**B-HbA1c på Roche Cobas, Helsingborg,**

**Ängelholm, Kristianstad (NPU Kod 27300)**

**Bakgrund, indikation och tolkning**

HbA1c i helblod används som ett mått på den genomsnittliga glukoskoncentrationen under de senaste 2-3 månaderna. Cirka 50% av HbA1c-värdet avspeglar glukosläget under månaden innan provtagning, förändringar i glukoskoncentrationen under veckorna direkt före provtagning spelar således störst roll. HbA1c –värdet regelbundet mätt under längre tidsperioder korrelerar väl med risken att utveckla diabeteskomplikationer, t.ex. ögon-, njur- och nervskador. Regelbunden analys av HbA1c skall göras på alla diabetespatienter och vid värden över det rekommenderade behandlingsmålet justeras patientens medicinering och ges livsstilsråd.

Värdet på HbA1c anger storleken på den fraktion av hemoglobinmolekylerna som är glykerad. Erytrocyterna är fritt permeabla för glukos och bl.a. hemoglobinets beta-kedja kommer successivt att glykeras (valin i N-terminalen). Endast HbA0 (innehållande två alfa- och två beta-globinkedjor) kan omvandlas till HbA1c, andra former av Hb-molekyler (t.ex. HbF,α2 γ2, och HbA2, α2 δ2) kan således inte omvandlas till HbA1c.

Hemoglobinet glykeras under hela erytrocytens livslängd, en ung erytrocyt innehåller således mindre HbA1c än en gammal erytrocyt. Vid förkortad livslängd på erytrocyterna (t.ex. pga hemolys) kommer således HbA1c-värdet att blir ’falskt’ för lågt – dvs. patientens medelglukoskoncentration kan ha varit högre än vad HbA1c-värdet antyder. Det omvända gäller för erytrocyter med förlängd livstid.

Glykeringen av beta-kedjans valin sker i två steg; först binder sig glukos till HbA och bildar en intermediär form, labilt HbA1c, i en snabb och reversibel reaktion. Labilt HbA1c (aldiminformen) övergår därefter långsamt till den stabila ketoaminformen, HbA1c som kvarstår under erytrocytens kvarvarande livslängd. HbA1c definieras (IFCC) som irreversibelt glykerat Hb på en eller båda β –kedjornas N-terminala valin.

Det nya (fr.o.m. 2010-09-01) fullständiga namnet på analyten är Hemoglobin betakedja(Blod)—N–(1-deoxifruktos-1-yl)hemoglobin betakedja;substansfraktion.

HbA1c besvaras sedan 2011-01-01 i IFCC-enheten mmol/mol, behandlingsmålet vid diabetes mellitus är HbA1c (IFCC) mindre än 52 mmol/mol, dock skall behandlingsmålet sättas individuellt utifrån en klinisk nytto- och riskbedömning. [8]

HbA1c kan idag även användas för att ställa diagnos för Diabetes typ II. [13]

**Analysprincip**

Denna metod använder TTAB\* som detergent i hemolysreagenset för att

eliminera interferens från leukocyter .

Förbehandling av prov för att ta bort labilt HbA1c är inte nödvändig.

Alla hemoglobinvarianter som är glykerade vid β-kedjans N-terminal och

som har antikropp-påvisbara områden som är identiska med HbA1c

bestäms med denna analys. Följaktligen kan den metaboliska statusen för

patienter med uremi eller de vanligaste hemoglobinopatierna (HbAS, HbAC,

HbAE) bestämmas med denna analys. [6]

\*TTAB = Tetradecyltrimetylammoniumbromid

HbA1c-bestämningen är baserad på den turbidimetriska inhiberingsimmunanalysen (TINIA) för hemolyserat helblod.

* Prov och tillsats av R1 (buffert/antikropp):

Glykohemoglobin (HbA1c) i provet reagerar med anti-HbA1c antikropp och bildar lösliga antigen-antikropp-komplex. Då det specifika HbA1c antikropp-stället förekommer endast en gång på HbA1c-molekylen bilds inga olösliga komplex..

Tillsats av R2 (buffert/polyhapten) och start på reaktion:

Polyhaptenerna reagerar med överskott av anti-HbA1c-antikroppar och bildar ett olösligt antikropp-polyhaptenkomplex som kan bestämmas turbidimetriskt. [6]

* Hemoglobin-bestämning

Frisatt hemoglobin i det hemolyserade provet omvandlas till ett derivat med

ett karakteristiskt absorptionsspektrum som mäts bikromatiskt under

preinkubationsfasen (prov + R1) av ovanstående immunologiska reaktion.

Ett separat Hb-reagens är följaktligen inte nödvändigt.

Det slutliga resultatet uttrycks som mmol/mol HbA1c och

beräknas från A1c/Hb-förhållandet på följande sätt:

Protokoll 1 (mmol/mol HbA1c enligt IFCC):

HbA1c (mmol/mol) = (A1c/Hb) × 1000 [6]

**Referensintervall**

<50 år 27 - 42 mmol/mol

≥50 år 31 - 46 mmol/mol

<52 mmol/mol är medicinskt önskvärt mål vid diabetes, dock skall behandlingsmålet sättas individuellt utifrån en klinisk nytto- och riskbedömning. [8]

**Diagnosgräns**

48 mmol/mol för Diabetes typ II [13]

42–47 mmol/mol är observansområde för patient som riskerar att utveckla diabetes [13[

**Metodkarakteristika**

**Interferenser och felkällor**

**Inteferenstabell**

|  |  |
| --- | --- |
| *Substans* | *Gradering* |
| Hemolys | Påverkar ej. |
| Lipemi | Påverkar ej upp till 6,8mmol/L(Intralipid). |
| Bilirubin | Påverkar ej upp till I-index 60 (ca 1000 μmol/L). |
| HbF>10% | Fetalt Hemoglobin >10% kan ge falskt låga värden för HbA1c |

* Labilt HbA1c (Shiffs bas), acetylerat Hb eller karbamylerat Hb påverkar ej resultatet.
* Alla hemogobinmolekyler som är glykerade på det N-terminala Valinet i β-kedjorna kvantifieras i analysen. Prover från patienter med de vanligaste Hb-varianterna (HbAS, HbAC, HbAE) kan därför analyseras. [6]

**Mätområde**

Hb 4-40 g/dL

A1c 0,3-2,6 g/dL

Detta motsvarar ett mätintervall på 23-196 mmol/mol HbA1c (IFCC) vid en typisk Hb konc på 13,2 g/dL

**Mätosäkerhet**

Tot-CV internkontroller 6 mån<3% [14]

**Spridning**

**6 mån statistik internkontroller**

**Helsingborg**

B- HBA1C(IFCC)

CoID Mean CVtotal% n DateRange

999181 33,58 2,55 575 2015-04-14 - 2015-09-30

999182 80,63 2,19 663 2015-04-14 - 2015-09-30

**Ängelholm**

B- HBA1C(IFCC)

CoID Mean CVtotal% n DateRange

999181 33,51 2,95 302 2015-04-01 - 2015-09-30

999182 83,5 2,52 329 2015-04-01 - 2015-09-30

**Kristanstad**

B- HBA1C(IFCC)

CoID Mean CVtotal% n DateRange

999181 33,91 2,71 322 2015-04-01 - 2015-09-30

999182 82,95 2,84 317 2015-04-01 - 2015-09-30

**Spårbarhet**

Roche, C.f.a.s HbA1c kalibrator har spårbarhet till IFCC referensmetod. [11]

**Ackreditering**

Metoden är ackrediterad

**Referenser**

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329; 977-986.
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998; 352: 837-853.
3. Instrumenthandledning cobas 6000/8000, aktuell version
4. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of

Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study

Research Group. Intensive diabetes treatment and

cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. N Engl

J Med 2005; 353; 2643 -2653.

1. Tahara Y, Shima K. The Response of GHb to Stepwise Plasma Glucose Change Over Time in Diabetic Patients. Diabetes Care 1993; 16; 1313-1314.
2. Applikation A1C-3, Tina-quant Hemoglobin A1c, Gen 3, Roche ACN 871 (Hb), ACN 881 (HbA1c), ACN 891 (% HbA1c), 2013-08, version 4.0
3. Equalis, Check of the conversion equation for the Swedish Designated Comparison Method in the IFCC Monitoring Programme.

1. Svensk förening för Klinisk kemi i ;Equalis:

Genomförande av IFCC-Kalibreringen för HbA1C-rekommendationer från SFKK och Equalis. Revision1 2010-08-26

1. Roche Diagnostic Produktinfo ; 30 April 2010.

Ny enhet B-HbA1c mmol/mol (IFCC)

11.Jan-Olof Jeppsson, Uwe Kobold, JohnBarr.

Approved IFCC Reference Method for the Measurement

of HbA1c in Human Blood , Clin Chem Lab Med 2002; 40(1):78–89

12. Tillåten avvikelse vid omanalys Cobas C-modul, dokument-ID: 6585, Public 360

13. HbA1c blir kompletterande metod för diagnostik av diabetes Läkartidningen 49–50/2013

Lilja et al <http://www.lakartidningen.se/EditorialFiles/DX/%5bCLDX%5d/CLDX.pdf>

14.Kvalitetsmål för HbA1c-metoder som används för diagnostik av typ 2 diabetes (Equalis) <http://equalis.se/media/92081/S006_Kvalitetsmål%20för%20HbA1c_2.1.pdf>

**Patientförberedelser**

Inga speciella patientförberedelser krävs

**Provtagning**

**Rörtyper**

Remiss, rutin-/akut

5mL EDTA-rör, lila propp med blodvolym 4 mL

5mL EDTA-rör, lila propp delvolymsrör, blodvolym 3 mL

5mL EDTA-rör, lila propp delvolymsrör, blodvolym 2 mL (måste fyllas upp till streck)

EDTA-Microtainer rör® (Minimum 250 µL helblod)

**Provhantering**

**Hållbarhet**

Obehandlade prov kan förvaras 7 dygn i kyl +4ºC, 3 dygn i rumstemp (15-25°C).

**Instrument och tillbehör**

Roche Cobas 6000

**Reagens**

Art.nr: Märkning:

**05336163** 190 A1C-3 Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 150 tester (Roche)

**04528417** 190 Calibrator f.a.s. HbA1c (3 x 2 ml) (Roche)

**04528182** 190 A1CD2 Hemolyzing Reagent Gen.2 (Roche)

****

**04880994** 190 SCCS Special cell cleaning solution (Roche)

**Beredning Reagens**

Utförande:

**A1C-3**

R1: Antikroppsreagens

R2: Polyhaptenreagens

Bruksfärdigt 150 test

Låt reagenset stå ca 10 min i rumstemperatur och blanda därefter väl före laddning i instrumentet.

Förvaring: +4°C (i instrumentkyl)

Hållbarhet: 4 veckor, se utgångsdatum på förp

**A1CD2**

Hemolyseringsreagens

Bruksfärdigt

Låt reagenset stå ca 10 min i rumstemperatur och blanda därefter väl före laddning i instrumentet.

Förvaring: +4°C (i instrumentkyl)

Hållbarhet: 4 veckor, se utgångsdatum på förp

Se även instrumenthandledning [3]

**Kalibrator**

**Beteckning**

Ref.nr: **04528417** 190

Calibrator f.a.s. HbA1c (3x2mL)

**Beredning**

Se instrumenthandledning [3]

**Kalibreringsförfarande**

Se instrumenthandledning [3]

**Kalibreringsfrekvens**

-Kalibrering skall utföras efter 29 dagar

-Efter byte av reagenslot

-Vid behov om internkontroller faller utanför godkännandeområde enligt kontrollregler.

-Kalibrera alltid båda analyserna (Hb och HbA1c) parallellt

**Interna kontroller**

**Beteckning**

BIORAD, Lyphocheck Diabetes kontroll level 1 och 2

Artikel.nr: BioRad 740 Bilevel 6x0.5mL

Level 1 ca 30-35 mmol/mol (lotberoende)

Level 2 ca 75-85 mmol/mol -:-

**Beredning**

Se instrumenthandledning [3]

**Kontrollförfarande**

Se instrumenthandledning [3]

**Förvaring och hållbarhet**

Se instrumenthandledning [3]

**Externa kontroller**

**Beteckning**

Equalis externkontroll analyseras som enkelprov 10 ggr/år

**Utförande**

Helblodsapplikation för Hb (HB-W3) och HbA1c (A1-W3)

Cobas c 501 analysdefinition (HB-W3)

Analystyp 1 Point

Reaktionstid/Mätpunkter 10/34

Våglängd (sub/main) 660/376 nm

Reaktionsriktning Ökning

Enhet mmol/mol (g/dL )

Reagenspipettering Diluent (H2O)

R1 120 µL -

R2 24 µL -

Provvolymer Prov Provspädning

Prov Diluent (Hemolyzing reagent)

Normalt 5 µL 2 µL 180 µL

Minskad 5 µL 2 µL 180 µL

Ökad 5 µL 2 µL 180 µL

Cobas c 501 analysdefinition HbA1c (A1-W3)

Analystyp 2 Point End

Reaktionstid/Mätpunkter 10/34-70

Våglängd (sub/main) 660/340 nm

Reaktionsriktning Ökning

Enhet mmol/mol (g/dL )

Reagenspipettering Diluent (H2O)

R1 120 µL -

R2 24 µL -

Provvolymer Prov Provspädning

Prov Diluent (Hemolyzing reagent)

Normalt 5 µL 2 µL 180 µL

Minskad 5 µL 2 µL 180 µL

Ökad 5 µL 2 µL 180 µL

**Förhållandedefinition för beräkning av HbA1c (mmol/mol)**

Protokoll 1 (mmol/mol enligt IFCC):

Förkortat förhållandenamn RW13 (891)

Ekvation (A1-W3/HB-W3) x 1000

Enhet mmol/mol

**Analys av prov och kontroll**

Utförande venprov:

1. Blanda EDTA-rören minst 5 min genom vaggning
2. Korka av och placera i ceris rack och ladda detta i akutintag på Cobas el alt med kork på MPA
3. Validera i ciTm

Utförande kapillärprov:

1. Blanda genom att vända minst 10 ggr, märk en provkopp med lidnummer
2. Pippettera minst 100uL prov i kopp och placera i ceris QC rack
3. Ladda i akutintag på Cobas
4. Besvara i ciTm, se ciTm handledning

**Omkörningsrutiner:**

**Spädningsgräns och förfarande vid spädning**

Om A1c > 2,6 g/dL spädes provet 1:2 med 0,9 % NaCl. Pytsa i kopp och placera i ceris QC rack

OBS! Svaret ska **inte** multipliceras med spädningsfaktor.

Besvara i ciTm.

Om Hb < 10 g/dL eller > 27 g/dL → blanda och kör om.

OBS! Begär Rerun på både Hb, A1c och HbA1c i ciTm

**Efterbeställning:**

Se efterbeställningar Dokument 7866

**Tekniskt/medicinskt godkännande**

**Kriterier för tekniskt godkännande**

Svar <23 och > 196 mmol/mol kontrolleras med annan metodik

Gränser för autovalidering, åldersrelaterade

<50 år 27-85 mmol/L

>50 år 31-85 mmol/L

**Åtgärder vid ej godkänd serie**

Se dokument Tillåten avvikelse vid omanalys Cobas [12]

Se även kontrollregler, dokument 6789

**Svarsrapportering**

Svar anges i mmol/mol (IFCC) utan decimal

Helsingborg lämnar idag även ut grafiska svar med historiska värden på patient

**Säkerhetsföreskrifter**

**Ev risker vid arbete med kemikalier och reagens**

Se instrumenthandledning [3]

**Rutiner för hantering och kvittblivning av avfall**

Se instrumenthandledning [3]

**Ansvariga personer**

**Processledare**

Magnus Johnsson

**Medicinskt ansvar**

Johan Malm

**Metodansvar**

Benny Larsson

**Författare**

Benny Larsson/Metodansvarig