



clinical reagent specialists

EMOGLOBINA GLICATA (HbA_{1c})

MANUALE D'ISTRUZIONE

Codice 22270

USO

Dispositivo medico-diagnostico in vitro, spettrofotometrico, per la determinazione quantitativa dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) nel sangue intero umano. La determinazione dell'emoglobina A_{1c} viene eseguita in relazione alla valutazione ed al controllo del metabolismo glucidico nei soggetti diabetici. La concentrazione dell'HbA_{1c} nel sangue è direttamente correlabile con i livelli di glicemia raggiunti nelle 4-8 settimane precedenti il dosaggio. Un valore elevato di HbA_{1c} depone a favore di scarso controllo della patologia diabetica.

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo descritto impiega il principio della reazione antigene-anticorpo per determinare direttamente l'emoglobina glicata (HbA_{1c}) nel campione di sangue intero, attraverso una procedura completamente automatizzata.

L'emoglobina totale e la componente glicata possiedono la medesima affinità (aspecifica) per il legame con particelle di lattice; dopo aggiunta al sistema reattivo di anticorpi monoclonali murini anti-HbA_{1c} (R2), si forma l'immunocomplesso lattice-HbA_{1c}-Ab. L'agglutinazione finale si realizza quando gli anticorpi policlonali di capra anti-IgG, presenti anch'essi nella miscela di reazione, si legano all'anticorpo monoclonale dell'immunocomplesso. L'entità dell'agglutinazione è direttamente proporzionale alla quota di HbA_{1c} adsorbita alla superficie delle particelle di lattice. L'agglutinazione viene misurata in assorbanza: la percentuale di HbA_{1c} viene determinata utilizzando una curva di calibrazione.

COMPOSIZIONE DEL KIT

R1: 30 mL tampone glicina 20 mmol/L, sospensione di particelle di lattice 0.13%.

R2a: 9.5 mL tampone glicina 80 mmol/L

R2b: 0.5 mL anticorpi monoclonali murini anti-HbA_{1c} 0.05 mg/dl, anticorpi policlonali di capra anti-IgG 0.08 mg/dl, stabilizzanti

Reagente emolizzante: 125 mL acqua e stabilizzanti

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Conservare a 2-8°C.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Il reagente emolizzante ed R1 sono forniti liquidi pronti all'uso. R2 deve essere preparato aggiungendo l'intero contenuto del flacone R2b nel flacone contenente R2a: mescolare delicatamente.

INDICATORI DI DETERIORAMENTO

Alterazioni dell'aspetto fisico dei reagenti, o risultati del controllo di qualità al di fuori degli intervalli stabiliti dal produttore, possono essere in relazione con instabilità o deterioramento del materiale reagente.

STRUMENTAZIONE ANALITICA

Fare riferimento all'applicazione specifica per lo strumento utilizzato nel Vs. Laboratorio (le applicazioni relative sono fornibili a richiesta)

PRECAUZIONI

1. Per uso diagnostico esclusivamente *in vitro*
2. Non utilizzare mai su soggetti umani o animali

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Non è necessaria alcuna preparazione del paziente; il prelievo può essere effettuato anche su soggetti non a digiuno. Utilizzare, per il prelievo venoso asettico, provette contenenti esclusivamente EDTA quale anticoagulante (non sono richiesti particolari additivi o stabilizzanti).

Tutti i campioni biologici impiegati devono essere considerati POTENZIALMENTE INFETTI e, come tali, manipolati secondo la B.P.L., evitando la produzione di aerosol, indossando guanti, camice e calzature adatte

Preparazione dell'emolisato: per determinare l'HbA_{1c} è necessario preliminarmente emolizzare ciascun campione, secondo la procedura descritta

1. Dispensare 1 ml di reagente emolizzante in ciascuna provetta (in plastica o vetro) contrassegnata come: Controllo, ID campione ecc.
2. Introdurre 20 µl di sangue intero ben omogenato nella corrispondente provetta di emolisi: mescolare
3. Lasciare reagire per 5 minuti e, comunque, fino alla completa lisi del campione. L'emolisato può essere conservato fino a 10 giorni a 2-8°C.

STABILITÀ DEI COMPONENTI

1. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, purché conservati ben chiusi ed evitandone la contaminazione durante l'uso. Non utilizzare mai oltre la data di scadenza
2. R2 (R2a+R2b) è stabile fino ad un mese se conservato a 2-8°C
3. L'emoglobina glicata (HbA_{1c}) in sangue intero con EDTA è stabile per circa 1 settimana a 2-8°C⁵

INTERFERENZE

1. La bilirubina (≤50 mg/dL), l'acido ascorbico (≤50 mg/dL), i trigliceridi (≤2000 mg/dL), l'Hb carbamidata (≤7.5 mmol/L) e acetilata (≤5.0 mmol/L) non interferiscono.
2. Sono stati riscontrati risultati incongruenti nelle seguenti condizioni: soggetti che avevano assunto oppiacei, intossicati da piombo, trattati con dosi elevate di acido acetil-salicilico^{6,7,8,9} ed etilisti.
3. Elevati livelli di HbF possono provocare sovrastima dell'aHbA_{1c} mentre l'uremia non interferisce nell'immunodosaggio dell'emoglobina glicata.¹⁰
4. Da studi effettuati, si è potuto accertare che le varianti emoglobiniche S e A2 (HbS e HbA2) non vengono rilevate con il presente metodo e, pertanto, non alterano i risultati. Inoltre, si è potuto verificare che le molecole intermedie labili (basi di Schiff) non vengono dosate e, conseguentemente, non interferiscono.
5. Altre rare varianti emoglobiniche (HbE, ecc.) non sono state sottoposte a valutazione

ACCESSORI NECESSARI NON FORNITI A CORREDO

- Micropipette in grado di dispensare 20µl e 1 ml
- Provette in grado di contenere 1.02 ml
- HbA_{1c} Calibrator Set (cod.22270CAL) HbA_{1c} Control Set (cod. 22270CTL)

PROCEDURA ANALITICA

(Esempio: application su Autoanalizzatore Hitachi 717)

TEST NAME	HbA _{1c}
ASSAY CODE	[1-POINT]:[50]-[0]
SAMPLE VOLUME	[5] [3]
R1 VOLUME	[180] [50] [NO]
R2 VOLUME	[60] [20] [NO]
WAVELENGTH	[] [660]
CALIBRATION	[NONLINEAR] [4] [5]
STD (1) CONC-POS	[0.0*] [1]
TD (2) CONC-POS	[**] [2]
STD (3) CONC-POS	[**] [3]
STD (4) CONC-POS	[**] [4]
STD (5) CONC-POS	[**] [5]
STD (6) CONC-POS	-
SD LIMIT	[999]

DUPLICATE LIMIT	[1000]
SENSITIVITY LIMIT	[0]
ABS LIMIT (INC/DEC)	[32000] [INCREASE]
PROZONE LIMIT	[-] [-]
EXPECTED VALUE	[-] [-]
PANIC VALUE	[-] [-]
INSTRUMENT FACTOR	[1.0]

* Utilizzare soluzione fisiologica per il Calibratore 0.0

** Inserire il valore relativo a ciascun calibratore utilizzato

Hitachi 717TM è un Marchio Registrato della Nissei Sangyo Co. Ltd., Giappone

LIMITI DEL METODO

- Questo test non può essere utilizzato per diagnosticare un diabete mellito
- I campioni clinici devono essere sempre analizzati impiegando la curva di calibrazione

CONTROLLO DI QUALITÀ

Si raccomanda l'utilizzo dell'emolisato di controllo HbA1c Control Set (cod. 22270CTL), Livello 1 e 2 ad ogni seduta analitica, per verificare la qualità della procedura.

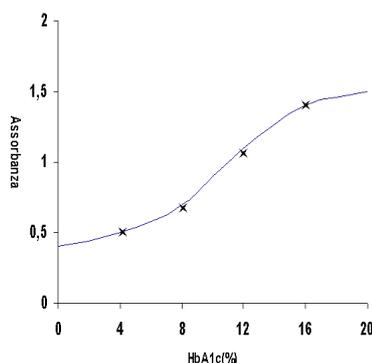
Qualora i controlli non dovessero rientrare negli intervalli stabiliti, i risultati relativi ai campioni testati non potranno essere accettati: in tal caso sarà necessario ripetere l'intera procedura, verificando attentamente ciascun passaggio. Inoltre è opportuno verificare anche la linearità del metodo, almeno con cadenza semestrale, attraverso l'allestimento di diluzioni scalari di un campione o di un calibratore a titolo elevato. Ciascun Laboratorio deve stabilire la propria procedura interna di Controllo di Qualità.

CALCOLO DEI RISULTATI

I risultati analitici relativi a ciascun campione/controllo si ottengono per interpolazione del valore di assorbanza sul grafico della curva di calibrazione precedentemente allestita. Un esempio viene qui riportato:

VALORI DI RIFERIMENTO¹¹

Inferiore al 6% nei soggetti normali, inferiore al 7% per il controllo della glicemia nei soggetti diabetici. Questi valori sono da considerarsi orientativi; si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i propri intervalli normali di riferimento. Utilizzando il valore della HbA1c nel monitoraggio della malattia diabetica, i risultati dovrebbero essere interpretati individualmente per ciascun paziente. Esiste un lasso di tempo di circa 3-4 settimane prima che i valori di HbA1c riflettano le modificazioni della glicemia



PRESTAZIONI DEL METODO

- Linearità: 2.0%-16.0%
- Correlazione: in uno studio condotto su 45 campioni umani valutati con il presente metodo ed un'altra procedura analitica automatizzata (Roche Diagnostics) è stata ottenuta un coefficiente di correlazione di 0.995 con un'equazione di regressione lineare $y=1.05x-0.36$
- Precisione:
Intrasaggio: è stata valutata analizzando campioni di sangue intero a 3 livelli diversi di HbA1c per 20 volte ciascuno

Livello	Media	Dev.standard	% C.V.
Basso	4.76	0.06	1.26
Medio	7.29	0.08	1.10
Alto	10.9	0.16	1.47

Intrasaggio: è stata valutata analizzando 3 campioni di sangue intero in duplicato a livelli diversi di HbA1c per 10 sedute analitiche diverse condotte in un periodo di 5 giorni.

Livello	Media	Dev.standard	% C.V.
Basso	4.72	0.06	1.27
Medio	7.36	0.08	1.09
Alto	11.0	0.17	1.55

- Sensibilità: tale parametro è stato calcolato misurando la variazione di assorbanza a 660nm per un campione di soluzione fisiologica ed un campione di sangue intero a concentrazione nota; sono state analizzate 10 repliche dello stesso campione. Utilizzando un autoanalizzatore Hitachi 717, i risultati dello studio hanno evidenziato che il reagente (campione a concentrazione zero) mostra un'insignificante deriva fotometrica. Nelle condizioni descritte, un delta di assorbanza di 0.073 corrisponde approssimativamente all'1% di HbA1c

CARATTERISTICHE DIAGNOSTICHE ED ANALITICHE

Durante tutta la permanenza dell'emazia nel torrente circolatorio, l'emoglobina glicata (HbA1c) si forma continuamente per addizione di glucosio all'amminogruppo terminale delle catene β dell'emoglobina. Questo processo, non enzimatico, riflette l'esposizione media dell'emoglobina al glucosio, durante un periodo prolungato di tempo. In uno studio ormai classico Trivelli et Al.¹ ha riscontrato valori di emoglobina glicata in pazienti diabetici 2-3 volte più elevati di quelli misurati in soggetti normali. Numerosi ricercatori hanno individuato nell'HbA1c un importante parametro di controllo della patologia diabetica, poiché il suo livello ematico tende alla normalità nei pazienti metabolicamente sotto controllo^{2,3,4}. L'HbA1c è definita, operativamente, la "frazione veloce" delle emoglobine (HbA1a, HbA1b, HbA1c) che eluisce per prima dalla colonna cromatografica caricata con resine a scambio cationico. L'emoglobina non glicata, che rappresenta la maggior parte della proteina viene designata HbA₀.

BIBLIOGRAFIA

- Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284,353 (1971).
- Gonen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
- 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).
- Bates, H.M., Lab. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
- Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
- Ceriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1982).
- Little, R.R., et al, Clin. Chem. 32, pp. 358-360 (1986).
- Fluckiger, R., et al, New Eng.J. Med. 304 pp. 823-827 (1981).
- Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, pp. 466-469 (1983).
- Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
- American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24 (Suppl. 1): S33-S55, (2001).

Codici di Riordino:

22270 Emoglobina Glicata (HbA1c)
22270CAL HbA1c Calibrator Set 4x0,5 mL
22270CTL HbA1c Control Set 2x0,5 mL



Bio Plastic Sas – 00100 Roma