

HbA1c net FS*

Reagenz für die quantitative In-vitro-Bestimmung von Hämoglobin A1c (HbA1c) in Vollblut an photometrischen Systemen

Bestellinformation

| Best. Nr. | Packungsgröße |
|------------------|---------------------------------------|
| 1 3348 99 10 930 | R1 3 x 18 mL + R2 3 x 6 mL |
| 1 4590 99 10 113 | 1 x 500 mL HbA1c net Hämolyseerlösung |
| 1 3350 99 10 044 | 2 x 0,3 mL TruCal HbA1c net |

Zusammenfassung [1,2,3,11,14]

Hämoglobin A1c (HbA1c) ist ein glykiertes Hämoglobin, das durch eine nicht-enzymatische Reaktion von Glucose mit nativem Hämoglobin entsteht. Dieser Prozess läuft ständig ab solange sich ein Erythrozyt im Blutkreislauf befindet (Erythrozytenlebensdauer 100 – 120 Tage). Das Ausmaß der Glykierung ist direkt proportional zur Blutglucosekonzentration. Der Anteil von HbA1c am Gesamthämoglobin reflektiert in etwa den mittleren Blutglucosespiegel der letzten 3 Monate. HbA1c dient daher als Glykämie-Langzeitparameter zur retrospektiven Verlaufskontrolle bei Diabetes mellitus. Klinische Studien haben gezeigt, dass eine gute Einstellung des HbA1c-Wertes das Auftreten diabetischer Spätfolgen verhindern oder verzögern kann. Darüber hinaus kann die HbA1c-Testung auch zur Diagnose von Diabetes Mellitus verwendet werden.

Da die HbA1c-Menge auch abhängig ist von der Gesamtmenge des Hämoglobins, wird der Anteil des HbA1c am Gesamthämoglobin angegeben.

Methode

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| Hämoglobin: | Fotometrischer Test |
| HbA1c: | Kolorimetrische, enzymatische Methode |

Prinzip

Die HbA1c- und Hämoglobin-Konzentrationen werden einzeln bestimmt. Der HbA1c-Anteil am Gesamthämoglobin wird ausschließlich aus den Einzelwerten berechnet.

Hämoglobin-Messung

Vollblutproben werden mit Hämolyseerlösung hämolysiert. Hämoglobin wird von den Erythrozyten freigesetzt. Die Extinktion von Hämoglobin wird bei 570 nm nach Zugabe von Reagenz R1 gemessen. Sie ist proportional zu der Gesamtkonzentration von Hämoglobin in der Probe.

HbA1c-Messung [16]

Nach Zugabe von Reagenz R2 werden fructolysierte Dipeptide des N-terminalen Endes der β -Kette von Hämoglobin durch Protease freigesetzt. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird nach oxidativer Spaltung von fructolysierten Dipeptiden durch FPOX (Fructosyl-Peptid-Oxidase) freigesetzt. Das entstandene H_2O_2 wird kolorimetrisch über eine Reaktion mit einem Farbstoff und dem Enzym Peroxidase bei 660 nm nachgewiesen. Die Extinktionszunahme ist proportional zur HbA1c-Konzentration.

Standardisierung

Der Test ist nach den anerkannten IFCC [4] und DCCT/NGSP [7] Referenzmethoden standardisiert. Eine Berechnung der Patienten- und Kontrollwerte ist sowohl nach IFCC [mmol/mol] als auch nach DCCT/NGSP [%] möglich.

NGSP- und IFCC-Werte stehen zueinander in einem linearen Verhältnis und können daher anhand folgender Formeln berechnet werden:

$$HbA1c (IFCC^c) = (HbA1c (NGSP^b) - 2,15) / 0,0915$$

$$HbA1c (NGSP^b) = 0,0915 \times HbA1c (IFCC^c) + 2,15$$

a: NGSP-Werte in %

b: IFCC-Werte in mmol/mol

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry [4,5,10]

DCCT: Diabetes Control and Complications Trial [6]

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program [7]

HbA1c- und Mittlere Glucosekonzentration [11]

Aufgrund einer linearen Korrelation zwischen Hämoglobin A1c- und mittleren Glucosekonzentrationen können HbA1c-Werte in geschätzte mittlere Glucosewerte mit Hilfe nachfolgender Gleichungen umgerechnet werden: Standardisierung nach IFCC (berechnet gemäß Angaben in Literatur [11]):

$$\text{Mittlere Glucosekonzentration [mg/dL]} = 2,63 \times HbA1c^a + 15,01$$

$$\text{Mittlere Glucosekonzentration [mmol/L]} = 0,146 \times HbA1c^a + 0,829$$

b: HbA1c-Werte in mmol/mol IFCC

Standardisierung nach NGSP:

$$\text{Mittlere Glucosekonzentration [mg/dL]} = 28,7 \times HbA1c^a - 46,7$$

$$\text{Mittlere Glucosekonzentration [mmol/L]} = 1,59 \times HbA1c^a - 2,59$$

a: HbA1c-Werte in % NGSP

Für die lineare Regressionsgleichung ergaben sich bei getesteten Individuen keine bedeutenden Unterschiede im Hinblick auf Geschlecht, bestehende oder nicht bestehende Diabeteserkrankung, Diabetes-Typ, Alter, Rasse oder Volkszugehörigkeit. Obwohl diese Gleichung für eine Mehrheit der Individuen benutzt werden kann, muss jedes Labor selbst abklären, ob die genannten Regressionsgleichungen für die zu untersuchende Patienten-Gruppe geeignet sind.

Reagenzien

Bestandteile und Konzentrationen

| | | |
|-----|----------------------|--------------------|
| R1: | Puffer | 100 mmol/L |
| | FPOX | $\geq 0,5$ kU/L |
| R2: | Ethylenglycolderivat | < 10 % |
| | Puffer | 20 mmol/L |
| | Protease | ≥ 500 kU/L |
| | Farbstoff | $\geq 0,05$ mmol/L |
| | Ethylenglycolderivat | < 10 % |

Lagerung und Haltbarkeit der Reagenzien

Die Reagenzien sind bei 2 – 8 °C bis zum Ende des auf der Packung angegebenen Verfallsmonats verwendbar, sofern Kontamination und Verdunstung vermieden werden. Reagenzien nicht einfrieren und vor Lichteinstrahlung schützen!

Vorbereitung der Reagenzien

Die Reagenzien sind gebrauchsfertig.

Die HbA1c net Hämolyseerlösung vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen und durch mehrmaliges Invertieren homogenisieren. Eine leicht opaleszente Trübung bleibt bedingt durch die Zusammensetzung der Hämolyseerlösung bestehen. Nicht schütteln! Schaumbildung vermeiden!

Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen

1. Reagenz 1 enthält tierisches Material. Behandeln Sie das Produkt als potentiell infektiös gemäß allgemein anerkannter Vorsichtsmaßnahmen und guter Laborpraxis.
2. Hämoglobin- und HbA1c- Werte in g/dL, die mit DiaSys HbA1c net FS ermittelt werden, werden ausschließlich für die Berechnung des HbA1c- Anteils am Gesamthämoglobin gebraucht. Die Einzelwerte für Hämoglobin und HbA1c dürfen nicht für diagnostische Zwecke verwendet werden.
3. Falsch niedrige Werte (niedriges HbA1c trotz hoher Blutglucose) können bei Erkrankungen auftreten, die mit einer verkürzten Erythrozytenlebensdauer verbunden sind (bestimmte hämatologische Erkrankungen) oder durch größeren Blutverlust in den vorangegangenen Wochen (höherer Anteil an jungen Erythrozyten). Falsch hohe Werte (hohes HbA1c trotz normaler Blutglucose) wurden bei Eisenmangelanämie beobachtet (hoher Anteil an alten Erythrozyten). Derartige Erkrankungen müssen bei der klinischen Interpretation von HbA1c-Werten berücksichtigt werden. Bei der klinischen Interpretation von HbA1c-Werten von Patienten mit Hämoglobin-Varianten ist ebenfalls Vorsicht geboten.
4. In sehr seltenen Fällen kann es bei Proben von Patienten mit Gammopathien zu verfälschten Ergebnissen kommen [15].
5. N-Acetylcystein (NAC)-, Acetaminophen- und Metamizol-Medikation führt zu falsch niedrigen Patientenwerten.
6. Beachten Sie bitte die Sicherheitsdatenblätter und die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen für den Gebrauch von Laborreagenzien. Für diagnostische Zwecke sind die Ergebnisse stets im Zusammenhang mit der Patientenvorgeschichte, der klinischen Untersuchung und anderen Untersuchungsergebnissen zu werten.
7. Nur für professionelle Anwendung!

Entsorgung

Bitte beachten Sie die gesetzlichen Vorschriften.

Zusätzlich benötigte Materialien

Übliche Laborausrüstung

Probenmaterial

EDTA-Vollblut

Die Gewinnung des Vollblutes sollte mittels standardisierter Blutabnahme erfolgen und die Entnahmeröhrchen entsprechend den Angaben des Herstellers gefüllt werden.

Haltbarkeit der Proben [8]

| | | | |
|-----------|----------|-----|------------|
| Vollblut | 1 Woche | bei | 2 – 8 °C |
| Hämolytat | 1 Stunde | bei | 15 – 25 °C |

Kontaminierte Proben verwerfen.

Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung ist die DiaSys HbA1c net Hämolyseerlösung erforderlich. Kalibratoren, Kontrollen und Proben werden vor Gebrauch hämolyseiert. Die Hämolyse sollte innerhalb einer Stunde ab Herstellung verarbeitet werden. Die Bearbeitung im Batch Modus wird empfohlen. Bitte befolgen Sie nachfolgendes Pipettierschema für die manuelle Hämolyse:

| | Vorbereitung | | | |
|--|--------------------|--------------------|-----------|---------|
| | Kalibrator Level 1 | Kalibrator Level 2 | Kontrolle | Probe |
| TruCal HbA1c net Level 1 | 16 µL | - | - | - |
| TruCal HbA1c net Level 2 | - | 50 µL | - | - |
| TruLab HbA1c net Level 1 und Level 2 /Probe | - | - | 50 µL | 50 µL |
| Hinzufügen | | | | |
| HbA1c net Hämolyseerlösung | 1000 µL | 1000 µL | 1000 µL | 1000 µL |
| Mischen und 1 Minute stehenlassen. Nach 1 Minute ist die Hämolyse abgeschlossen. Eine leichte Trübung aufgrund der Zusammensetzung der Hämolyseerlösung bleibt bestehen. | | | | |

Testschema

Applikationen für automatisierte Systeme sind auf Anfrage erhältlich. Bitte wenden Sie sich an Ihren Lieferanten.

Basisparameter am Hitachi 917 mit TWIN Applikation und manueller Kalibrator-/Kontroll-/Proben-Hämolyseerlösung

Hämoglobin-Bestimmung

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| Wellenlänge (Haupt/Neben) | 570/800 nm (bichromatisch) |
| Temperatur | 37 °C |
| Messung | TWIN Test / 3-Punkt Test |
| Probe/Kalibrator | 30 µL |
| Reagenz 1 | 180 µL |
| Reagenz 2 | 60 µL |
| Zugabe Reagenz 2 | Cycle 15 |
| Absorption | Cycle 15 |
| Kalibration | linear |

HbA1c-Bestimmung

| | |
|----------------------------------|----------------------------|
| Wellenlänge (Haupt/Neben) | 660/800 nm (bichromatisch) |
| Temperatur | 37 °C |
| Messung | TWIN Test / 3-Punkt Test |
| Probe/Kalibrator | 30 µL |
| Reagenz 1 | 180 µL |
| Reagenz 2 | 60 µL |
| Zugabe Reagenz 2 | Cycle 15 |
| Absorption 1 | Cycle 18 |
| Absorption 2 | Cycle 34 |
| Kalibration | linear |

Kalibration

Die HbA1c- und Hämoglobin-Konzentration unbekannter Proben werden über lineare Kalibrationskurven berechnet. Jede Kalibrationskurve wird mit 2 Kalibratoren verschiedener Konzentrationen ohne Nullwert erstellt.

Kalibrationsstabilität: 6 Wochen

Berechnung

Nach Eingabe der Berechnungsformel führt der Analyser die Berechnung des HbA1c-Anteils am Gesamthämoglobin automatisch durch. Beziehen Sie sich bitte auf das Gerätehandbuch.

Je nach gewählter Standardisierung, geben Sie nachfolgende Formel ein:

IFCC

Werte in mmol/mol gemäß IFCC:

$$\text{HbA1c [mmol/mol]} = \left(\frac{\text{HbA1c [g/dL]}}{\text{Hb [g/dL]}} \right) \times 1000$$

DCCT/NGSP

Werte in Prozent gemäß DCCT/NGSP:

$$\text{HbA1c [%]} = \left(91,5 \times \frac{\text{HbA1c [g/dL]}}{\text{Hb [g/dL]}} \right) + 2,15$$

Kalibratoren und Kontrollen

Für die Kalibration wird der DiaSys Kalibrator TruCal HbA1c net empfohlen. Die Kalibratorwerte sind rückverfolgbar auf die anerkannte IFCC-Referenzmethode [4]. Für die interne Qualitätskontrolle sollte DiaSys TruLab HbA1c net verwendet werden. Jedes Labor sollte Korrekturmaßnahmen für den Fall einer Abweichung bei der Kontrollwiederfindung festlegen.

| | Bestell-Nr. | Packungsgröße |
|--------------------------|------------------|---------------|
| TruLab HbA1c net Level 1 | 5 9930 99 10 076 | 6 x 1 mL |
| TruLab HbA1c net Level 2 | 5 9940 99 10 076 | 6 x 1 mL |

Leistungsmerkmale

Messbereich

Der Test hat einen Messbereich von 20 – 150 mmol/mol HbA1c nach IFCC (4 – 16 % nach NGSP/DCCT).

Der Test ist geeignet für eine Hämoglobinkonzentration von 6 – 30 g/dL (3,73 – 18,6 mmol/L) im Blut.

Spezifität/Interferenzen

Es wurde eine Studie gemäß des CLSI Dokuments EP7-A2 zu Interferenzen durchgeführt.

IFCC

Für jede störende Substanz wurden drei Proben mit unterschiedlichen Hämoglobin- und HbA1c-Werten getestet; eine niedrige Probe mit Hämoglobin-Werten von 8 – 10 g/dL und HbA1c-Werten von 28 – 35 mmol/mol; eine mittlere Probe mit Hämoglobin-Werten von 11 – 15 g/dL und HbA1c-Werten von 28 – 35 mmol/mol; eine hohe Probe mit Hämoglobin-Werten von 11 – 15 g/dL und HbA1c-Werten von > 60 mmol/mol.

DCCT/NGSP

Für jede störende Substanz wurden drei Proben mit unterschiedlichen Hämoglobin- und HbA1c-Werten getestet; eine niedrige Probe mit Hämoglobin-Werten von 9 – 10 g/dL und HbA1c-Werten von 4,7 – 5,4 %; eine mittlere Probe mit Hämoglobin-Werten von 10 – 15 g/dL und HbA1c-Werten von 4,7 – 5,4 %; eine hohe Probe mit Hämoglobin-Werten von 10 – 15 g/dL und HbA1c-Werten von > 7,65 %.

Die nachstehende Tabelle fasst die Ergebnisse für alle getesteten Levels zusammen. Sie gelten sowohl für die IFCC als auch für die DCCT/NGSP Standardisierung.

| Störende Substanz | Interferenzen < 10% in Serum mit Hämatokrit-Korrektur |
|--|---|
| Ascorbinsäure | bis 50 mg/dL |
| Bilirubin (konjugiert und unkonjugiert) | bis 10 mg/dL |
| Glukose | bis 1000 mg/dL |
| Hämoglobin, acetyliert | bis 10 mmol/L |
| Hämoglobin, carbamylisiert | bis 10 mmol/L |
| Lipemie (Triglyceride) bei < 11 g/dL Hämoglobin | bis 400 mg/dL |
| Lipemia (Triglyceride) bei > 11 g/dL Hämoglobin | bis 750 mg/dL |
| N-Acetylcystein (NAC) | bis 2000 mg/L |
| Harnstoff | bis 300 mg/dL |
| Harnsäure | bis 20 mg/dL |
| Alkoholisierung und die Einnahme hoher Dosen von Aspirin können die Werte beeinflussen. Weitere Informationen zu Interferenzen finden Sie bei Young DS [13]. | |

Hämoglobin-Varianten können zu abweichenden HbA1c-Ergebnissen führen. Die getesteten Hämoglobin-Varianten HbS, HbC, HbD, HbE, HbJ, HbG, HbSC, HbSE, HbEE und HbF zeigten keine signifikante Interferenz.

| Hämoglobin-Variante | Prozentanteil Hämoglobin-Variante (S) | Sollwertbereich HbA1c [% DCCT/NGSP] | Mittelwert Wiederfindung HbA1c [%] |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| AS | 40 % S | 5,2 – 8,8 | 94,7 |
| AC | 36 % C | 5,0 – 7,4 | 97,1 |
| AD | 41 % D | 5,6 – 7,0 | 93,9 |
| AE | 26 % E | 5,9 – 7,6 | 99,1 |
| AJ | 50 % J | 5,2 – 8,4 | 100 |
| AG | 20 % G | 6,1 – 6,6 | 97,4 |
| SC | 52 % S, 44 % C | 4,5 – 7,0 | 91,6 |
| SE | 65 % S, 27 % E | 7,4 | 95,4 |
| EE | 94 % E | 5,1 – 8,9 | 98,0 |
| Erhöhtes F | 4,6 % F | 6,5 – 8,1 | 93,6 |

Testempfindlichkeit/Nachweisgrenze

HbA1c: 0,2 g/dL

Hämoglobin: 1,5 g/dL

Impräzision

Werte nach IFCC (Hitachi 917)

| In der Serie n = 20 | Mittelwert [mmol/mol] | Standard- abweichung [mmol/mol] | VK [%] |
|------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------|
| Probe 1 | 29,5 | 0,556 | 1,88 |
| Probe 2 | 32,9 | 0,197 | 0,60 |
| Probe 3 | 63,5 | 0,447 | 0,70 |

| Totale Präzision CLSI n = 80 | Mittelwert [mmol/mol] | Standard- abweichung [mmol/mol] | VK [%] |
|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------|
| Probe 1 | 26,0 | 1,01 | 3,88 |
| Probe 2 | 32,5 | 1,23 | 3,78 |
| Probe 3 | 66,2 | 1,23 | 1,86 |

Methodenvergleich

Der Vergleich von DiaSys HbA1c net FS (y) mit einem immunturbidimetrischen Test (x) ergab mit 60 Proben folgende Ergebnisse (IFCC):

$$Y = 1,047 x - 0,782 \text{ mmol/mol}; r = 0,982$$

Der Vergleich von DiaSys HbA1c net FS (y) mit einem HPLC-Test (x) ergab mit 100 Proben folgende Ergebnisse (IFCC):

$$y = 1,031 x - 0,441 \text{ mmol/mol}; r = 0,989$$

Referenzbereich

Vorgeschlagene Referenzwerte für HbA1c [9]:

| | IFCC [mmol/mol] | NGSP [%] |
|-----------------------------|--------------------|-------------|
| Nicht diabetische Patienten | 20 – 42 | 4 – 6 |
| Therapieziel | < 53 | < 7 |
| Änderung der Therapie | > 64 | > 8 |

Jedes Labor sollte die Übertragbarkeit der Referenzbereiche für die eigenen Patientengruppen überprüfen und gegebenenfalls eigene Referenzbereiche ermitteln.

HbA1c-Grenzwert für die Diagnose von Diabetes Mellitus [14]:

Gemäß einer Empfehlung der Amerikanischen Diabetes-Vereinigung (ADA): $\geq 6,5$ % (NGSP) (48 mmol/mol (IFCC))

Patienten mit HbA1c-Werten im Bereich von 5,7 – 6,4 % HbA1c (NGSP) oder 39 – 46 mmol/mol HbA1c (IFCC) haben gegebenenfalls ein erhöhtes Risiko, an Diabetes zu erkranken.

Literatur

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. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th edition St. Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2006; p. 878-884.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Data on file at DiaSys Diagnostic Systems GmbH.
9. 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.
10. Nordin G., Dybkær R. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c". Clin Chem Lab Med 2007; 45(8): 1081-2.
11. Sacks DB. Translating Hemoglobin A1c into Average Blood Glucose: Implications for Clinical Chemistry. Clinical Chemistry 2008; 54: 1756-8.
12. Weykamp C. Carbamylated Hemoglobin Interference in Glycohemoglobin Assays. Clin Chem 1999; 45: 438-9.
13. 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.
14. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, AR Horvath et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2011; 57(6): e1-e47.
15. Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. ClinChemLabMed 2007;45(9):1240-1243.
16. Ferri S, Kim S, Tsugawa W, Sode K. Review of Fructosyl Amino Acid Oxidase Engineering Research: A Glimpse into the Future of Hemoglobin A1c Biosensing. Journal of Diabetes Science and Technology 2009; 3(3): 585-592.

Hersteller

DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Alte Straße 9 65558 Holzheim Deutschland