

**HbA<sub>1c</sub> MonlabTest®**

Turbidimetría Látex.



**Determinación cuantitativa de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>) en sangre humana**

Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*. Conservar a 2-8°C.

**PRINCIPIO DEL MÉTODO**

Este método utiliza la interacción de antígeno y anticuerpo para determinar directamente HbA<sub>1c</sub> en sangre total. La hemoglobina total y HbA<sub>1c</sub> tienen la misma absorción inespecífica para las partículas de látex. Cuando se añade el anticuerpo monoclonal anti-HbA<sub>1c</sub> (ratón) (R2), se forma el complejo látex -HbA<sub>1c</sub>- anticuerpo HbA<sub>1c</sub> de ratón. Se produce aglutinación cuando el anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón interacciona con el anticuerpo monoclonal. La cantidad de aglutinación es proporcional a la cantidad de HbA<sub>1c</sub> absorbida en la superficie de las partículas de látex. La cantidad de aglutinación se mide como absorbancia. El valor de HbA<sub>1c</sub> se obtiene de la curva de calibración.

**SIGNIFICADO CLÍNICO**

A lo largo de la vida circulatoria de los hematíes, se forma continuamente hemoglobina A<sub>1c</sub>, por la adición de glucosa al grupo N-terminal de la cadena beta de la hemoglobina. Este proceso, que es no enzimático, refleja la exposición media de hemoglobina a glucosa durante un periodo prolongado. En un estudio clásico, Trivelli et al<sup>1</sup> mostró que la Hemoglobina A<sub>1c</sub> se incrementa 2-3 veces en individuos con diabetes en comparación con individuos normales. Varios investigadores han recomendado que Hemoglobina A<sub>1c</sub> sirve como indicador del control metabólico de diabéticos, ya que los niveles de Hemoglobina A<sub>1c</sub> alcanzan valores normales para diabéticos en control metabólico.<sup>2,3,4</sup> La Hemoglobina A<sub>1c</sub> se ha definido como la 'fracción rápida' de hemoglobina (HbA<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>, A<sub>1c</sub>) que eluye la primera en una cromatografía de columna con resinas de intercambio catiónico. La hemoglobina no-glicosilada, que consiste en la mayor parte de hemoglobina, se ha designado como HbA<sub>0</sub>. Este procedimiento utiliza una reacción antígeno-anticuerpo para determinar directamente la concentración de HbA<sub>1c</sub>.

**REACTIVOS**

<b>R1</b>	Látex 0,13%, Tampón, estabilizante.
<b>R2</b>	Anticuerpo monoclonal anti-HbA <sub>1c</sub> (ratón) 0.05 mg/mL, anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón 0.08 mg/dL, tampón, estabilizantes.
<b>R3 (Reactivo hemolizante)</b>	Agua y estabilizantes
<b>Opcional</b>	Calibrador HbA <sub>1c</sub> (4 niveles) MonlabTest – (MO-165061) Control HbA <sub>1c</sub> (2 niveles) MonlabTest – (MO-165062)

**PRECAUCIONES**

Todas las muestras humanas se deben tratar como potencialmente biopeligrosas. Por tanto, se deben usar las precauciones universales de tratamiento de muestras (guantes, vestimenta de laboratorio, evitar producción de aerosoles, etc.).

**PREPARACIÓN**

R1, R2 y R3 están listos para su uso. Mezclar suavemente antes de usar.

**CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD**

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad. R1 y R2 una vez abiertos son estables durante al menos 1 mes si se conservan a 2-8°C.

**Indicadores de deterioro de los reactivos:** Alteraciones en el aspecto físico de los reactivos o valores de los controles fuera del rango establecido.

**MATERIAL ADICIONAL**

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 660nm.
- Equipamiento habitual de laboratorio<sup>(Nota 1)</sup>.

**MUESTRAS**

No es necesaria una preparación especial del paciente, ni condiciones de alimentación específicas. No se requiere de otros aditivos ni conservantes especiales aparte de anticoagulantes. Recoger la sangre venosa con EDTA usando técnicas asépticas. HbA<sub>1c</sub> en sangre total recogida con EDTA es estable durante 1 semana a 2-8°C.<sup>5</sup>

Para determinar HbA<sub>1c</sub>, se debe preparar un hemolizado para cada muestra:

1. Dispensar 1 mL de Reactivo hemolizante en tubos etiquetados: Calibrador, Control, pacientes, etc. Nota: Son válidos tubos de plástico o vidrio de tamaño apropiado.
2. Colocar 20 µL de sangre total bien mezclada en el tubo correctamente etiquetado. Mezclar.
3. Dejar reposar durante 5 minutos o hasta que sea evidente la lisis completa. Los hemolizados se pueden conservar durante 10 días a 2-8°C.

**PROCEDIMIENTO**

1. Llevar el R1, el R2 y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.
2. Condiciones de ensayo:  
Longitud de onda: ..... 660 nm (600 – 660)  
Temperatura: ..... 37°C  
Paso de luz de la cubeta: ..... 1 cm
3. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
4. Pipetear en una cubeta<sup>(Nota2)</sup>:

R1 (µL)	360
Calibrador o muestra (µL)	10

5. Mezclar e incubar 5 minutos.
6. Pipetear en la misma cubeta:

R2 (µL)	120
---------	-----

7. Mezclar y leer la absorbancia (A) a los 5 minutos de la adición del Reactivo R2.

**CÁLCULOS**

**Concentración HbA<sub>1c</sub> (%)**

Representar la absorbancia (A) obtenida frente a las concentraciones de HbA<sub>1c</sub> de cada Calibrador (del 1 al 4). El porcentaje de HbA<sub>1c</sub> en la muestra se calcula por interpolación de su absorbancia (A) en la curva de calibración.

**CONTROL DE CALIDAD**

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. MONLAB dispone de sueros Control HbA<sub>1c</sub> MonlabTest (MO-165062). **Los Controles, una vez reconstituidos, precisan de un tratamiento hemolizante antes de su uso.** Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

**VALORES DE REFERENCIA<sup>11</sup>**

Valores recomendados: inferior a 6 % para no-diabéticos, inferior a 7% para control glicémico de persona con diabetes.

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. En el uso de Hemoglobina A<sub>1c</sub> para el control de pacientes diabéticos, los resultados se deben interpretar individualmente. Significa que el paciente se debe controlar frente a él mismo. Hay un intervalo de tiempo de 3-4 semanas antes que Hemoglobina A<sub>1c</sub> refleje cambios en el nivel de glucosa en sangre.

**CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO**

**Rango de medida:** Desde el límite de detección de 2% hasta el límite de linealidad de 16%.

**Precisión:**

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (%)	5,95	12,15	5,97	12,21
SD	0,19	0,18	0,14	0,15
CV (%)	3,20	1,47	2,31	1,24

**Sensibilidad analítica:** 1% = 0,056 (A)

**Exactitud:** Los reactivos MonlabTest (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 40 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)<sup>2</sup>: 0,995

Ecuación de la recta de regresión: y=0,989x - 0,047.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

**INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES**

1. Bilirrubina hasta 50mg/dL, ácido ascórbico hasta 50mg/dL, triglicéridos hasta 2000mg/dL, Hb carbamylada hasta 7,5mmol/L y Hb acetilada hasta 5,0mmol/L no interfieren en el ensayo.
2. Los resultados pueden ser inconsistentes en pacientes con las siguientes condiciones: adicción de opiáceos, envenenamiento por plomo, alcoholismo, grandes ingestas de aspirina.<sup>6,7,8,9</sup>
3. Se ha demostrado que valores elevados de HbF pueden conducir a una infravaloración de HbA<sub>1c</sub>, y que la uremia no interfiere con la determinación de HbA<sub>1c</sub> por inmunoensayo.<sup>10</sup> También se ha demostrado que intermediarios lábiles (base Schiff) no son detectados y no interfieren con la determinación de HbA<sub>1c</sub> por inmunoensayo.<sup>5</sup>
4. Se ha determinado que las variantes de Hemoglobina HbA<sub>2</sub>, HbC y HbS no interfieren con este método.
5. No se han evaluado otras variantes raras de hemoglobina (ej. HbE).

**NOTAS**

1. Para evitar la contaminación, se recomienda el uso de material desechable.
2. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
3. MONLAB dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., 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. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
5. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
6. Ceriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1982).
7. Little, R.R., et al, Clin. Chem. 32, pp. 358-360 (1986).
8. Fluckiger, R., et al, New Eng.J. Med. 304 pp. 823-827 (1981).
9. Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, pp. 466-469 (1983).
10. Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
11. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24 (Suppl. 1): S33-S55, (2001).

**PRESENTACIÓN**

MO-165035	R1: 1 x 30 mL
	R2: 1 x 10 mL
	R3: 1 x 125 mL

**SÍMBOLOS UTILIZADOS PARA COMPONENTES Y REACTIVOS IVD**

	Fabricante		Uso de diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar		Consultar las instrucciones de uso
	Contiene suficiente para <n> test		Mantener seco
	Código		Límite de temperatura
	Número de lote		Fecha de caducidad



**HbA<sub>1c</sub> MonlabTest®**  
Latex Turbidimetry



**Quantitative determination of glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in human blood.**  
Only for professional *in vitro* diagnostic use. Store at 2-8°C.

**PRINCIPLE OF THE METHOD**

This method utilizes the interaction of antigen and antibody to directly determine the HbA<sub>1c</sub> in whole blood. Total hemoglobin and HbA<sub>1c</sub> have the same unspecific absorption rate to latex particles. When mouse antihuman HbA<sub>1c</sub> monoclonal antibody is added (R2), latex-HbA<sub>1c</sub>-mouse anti human HbA<sub>1c</sub> antibody complex is formed. Agglutination is formed when goat anti-mouse IgG polyclonal antibody interacts with the monoclonal antibody. The amount of agglutination is proportional to the amount of HbA<sub>1c</sub> absorbed on to the surface of latex particles. The amount of agglutination is measured as absorbance. The HbA<sub>1c</sub> value is obtained from a calibration curve.

**CLINICAL SIGNIFICANCE**

Throughout the circulatory life of the red cell, Hemoglobin A<sub>1c</sub> is formed continuously by the addition of glucose to the N-terminal of the hemoglobin beta chain. This process, which is non-enzymatic, reflects the average exposure of hemoglobin to glucose over an extended period. In a classical study, Trivelli et al<sup>1</sup> showed Hemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetic subjects to be elevated 2-3 fold over the levels found in normal individuals. Several investigators have recommended that Hemoglobin A<sub>1c</sub> serve as an indicator of metabolic control of the diabetic, since Hemoglobin A<sub>1c</sub> levels approach normal values for diabetics in metabolic control.<sup>2,3,4</sup> Hemoglobin A<sub>1c</sub> has been defined operationally as the "fast fraction" hemoglobins (HbA<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub>, A<sub>1c</sub>) that elute first during column chromatography with cation-exchange resins. The non-glycosylated hemoglobin, which consists of the bulk of the hemoglobin has been designated HbA<sub>0</sub>. The present procedure utilizes an antigen and antibody reaction to directly determine the concentration of the HbA<sub>1c</sub>.

**REAGENTS**

<b>R1</b>	Latex 0.13%, Buffer, stabilizer.
<b>R2</b>	Mouse anti-human HbA <sub>1c</sub> monoclonal antibody 0.05mg/mL, goat anti-mouse IgG polyclonal antibody 0.08mg/dL, Buffer, stabilizers.
<b>R3 (Hemolysis reagent)</b>	Water and stabilizers
<b>Optional</b>	HbA <sub>1c</sub> Calibrator (4 levels) MonlabTest – (MO-165061) HbA <sub>1c</sub> Control (2 levels) MonlabTest – (MO-165062)

**PRECAUTIONS**

All human specimens should be regarded as potentially biohazardous. Therefore, universal precautions should be used in specimen handling (gloves, lab garments, avoid aerosol production, etc.).

**PREPARATION**

R1, R2 and R3 are ready to use. Mix gently before use.

**STORAGE AND STABILITY**

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

R1 and R2 are stable for at least one month after opening stored at 2-8°C.

**Reagent deterioration:** Alterations in the physical appearance of the reagents or values of control materials outside of the manufacturer's acceptable range may be an indication of reagent instability.

**ADDITIONAL EQUIPMENT**

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 660 nm filter.
- General laboratory equipment (Note 1)

**SAMPLES**

Special preparation of the patient is unnecessary. Fasting specimens are not required. No special additives or preservatives other than anticoagulants are required. Collect venous blood with EDTA using aseptic technique. HbA<sub>1c</sub> in whole blood collected with EDTA is stable for one week at 2-8°C.<sup>5</sup>

To determine HbA<sub>1c</sub>, a hemolysate must be prepared for each sample:

1. Dispense 1 mL Hemolysis Reagent into tubes labeled: Calibrator, Control, Patients, etc. Note: Plastic or glass tubes of appropriate size are acceptable.
2. Place 20 µL of well mixed whole blood into the appropriately labeled lyse reagent tube. Mix.
3. Allow to stand for 5 minutes or until complete lysis is evident. Hemolysates may be stored up to 10 days at 2-8°C

**PROCEDURE**

1. Assay conditions:  
Wavelength: ..... 660 nm (600-660)  
Temperature: ..... 37°C  
Cuvette lighth path: ..... 1 cm
2. Adjust the instrument to zero with distilled water.
3. Pipette into a cuvette (Note 2):

R1 (µL)	360
Calibrator or sample (µL)	10

4. Mix and incubate 5 minutes.
5. Pipette into the cuvette:

R2 (µL)	120
---------	-----

6. Mix and read the absorbance after 5 minutes (A) of the R2 addition.

**CALCULATIONS**

**HbA<sub>1c</sub> concentration (%)**

Plot (A) obtained against the HbA<sub>1c</sub> concentration of each calibrator (1 to 4 Level). HbA<sub>1c</sub> percentage in the sample is calculated by interpolation of its absorbance (A) in the calibration curve.

**QUALITY CONTROL**

HbA<sub>1c</sub> Control MonlabTest (MO-165062) is recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. **Controls require hemolysis pretreatment after being reconstituted.**

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

**REFERENCE VALUES<sup>11</sup>**

Recommended Values: less than 6% for a non-diabetic, less than 7% for glycemic control of a person with diabetes.

Each laboratory should establish its own expected values. In using Hemoglobin A<sub>1c</sub> to monitor diabetic patients, results should be interpreted individually. That is, the patient should be monitored against him or herself. There is a 3-4 week time lag before Hemoglobin A<sub>1c</sub> reflects changes in blood glucose level.

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**Measuring range:** From detection limit of 2% to linearity limit of 16%.%

**Precision:**

Mean (%)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	5,95	12,15	5,97	12,21
SD	0,19	0,18	0,14	0,15
CV (%)	3,20	1,47	2,31	1,24

**Sensitivity:** 1% = 0,056 (A)

**Accuracy:** Results obtained using MonlabTest reagents (y) did not show differences when compared with another commercial reagent (x). The results obtained using 40 samples were the following:

Correlation coefficient (r)<sup>2</sup> 0,995

Regression equation: y = 0,989x - 0,047

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

**INTERFERENCES AND LIMITATIONS**

1. Bilirubin to 50mg/dL, ascorbic acid to 50mg/dL, triglycerides to 2000mg/dL, carbamylated Hb to 7.5mmol/L and acetylated Hb to 5.0mmol/L do not interfere in this assay.
2. It has been reported that results may be inconsistent in patients who have the following conditions: opiate addiction, lead-poisoning, alcoholism, ingest large doses of aspirin.<sup>6,7,8,9</sup>
3. It has been reported that elevated levels of HbF may lead to underestimation of HbA<sub>1c</sub> and, that uremia does not interfere with HbA<sub>1c</sub> determination by immunoassay.<sup>10</sup> It has been reported that labile intermediates (Schiff base) are not detected and therefore, do not interfere with HbA<sub>1c</sub> determination by immunoassay.<sup>5</sup>
4. It has been determined that Hemoglobin variants HbA<sub>2</sub>, HbC and HbS do not interfere with this method.
5. Other very rare variants of hemoglobin (e.g. HbE) have not been assessed.

**NOTES**

1. In order to avoid contamination, it is recommended to use disposable material.
2. Use clean disposable pipette for its dispensation.
3. MONLAB instruction sheets for several automatic analyzers.

**BIBLIOGRAPHY**

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., 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. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
5. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
6. Ceriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1982).
7. Little, R.R., et al, Clin. Chem. 32, pp. 358-360 (1986).
8. Fluckiger, R., et al, New Eng.J. Med. 304 pp. 823-827 (1981).
9. Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, pp. 466-469 (1983).
10. Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
11. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24 (Suppl. 1): S33-S55, (2001).

**PACKAGING**

MO-165035	R1: 1 x 30 mL
	R2: 1 x 10 mL
	R3: 1 x 125 mL

**SYMBOLS FOR IVD COMPONENTS AND REAGENTS**

- |  |                                   |  |                                         |
|--|-----------------------------------|--|-----------------------------------------|
|  | Manufacturer                      |  | For <i>in vitro</i> diagnostic use only |
|  | Don't re-use                      |  | Consult instructions for use            |
|  | Contains sufficient for <n> tests |  | Keep dry                                |
|  | Catalogue Code                    |  | Temperature limitation                  |
|  | Lot Number                        |  | Use by                                  |

