

# HbA1c FS\*

## Réactif de diagnostic *in vitro* pour la détermination quantitative de l'hémoglobine A1c (HbA1c) dans le sang total sur systèmes photométriques

### Présentation

Référence	Conditionnement
1 3348 99 10 930	R1 3 x 18 mL + R2 3 x 6 mL
1 4590 99 10 113	1 x 500 mL Solution hémolytante HbA1c net
1 3350 99 10 044	2 x 0,3 mL TruCal HbA1c net

### Intérêt clinique [1,2,3,11,14]

L'hémoglobine A1c (HbA1c) est une hémoglobine glyquée, générée par une réaction non enzymatique du glucose avec l'hémoglobine native. Ce processus se déroule en permanence, aussi longtemps qu'un érythrocyte se trouve dans la circulation sanguine (durée de vie des érythrocytes de 100 à 120 jours). L'ampleur de la glycation est directement proportionnelle à la concentration de glucose sanguin. La proportion d'HbA1c par rapport à l'hémoglobine totale représente environ le taux de glycémie moyen des 3 mois précédents. L'HbA1c sert par conséquent d'indicateur à long terme de la glycémie pour le contrôle rétrospectif de l'évolution du diabète sucré. Des études cliniques ont montré qu'un bon équilibre de la valeur de l'HbA1c peut empêcher ou retarder la survenue de séquelles diabétiques tardives. Le test de l'HbA1c sert également pour diagnostiquer le diabète mellitus. Etant donné que la quantité d'HbA1c dépend également de la quantité totale d'hémoglobine, le ratio d'HbA1c par rapport à l'hémoglobine totale est exprimé.

### Méthode

Hémoglobine :	Test photométrique
HbA1c :	Méthode enzymatique et colorimétrique

### Principe

Les concentrations de l'HbA1c et de l'hémoglobine sont mesurées séparément. Le ratio de l'HbA1c par rapport à l'hémoglobine totale se calcule à base des concentrations de l'HbA1c et de l'hémoglobine exclusivement.

#### Mesure de l'hémoglobine

Des spécimens de sang total sont hémolysés à l'aide de la solution hémolytante. L'hémoglobine totale est libérée à partir des érythrocytes. L'extinction de l'hémoglobine est déterminée à 570 nm après l'addition du réactif R1 et elle est proportionnelle à la concentration d'hémoglobine totale contenue dans le dosage.

#### Mesure de l'HbA1c [16]

Après l'addition du réactif 2, des dipeptides fructosylés de la partie N-terminale de la chaîne  $\beta$  d'hémoglobine sont libérés par des protéases. Du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est libéré après le détachement oxydatif des dipeptides fructosylés par le FPOX (fructosyl-peptide-oxydase). Ce  $H_2O_2$  généré est déterminé à 660 nm par analyse colorimétrique en réagissant avec un chromogène en présence de l'enzyme peroxydase. La croissance d'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'HbA1c.

### Standardisation

L'essai a été standardisé par rapport aux méthodes de référence approuvées IFCC [4] et DCCT/NGSP [7]. Le calcul des valeurs de contrôle et de ceux des patients est réalisable selon IFCC [mmol/mol] ainsi comme selon DCCT/NGSP [%].

Ces valeurs NGSP et IFCC montrent une relation linéaire et peuvent ainsi être calculées les unes en fonction des autres en utilisant la formule suivante :

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

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

a : Valeurs NGSP en %

b : Valeurs IFCC en mmol/mol

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

DCCT : Diabetes Control and Complications Trial [6]

NGSP : National Glycohemoglobin Standardization Program [7]

### Concentrations d'HbA1c et concentrations moyennes de Glucose [11]

En raison d'une corrélation linéaire entre l'hémoglobine A1c et les concentrations moyennes de glucose, les valeurs HbA1c peuvent être converties en valeurs moyennes estimées de glucose par les équations suivantes :

Standardisation selon IFCC (calculée selon la référence bibliographique [11]) :

$$\text{Conc. moyenne de glucose [mg/dL]} = 2,63 \times HbA1c^b + 15,01$$

$$\text{Conc. moyenne de glucose [mmol/L]} = 0,146 \times HbA1c^b + 0,829$$

b : Valeurs HbA1c en mmol/mol IFCC

Standardisation selon NGSP :

$$\text{Conc. moyenne de glucose [mg/dL]} = 28,7 \times HbA1c^a - 46,7$$

$$\text{Conc. moyenne de glucose [mmol/L]} = 1,59 \times HbA1c^a - 2,59$$

a : Valeurs HbA1c en % NGSP

Parmi les variations, aucune différence significative n'a été observée dans l'équation de régression lors des tests, en tenant compte notamment du sexe, de la présence ou non de diabète, du type de diabète, de l'âge, de la race ou de l'ethnie. Bien que cette équation puisse être utilisée pour la plupart des individus, chaque laboratoire doit vérifier si les équations de régression mentionnées sont applicables dans le groupe de patients à examiner.

### Réactifs

#### Composants et concentrations

R1 :	Tampon	100 mmol/L
	FPOX	$\geq 0,5$ kU/L
	Dérivé d'éthylène-glycol	< 10 %
R2 :	Tampon	20 mmol/L
	Protéase	$\geq 500$ kU/L
	Chromogène	$\geq 0,05$ mmol/L
	Dérivé d'éthylène-glycol	< 10 %

#### Conservation et stabilité des réactifs

Les réactifs, conservés entre +2 °C et +8 °C, sont stables jusqu'à la fin du mois de la date de péremption indiquée sur l'emballage en évitant toute contamination et évaporation. Ne pas congeler les réactifs et les conserver à l'abri de la lumière !

#### Préparation des réactifs

Les réactifs sont prêts à l'emploi.

Laisser revenir la solution hémolytante HbA1c net à température ambiante, puis l'homogénéiser avant l'utilisation par des inversions répétées. Du à la composition de la solution hémolytante, une turbidité légèrement opalescente persiste. Éviter la formation de mousse! Ne pas agiter!

#### Avertissements et précautions d'emploi

- Les réactifs contiennent du matériel d'origine biologique. Manier le produit comme potentiellement infectieux selon les précautions universelles et de bonne pratique de laboratoire.
- Des valeurs de l'hémoglobine et de l'HbA1c en g/dL déterminées avec HbA1c net FS de DiaSys sont seulement employés pour calculer le ratio de l'HbA1c FS à base de l'hémoglobine totale. Ne pas utiliser les résultats individuels d'hémoglobine totale et d'HbA1c pour le diagnostic !
- Des valeurs faussement basses (HbA1c basse malgré une glycémie élevée) peuvent survenir dans le cas d'affections liées à une réduction de la durée de vie des érythrocytes (certaines affections hématologiques) ou dans le cas d'une perte sanguine importante au cours des semaines précédentes (proportion plus élevée de jeunes érythrocytes). Des valeurs faussement élevées (HbA1c élevée malgré une glycémie normale) ont été observées dans le cas d'anémie ferriprive (proportion élevée de vieux érythrocytes). De telles affections doivent être prises en compte lors de l'interprétation clinique des valeurs de l'HbA1c. La prudence s'impose également lors de l'interprétation clinique des résultats de l'HbA1c venant des patients avec des variantes d'hémoglobine.
- Dans de très rares cas, des spécimens de patients souffrant de gammopathie peuvent produire des valeurs erronées [15].
- La N-acétylcystéine (NAC), l'acétaminophène et les médicaments à base de métamizole, conduisent aux résultats faussement bas dans les spécimens de patients.
- Merci de vous référer aux fiches de sécurité et prendre les précautions nécessaires pour l'utilisation de réactifs de laboratoire. Pour le diagnostic, les résultats doivent toujours être exploités en fonction de l'historique médical du patient, des examens cliniques ainsi que des résultats obtenus sur d'autres paramètres.
- Uniquement à usage professionnel !

## Élimination des déchets

Se référer aux exigences légales nationales.

## Matériels requis mais non fournis

Équipement général de laboratoire

## Spécimen

Sang total recueilli sur EDTA

Prélever le sang total par prise du sang standardisée et remplir le tube de prélèvement selon les spécifications du producteur.

## Stabilité des spécimens [8]

Sang total	1 semaine	entre	+2 et +8 °C
Hémolysât	1 heure	entre	+15 et +25 °C

Éliminer les spécimens contaminés.

## Préparation du matériel d'essai

La solution hémolysante DiaSys HbA1c net est indispensable pour la préparation des spécimens. Hémolysé le calibrant, les contrôles et les spécimens avant l'utilisation. Utiliser le matériel hémolysé pendant l'heure qui suit la préparation. Le traitement en mode batch est recommandé. En cas d'hémolyse manuelle, se référer au schéma de pipetage ci-dessous :

	Préparation			
	Calibrant Niveau 1	Calibrant Niveau 2	Contrôle	Spécimen
TruCal HbA1c net Niveau 1	16 µL	-	-	-
TruCal HbA1c net Niveau 2	-	50 µL	-	-
TruLab HbA1c net Niveau 1 et 2/ Échantillon	-	-	50 µL	50 µL
Rajouter				
HbA1c net Solution hémolysante	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Mélanger et laisser reposer 1 minute. L'hémolyse est complète après une minute. Dû à la composition de la solution hémolysante, une turbidité légère subsistera.				

## Mode opératoire

Des notices d'application spécifiques aux systèmes automatisés sont disponibles sur demande. Se référer au distributeur.

Paramètre de base pour Hitachi 917 avec application TWIN et l'hémolyse manuelle du calibrant, de la contrôle et du dosage.

## Détermination de l'hémoglobine

Longueur d'onde (Prim./Second.)	570/800 nm (bi-chromatique)
Température	+37 °C
Type de mesure	TWIN test/ détermination point 3
Spécimen/Calibrants	30 µL
Réactif 1	180 µL
Réactif 2	60 µL
Ajout Réactif 2	Cycle 15
Absorbance	Cycle 15
Calibration	Linéaire

## Détermination de l'HbA1c

Longueur d'onde (Prim./Second.)	660/800 nm (bi-chromatique)
Température	+37 °C
Type de mesure	TWIN test/ détermination point 3
Spécimen/Calibrants	30 µL
Réactif 1	180 µL
Réactif 2	60 µL
Ajout Réactif 2	Cycle 15
Absorbance 1	Cycle 18
Absorbance 2	Cycle 34
Calibration	Linéaire

## Calibration

Les concentrations d'HbA1c et d'hémoglobine des échantillons inconnus sont calculés à partir des courbes de calibrations linéaires. Chaque courbe de calibration est établie à l'aide de deux calibrants de niveaux différents sans valeur zéro.

Stabilité de calibration : 6 semaines

## Calcul

Après l'introduction de la formule de calcul dans l'analyseur, le calcul du ratio de l'HbA1c et de l'hémoglobine totale s'effectue automatiquement. Voir manuel d'utilisation du système.

Selon le type de standardisation choisi, saisir une des formules suivantes:

### IFCC

Valeurs en mmol/mol conforme à l'IFCC :

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

### DCCT/NGSP

Valeurs en pour cent d'après NGSP :

$$\text{HbA1c [%]} = \left( 915 \times \frac{\text{HbA1c [g/dL]}}{\text{Hb [g/dL]}} \right) + 2,15$$

## Calibrants et contrôles

Le calibrant TruCal HbA1c net de DiaSys est recommandé pour la calibration. Les valeurs des calibrants sont traçables à la méthode de référence approuvée IFCC [4]. Il est recommandé d'utiliser le contrôle DiaSys TruLab HbA1c net pour le contrôle de qualité interne. Chaque laboratoire établira la procédure à suivre si les résultats se situent en dehors des limites de confiance.

	Référence	Taille coffret
TruLab HbA1c net Niveau 1	5 9930 99 10 076	6 x 1 mL
TruLab HbA1c net Niveau 2	5 9940 99 10 076	6 x 1 mL

## Performances

### Domaine de mesure

Le test a un domaine de mesure de 20 à 150 mmol/mol d'HbA1c selon IFCC (4 – 16 % selon NGSP/DCCT).

Le test convient à une concentration d'hémoglobine totale de 6 à 30 g/dL (3,73 – 18,6 mmol/L).

### Spécificité/Interférences

Une étude sur les interférences a été conduit selon le protocole EP7-A2 CLSI.

### IFCC

Pour chaque substance interférante, trois échantillons ayant des valeurs différentes d'hémoglobine et d'HbA1c ont été testés ; un échantillon de bas niveau d'un intervalle de 8 à 10 g/dL d'hémoglobine et d'un intervalle d'HbA1c de 28 à 35 mmol/mol ; un échantillon de moyen niveau dans l'intervalle de 11 à 15 g/dL d'hémoglobine et d'un intervalle d'HbA1c de 28 à 35 mmol/mol ; un échantillon de niveau élevé dans l'intervalle de 11 à 15 g/dL d'hémoglobine et d'un intervalle d'HbA1c de > 60 mmol/mol.

### DCCT/NGSP

Pour chaque substance interférante, trois échantillons ayant des valeurs différentes d'hémoglobine et d'HbA1c ont été testés ; un échantillon de bas niveau d'un intervalle de 9 à 10 g/dL d'hémoglobine et d'un intervalle d'HbA1c de 4,7 à 5,4 % ; un échantillon de moyen niveau dans l'intervalle de 10 à 15 g/dL d'hémoglobine et d'un intervalle d'HbA1c de 4,7 à 5,4 % ; un échantillon de niveau élevé dans l'intervalle de 10 à 15 g/dL d'hémoglobine et d'un intervalle d'HbA1c de > 7,65 %.

Le tableau ci-dessous regroupe les résultats qui conviennent pour chaque niveau standardisé soit selon IFCC soit selon DCCT/NGSP.

Substance interférante	Interférences < 10% dans le sérum avec correction de l'hématocrite
Acide ascorbique	jusqu'à 50 mg/dL
Bilirubine (conjuguée et non conjuguée)	jusqu'à 10 mg/dL
Glucose	jusqu'à 1000 mg/dL
Hémoglobine, acétylée	jusqu'à 10 mmol/L
Hémoglobine, carbamylée	jusqu'à 10 mmol/L
Lipémie (triglycérides) à < 11 g/dL de l'hémoglobine	jusqu'à 400 mg/dL
Lipémie (triglycérides) à > 11 g/dL d'hémoglobine	jusqu'à 750 mg/dL
NAC (N-acétylcystéine)	jusqu'à 2000 mg/L
Urée	jusqu'à 300 mg/dL
Acide urique	jusqu'à 20 mg/dL
L'alcoolémie et la prise de doses élevées d'aspirine peuvent induire des résultats erronés. Pour plus d'information au sujet des interférences, voir Young DS [13].	

Les variantes de l'hémoglobine peuvent provoquer des résultats erronés. Les variantes de l'hémoglobine testées (HbS, HbC, HbD, HbE, HbJ, HbG, HbSC, HbSE, HbEE et HbF) n'ont pas démontré des interférences significatives.

Variante de l'hémoglobine	Variante du pourcentage de l'hémoglobine (≤)	Intervalle de la valeur titrée de l'HbA1c [% DCCT/NGSP]	Valeur moyenne d'exactitude de l'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
F élevé	4,6 % F	6,5 – 8,1	93,6

#### Sensibilité/Limite de détection

HbA1c : 0,2 g/dL

Hémoglobine : 1,5 g/dL

#### Imprécision

Valeurs selon IFCC (Hitachi 917)

Intra série n = 20	Moyenne [mmol/mol]	SD [mmol/mol]	CV [%]
Echantillon 1	29,5	0,556	1,88
Echantillon 2	32,9	0,197	0,60
Echantillon 3	63,5	0,447	0,70

Précision totale CLSI n = 80	Moyenne [mmol/mol]	SD [mmol/mol]	CV [%]
Echantillon 1	26,0	1,01	3,88
Echantillon 2	32,5	1,23	3,78
Echantillon 3	66,2	1,23	1,86

#### Comparaison de méthodes

Une comparaison de la méthode HbA1c net FS de DiaSys (y) à une méthode immunoturbidimétrique (x), réalisée sur 60 échantillons, a donné les résultats suivants (selon IFCC) :

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

Une comparaison de la méthode HbA1c net FS de DiaSys (y) à une méthode HPLC (x), réalisée sur 100 échantillons, a donné les résultats suivants (selon IFCC) :

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

#### Valeurs usuelles

Valeurs de références recommandées pour HbA1c [9] :

	IFCC [mmol/mol]	NGSP [%]
Patients non-diabétiques	20 – 42	4 – 6
Objectif de la thérapie	< 53	< 7
Modification de la thérapie	> 64	> 8

Chaque laboratoire devrait vérifier si les valeurs usuelles sont transmissibles à sa propre population patiente et déterminer ses propres valeurs de référence si besoin.

#### Valeur limite de l'HbA1c pour le diagnostic du diabète mellitus [14] :

Selon la recommandation de l'Association Américaine du Diabète (American Diabetes Association/ADA): ≥ 6,5 % (NGSP) (48 mmol/mol (IFCC))

Des patients montrant des valeurs de l'HbA1c dans un domaine de 5,7 – 6,4 % (NGSP) ou de 39 à 46 mmol/mol HbA1c (IFCC) courent un risque élevé de développer du diabète.

#### Références bibliographiques

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. 3<sup>rd</sup> 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.

#### Fabricant



DiaSys Diagnostic Systems GmbH  
Alte Strasse 9 65558 Holzheim (Allemagne)