
B-Hemoglobin A1c (B-HbA1c) med Tosoh G8

Medicinsk bakgrund

Miljöaspekter

Apparatur och tillbehör

Bipacksedel

Kemikalier och reagens

Kalibrering

Kontroll och kontrollprover

Provtagning och provhantering

Förberedelser

Utförande

Beräkning

Instrumentparametrar

Bedömning

Metodvalidering

Interferenser

Svarsrutiner

Referensintervall

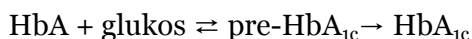
Ersatta metoder

Referenser

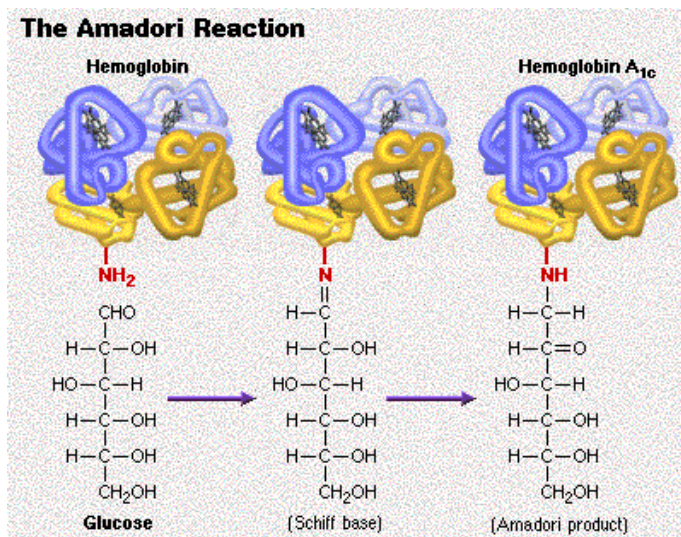
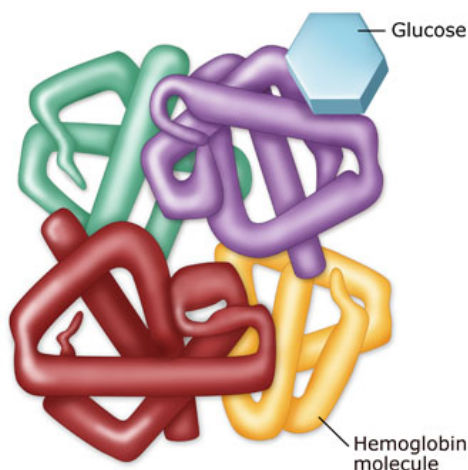
Justeringstabell

Medicinsk bakgrund

Det dominerande hemoglobinet hos den vuxna människan är HbA ($\alpha_2\beta_2$). En del av de hemoglobinmolekyler som finns i erytrocyterna modifieras postribosomalt beroende på närvaro av olika substanser i dess omgivning. Således kan glukos reagera med den N-terminala aminosyran valin i hemoglobinmolekylens β -kedja.



Det hemoglobin som uppkommer på detta sätt är en Schiffbas, kallas pre-HbA_{1c} och är labil. Den ökar mycket kraftigt vid tillfällig hyperglykemi men minskar åter då glukoshalten normaliseras. Schiffbasen står således i jämvikt med glukos och icke glykerat Hb, men undergår också en mera långsam, irreversibel, omlagring till en ketoamin, HbA_{1c}. Denna fraktion är ej beroende av snabba svängningar av glukoshalten utan återspeglar medelkoncentrationen av blodglukos under de närmast föregående två till åtta veckorna. Regelbunden HbA_{1c}-kontroll kan således medföra förbättrad metabol kontroll av diabetespatienter och på så sätt minska risken för sena komplikationer bl.a. från ögon och njurar (1, 2).



Labil

HbA_{1c}

Analysprincip

Tosoh A1c Glycohemoglobin Analyser (Tosoh HLC-723G8) är ett helautomatiskt kromatografiskt system (HPLC) för separation av olika hemoglobiner och relativ kvantifiering av HbA_{1c} (3). Instrumentet separerar hemoglobin i blod snabbt och med hög precision. Systemet använder en icke porös katjonbytare, high-performance liquid chromatography och datateknik för att mäta HbA_{1c} och beräkna denna fraktion i procent av totalt hemoglobin. Separationen uppnås med hjälp av den icke-porösa katjonbytarkolonnen, Tosoh TSKgel® (med negativt laddade resinpartiklar) och 3 buffertar med ökande jonstyrka som passerar genom kolonnen. Nettoladdningen på hemoglobinproteinerna reagerar med den negativt laddade insidan av kolonnen. Vid denna kromatografi får man även kunskap om olika hemoglobinvarianter (HbF, HbS, HbC etc.) och andra postribosomalt förändrade hemoglobiner än HbA_{1c} (karbamylet Hb vid uremi, acetylerat hemoglobin vid salicylikabehandling och acetaldehydaddukt vid alkoholism). Dessa interfererar inte med HbA_{1c}-toppen (3). Separation av de olika hemoglobinfraktionerna uppnår man beroende på laddningsskillnader mellan de olika hemoglobinmolekylerna. Elueringen sker stegvis med tre elueringsbuffertar med olika saltkoncentration. Den svagaste katjonen elueras först och den

starkaste sist i följande ordning: (beteckningar från instrumentet inom parentes: HbA_{1a} (A1A), HbA_{1b}, (A1B), HbF (F), pre-HbA_{1c} (I-A1c+; dvs. labilt HbA_{1c}), HbA_{1c} (S-A1c; dvs. stabilt), och A₀ (A₀ = icke glykolyserat HbA).

Miljöaspekter

Saknas.

Apparatur och tillbehör

Tosoh Automated Glycohemoglobin Analyzer, HLC-723G8 (4) Alere AB, Tosoh Bioscience

Kolonn

TSKgel G8® Variant HSi Alere AB, Tosoh Bioscience
För handhavande och utförande, se Tosoh G8 – Operatörsmanual, 2010 (4)

Bipacksedel

Vid större förändringar bifogas ett informationsblad eller bipacksedel som beskriver vad som är ändrat. Metodansvarig eller ingenjör meddelas. Informationsblad och bipacksedlar förvaras i Metodloggboken under "Dokument utifrån", meddelande till användare från leverantör.

Kemikalier och reagens

G8 Elution Buffer HSi No 1 (s) Alere AB, Tosoh Bioscience
G8 Elution Buffer HSi No 2 (s)
G8 Elution Buffer HSi No 3 (s)

För handhavande och utförande, se Tosoh G8 – Operatörsmanual, 2010 (4)

HSi Hemolysis/Wash Solution (L) Alere AB, Tosoh Bioscience

För handhavande och utförande, se Tosoh G8 – Operatörsmanual, 2010 (4)

Kalibrering

Hemoglobin A_{1c} Calibrator Set IFCC, 2 nivåer (5 x 4 mL) Alere AB, Tosoh Bioscience

Denna produkt innehåller material med humant eller animalt ursprung och skall behandlas som potentiellt infektiöst.

Lös innehållet i flaskorna med 4,0 mL typ I- eller typ II-vatten och låt stå 30 minuter i rumstemperatur. Blanda noggrant men försiktigt. De spädda kalibratorerna är hållbara upp till en vecka i kylskåp, 2-8 °C. Normalt är systemet stabilt och kalibrering utförs endast vid behov eller vid byte av reagensbatch och kolonn. Kalibrering utförs av metod- eller apparatansvarig.

Kalibrator som ej går åt kan portioneras och frysas in vid -20°C eller -80°C. Under de förhållandena är kalibratorerna hållbara upp till 90 dagar.

Kalibreringsprocedur

Överför minst 400 µL av respektive kalibrator, 1 och 2 (spädda enligt ovan) till Hitachikoppar. Placera kopparna med kalibratorerna, 1 och 2 i positionsnummer 1 och 2 i det första racketen. Kontroller kan placeras direkt efter.

Tryck på CALIB knappen på huvudmenyskärmen. Verifiera de åsatta kalibratorvärdena som står på kalibratorflaskan. Observera att åsatta värden vid behov justeras med en faktor. Aktuell faktor finns nedtecknat på dokument *"Fastställande och ändring av korrigeringsfaktor eller fast faktor"*. Dokument samt insert finns insatt i metodloggboken under IFCC kalibrering.

Välj CALIB_1 (HbA1c) och skriv in det korrigerade värdet för kalibratornivå 1. Välj CALIB_2 (HbA1c) och skriv in det aktuella värdet för kalibratornivå 2. Stäng fönstret genom att trycka på X i högra hörnet. Tryck på start för att utföra kalibrering.

Kalibrator 1 kommer automatiskt att mätas tre gånger och kalibrator 2, två gånger och därefter kalkyleras konstanterna a och b fram.

Märk att kalibrering måste utföras igen om resultatet blir enligt följande:

- Differensen överstiger 0,3 % mellan andra och tredje s-A_{1c} (%) värdet.
- Differensen överstiger 0,3 % mellan fjärde och femte s-A_{1c} (%) värdet.
- Någon av de fyra sista kalibreringsvärdena skiljer mer än 30 % från de åsatta värdena.

Inför analys av prover, kontrollera att rätt kalibreringskonstanter enligt den senaste kalibreringen, ses på skärmen. Kalibreringskonstanterna från den senaste kalibreringen finns insatt i Metodloggboken, men ses även på instrumentet och i Loggboken.

Metoden är således kalibrerad och spårbar mot IFCC-kalibrator (5). För att skapa ett system för spårbarhet utvecklade en arbetstrupp (IFCC Working Group on Standardization of HbA_{1c}) ett referenssystem i vilket HbA_{1c} definierades som den stabila addukten av glukos till det N-terminala valinet i hemoglobins β-kedja (6). En blandning av rent HbA_{1c} och rent HbA₀ preparerades som primära kalibrаторer (7) för den föreslagna referensmetoden (8), vilken senare har antagits av medlemsländerna i sällskapet IFCC (9).

Referensmaterialet har använts för att framställa certifierad primärt referensmaterial och använts för att kalibrera ett primärt referensmätsystem (primary reference measurement system = PRMS). Det primära referensmätsystemets åsatta värde överförs till sekundära referensmaterial (secondary reference materials = SFMs; whole blood) och dessa sekundära referensmaterial används av tillverkarna av instrument och metoder för kalibrering (10).

Kontroll och kontrollprover

Intern kvalitetskontroll

Lyphocheck Diabetes Control Level 1 och 2 (6 x 0,5 mL)

Bio-Rad

Flaskorna innehåller frystorkat preparerat humant blod.

Lös innehållet med 0,5 mL typ I- eller typ II-vatten. Låt flaskan stå 5-10 minuter. Blanda noga, undvik skumbildning. I väl försluten flaska är kontrollen hållbar 7 dygn i kylskåp. Späd kontrollerna 1:201 med Wash solution (0,5 mL kontroll + 100 ml Wash solution). Blanda. Kontrollen är nu bruksfärdig. Portionera i ellersprutor om 2,4 mL/rör. Förvaras i frys upp till en månad.

Kontroll i två nivåer analyseras två gånger/dag, förmiddag och eftermiddag. Ta fram ny kontroll varje morgon, tina och blanda väl. Håll över i hitachi-kopp före analys.

Löpande kontrollanalys och tekniskt godkännande

Löpande kontroller hanteras och tekniskt godkännande sker enligt [Metodkontroll](#), [kontrollhantering](#), [Klinisk farmakologi](#), [Klinisk immunologi och transfusionsmedicin](#), [Klinisk kemi](#).

Periodvis sammanställning

Precision

Alla dagliga kontroller överförs till QM-systemet där medelvärde, SD och CV beräknas.

Riktighet

Efter varje analystillfälle av extern kontroll erhålls en sammanställning. Resultaten från denna kontroll införs i QM.

Extern kvalitetskontroll

Se [Externa kvalitetskontrollprogram](#), [Klinisk kemi](#) och [Klinisk farmakologi](#). Den externa kontrollen analyseras på samma sätt som kapillärprov.

Provtagning och provhantering

Ta blodprov i 5 mL vakuumrör innehållande EDTA. Provet är hållbart 6 dagar i kylskåp. Kapillärtaget prov är hållbart upp till 24 timmar om tillräcklig mängd finns.

Även helblod i rör utan gel med tillsats av Heparin/Citrat/NaF/EDTA går att använda.

Förberedelser

Starta programmet Piano-Evo 4, logga in öppna *Worklist*.

Utförande

Alla prover matas in i instrumentet via provrack. Helblodsrör och Hitachikoppar med förspädda prover kan sättas i samma rack. Helblodsrör (EDTA) måste innehålla minst 1 mL blod, blandas och sätts i racken. Om blodvolymen är < 1 mL görs en manuell spädning med Hemolysis Wash och detsamma görs med kapillära prover.

Späd 1:201, dvs. 5 µL prov och 1000 µL Hemolysis/wash solution. Kontroller och förspädda prover blandas väl och hålls upp i Hitachikoppar som därefter sätts i rack. När det sitter en kopp i racketen indikerar det att provet är förspädd; analys av helblod kan således inte ske i kopp utan endast i EDTA-rör, se Operatörsmanual 2010 för Tosoh G8 (4).

Provsvar går till Resultathantering via Piano Evo-4 som är ett dataprogram från Tosoh Bioscience, där prover med fördefinierade instrumentlarm fångas upp i *Worklist*.

För att prover med larm som fastnat i Piano Evo-4 ska föras över i Resultathantering måste proverna valideras i programmet.

Vid avvikande kromatogram där Piano Evo-4 indikerar en hemoglobinopati ska provet analyseras med immunologisk metod på DCA Vantage och sedan lämnas till medicinskt ansvarig alternativt jourhavande läkare som beslutar om vilket svar som kan lämnas.

Provresultat kan godkännas om nedanstående kriterier uppfylls och inga larm finns.

Totalarea: 500 - 4000 är acceptabelt, om totalarean är 700 - 3000 är resultaten synnerligen tillförlitliga.

Elueringstiden: 0,57 - 0,61

TP-värde: > 250

Toppar: 6 toppar samt inget avvikande kromatogram

Beräkning

Se Tosoh G8 – Operatörsmanual, 2010. (4)

Instrumentparametrar

Se Tosoh G8 – Operatörsmanual, 2010. (4)

Bedömning

HbA_{1c} återspeglar medelglukoshalten under de närmast föregående två till åtta veckorna (11) eller enligt annan uppfattning närmaste två till tre månaderna (12). Vid diabeteskontroll eftersträvas en god kontroll med HbA_{1c}-IFCC värden <50 mmol/mol vid ej insulinbehandlad Typ 2 diabetes medan vid Typ 1 och insulinbehandlad Typ 2 diabetes eftersträvas < 50 – 60 mmol/mol (13). Den individuella målsättningen kan avvika från dessa generella målvärden. HbA_{1c} överstigande 70 mmol/mol betraktas som otillfredsställande (2). Vid dålig metabol kontroll ses värden upp mot 145 mmol/mol. Risken för komplikationer från kärlsystemet och alltså sekundärt även från ögon och njurar ökar påtagligt vid höga HbA_{1c}-halter. Bedömningen förutsätter normal överlevnadstid för erytrocyterna. Observera att vid hemolytiska tillstånd är erytrocytens överlevnadstid förkortad vilket medför att glykeringen minskar. Blodgivarblod som lagrats i ACD-lösning (acid, citrat, destrose) får höga HbA_{1c}. Vid transfusion med sådant blod får patienten därför ett falskt förhöjt HbA_{1c} utan relation till det egna blodsockret (14).

Metodvalidering

Se metodvalideringar i dokumentskåp samt internt kvalitetssystem (QM).

Kontrollnivå och mätosäkerhet för metoden finns i QM.

Riktighet

Denna metod är mentor för HbA_{1c} Klinisk kemi i Östergötland och deltar i kvalitetssäkring hos Equalis.

Efter varje analystillfälle av extern kontroll erhålls en sammanställning. Resultaten från denna kontroll införs i QM.

Mätområde

14 - 222 mmol/mol

Omräkning

För omräkning från den svenska metoden HbA_{1c} (Mono S) med enheten % till den nya internationella metoden HbA_{1c} (IFCC) med enheten mmol/mol sker omräkningen enligt formeln:

$$[\text{HbA}_{1c}, \text{IFCC}, \text{mmol/mol}] = 10,45 \times [\text{HbA}_{1c}, \text{Mono S}, \%] - 10,62$$

För omräkning från den nya enheten tillbaka till den gamla används formeln:

$$[\text{HbA}_{1c}, \text{Mono S}, \%] = 0,0957 \times [\text{HbA}_{1c}, \text{IFCC}, \text{mmol/mol}] + 1,016$$

Interferenser

Varken HbA₀, labilt HbA_{1c} (aldimin), karbamylet, eller acetylerat hemoglobin interfererar med denna metod (3).

Svarsrutiner

Svaret ges i mmol/mol utan decimal.

Referensintervall

Män och kvinnor

Ålder <50 år 27-42 mmol/mol

Ålder >50 år 31-46 mmol/mol

Referensintervallet för HbA_{1c} i Sverige är uppdelat på två åldersgrupper och kommer från ”Kristianstadstudien” (15).

Målvärde. För den som har diabetes är den allmänna målsättningen att B-HbA_{1c} (IFCC) ska vara mindre än 50 mmol/mol. Dock ska behandlingsmålet sättas individuellt utifrån en klinisk nytto- och riskbedömning.

Ersatta metoder

Klinisk kemi US

HbA_{1c} med katjonbytare (1980)

Jonbyteskromatografi med DAICHI (1986-10)

HbA_{1c} med Hitachi 917 (1996-04)

HbA_{1c} med Advia 1650 (2002-05-01)

HbA_{1c} med Tosoh G7 (2015-04-14)

Klinisk kemi ViN

HbA_{1c} med kromatografi (1979)

HbA_{1c} med HPLC (1989-03-07)

HbA_{1c} med Vision (1992 07-09; 1994 02-20)

HbA_{1c} med Hitachi 911 (1997-06)

HbA_{1c} med Advia 1650 (2002-05-01)

Referenser

1. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *Bmj* 2000;321:405-12.
2. Socialstyrelsen. Nationella riktlinjer för vård och behandling vid diabetes mellitus. ISBN 978-91-7555-274-3
3. Gibb I, Parnham A, Fonfrede M, Lecock F. Multicenter evaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer. *Clin Chem* 1999;45:1833-41.
4. Tosoh. Tosoh Automated Glycohemoglobin Analyzer HCL-723 G8, Operatörsmanual, Revision D, 2010.
5. Landin-Olsson M, Jeppsson JO, Nordin G. HbA1c – ny standardisering införs i Sverige. Den nya enheten blir mmol/mol. *Läkartidningen* 2010;107:3282-5.
6. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardization of HbA1c/glycohemoglobin determinations. *J Int Fed Clin Chem* 1996;9:62-4, 6-7.
7. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppsson JO. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA1c determinations. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:299-308.
8. Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997;43:1944-51.
9. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.
10. Hanas R, John G. 2010 Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A(1c) measurement. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:775-6.
11. Nilsson-Ehle P. Laurells Klinisk Kemi i praktisk medicin. In: Nilsson-Ehle P, ed., Vol. Åttonde upplagan ed: Studentlitteratur, 2003:305-59.
12. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Wilke AL, Rohlfing CL, Wians FH, Jr., et al. Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. *Clin Chem* 1992;38:2472-8.
13. Vårdprogram diabetes. Diabetesrådet Region Östergötland. Hösten 2014. http://lisa.lio.se/pages/249747/Vardprogram_Diabetes.pdf
14. Weinblatt ME, Kochen JA, Scimeca PG. Chronically transfused patients with increased hemoglobin Alc secondary to donor blood. *Ann Clin Lab Sci* 1986;16:34-7.
15. Bäck SE, Nilsson JE, Fex G, Jeppsson JO, Rosen U, Tryding N, von Schenck H, Norlund L. Towards Common Reference Intervals in Clinical Chemistry. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:573-592.

Justeringsstabell

Version	Avsnitt samt principiellt vad som ändrats	Ansvarig
1	Dokumentet överfört från Platina till Dokumenta.	C Sundström
2	Ändrat under Provtagning och Provhantering Ändrat under utförande för hantering av prover med larm i Piano Evo-4	L Lord
3	Begränsning av läsrättighet till laboratoriemedicin	C Sundström