%.

Corelație

Un test comparativ între metoda curentă și o procedură HPLC a condus la rezultatele de mai jos:

$$y = 0.97x + 2.34 \%, r = 0.99.$$

Interferențe

1. A fost raportat că nivelele crescute de HbF pot conduce la subestimarea HbA1c și că uremia nu interferează cu determinarea HbA1c prin teste imunologice.
2. A fost raportat că variațiile de hemoglobine HbS și HbA2 nu sunt detectate prin teste imunoenzimatiche, ducând la posibile determinări imprecise. A fost raportat de asemenea că unii compuși instabili (baza Schiff) nu sunt detectate și nu interferează cu determinarea HbA1C prin teste imunoenzimatiche.
3. Alte variante rare de hemoglobine (de exemplu HbE) nu au fost testate.

PRECAUȚII ÎN UTILIZARE

Reactivii conțin componente inactive: conservanți (Azida de sodiu și altele), surfactanți, etc. Concentrația totală a acestora este mai mică decât limitele indicate prin directivele 67/548/EEC și 88/379/EEC, directive referitoare la clasificarea, împachetarea și etichetarea substanțelor periculoase. Cu toate acestea, reactivii trebuie manipulați cu atenție, evitând înghițirea și contactul cu pielea, ochii și mucoasele.

Se recomandă utilizarea reactivilor de laborator în conformitate cu recomandările GLP. 8.

Administrarea deșeurilor

Va rugăm respectați regulamentele locale.

BIBLIOGRAFIE

1. Trivelli, L.A., Ranney, P.H., 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 Manag., Vol. 16 (Jan. 1978).
5. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
6. Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
7. NCCLS Document, "Procedures for the collection of arterial blood specimens", Approved Standard, 3rd Ed. (1999).
8. EU-Directive 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of good laboratory practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.