

HbA1c, B-				Revisionsdatum 2018-02-16
Kapitel 01.09.15.03.08 H	Dokumentnr 287	Ändrad Av Annika Wästerby		Fastställd av Kurt Karlsson
Handbok Kvalitetshandbok Laboratoriemedicin	Utgåva 6	Utgåva skapad 2018-02-15	Giltighetstid 2018-02-16 - Tillsvidare	Fastställd datum 2018-02-16

Förändringar sedan förra utgåvan

Tar bort information om NPU03835 (monoS) under flik NPU-kod då denna inte längre svaras ut/Awä

Dokumenttext

flyttat från 10.09.03.08.287, utg 8

HbA1c, B-

Umeå: TOSOH G8, TOSOH G8LA

NPU-kod

NPU27300 Hemoglobin betakedja(Blod)-N-(1-deoxifruktos-1-yl)hemoglobinbetakedja;substansfraktion, B-HbA1C (IFCC)

Indikation

Se referens till provtagningsanvisning i QNova.

Medicinsk bakgrund

Adekvata metoder för bedömning av medelblodglukosnivån under längre tid är essentiellt för korrekt glykemikontroll i avsikt att förhindra allvarliga mikrovaskulära komplikationer från olika organsystem som ögon, njurar blodkärl m.m. Ketoaminen HbA1c, som specifikt analyseras med jonbyteskromatografi speglar den genomsnittliga B-glukosnivån under en period av 2 - 6 veckor före provtagningen.

Mätprincip

Glukos kan bindas till fria aminogrupper i proteiner utan hjälp av enzym och bilda ett stabilt glykerat protein. Reaktionen går i två steg. Först bildas en Schiff-bas (pre-HbA1c) med en aldimin struktur, reaktionen är reversibel och är beroende av aminogruppens pKa och av glukoskoncentrationen. Det andra steget är en kondensationsreaktion, en Amadori omlagring, varvid en stabil ketoamin bildas. HbA1c är en hemoglobinvariant som har glykerats i β-kedjans N-terminala aminosyra, valin. Pre-HbA1c kan påverka analysen av HbA1c med jonbyteskromatografi. I den aktuella jonbytesmetoden är upplösningen så hög att pre-HbA1c separerar från HbA1c.

I erytrocyterna skyddas hemoglobinet från att genomgå oxidation av den reduktiva intracellulära miljön. Efter hemolys förändras miljön till att vara oxidativ. Hemoglobin kan, härvid, bilda en disulfid med glutation, HbA3. Det är också troligt att andra oxidativa varianter av hemoglobin bildas t.ex. HbA1c-S-glutation. Vid påtaglig förekomst av HbA3 förändras nivån av HbA1c.

I helblod som förvaras vid 4-8°C under 8-12 dagar sker det inga större oxidativa förändringar av hemoglobinet. För helblod som fryses vid -20°C är förändringen i HbA1c nivån märkbar efter 14-28 dagar. Fryses helblodet vid -80°C tar det flera veckor innan nivån av HbA1c förändras, men även vid förvaring i flera år blir förändringen liten.

Analysatorn späder helblodsprovet med Hemolyserings- och tvättlösningen och injicerar en liten mängd av det spädda provet i kolonnen. Separationen sker genom skillnader i jonstyrkan mellan katjonbytargruppen på kolonnens absorptiva yta och hemoglobin varianterna. Hb-fraktionerna Ala, Alb, F, LA1c + SA1c, A0 och HbS+ går ur kolonnen i nämnd ordning genom att man använder elueringsbuffertarna 1, 2 och 3 med olika saltkoncentrationer. Hemoglobinkomponenterna passerar en LED flödesfotometer som registrerar absorbansändringar. Analysatorn integrerar och reducerar rådata och beräknar den relativa procenten av varje

hemoglobinfraction. Varje analys tar 1,6 minuter.

Provtagning/ Provhantering

Se referens till provtagningsanvisning i QNova.

Utrustning

Automatiserad glykohemoglobinanalysator HLC-723G8 med provväxlare för 90 prover och automatiserad glykohemoglobinanalysator HLC-723G8LA med provväxlare för 90 prover, TOSOH, se referens.

Provrackar

Adaptrar för förspädda prover

Reagens

G8 Variant Elueringsbuffertar HSi 1, 2 och 3 Tosoh	
Innehåll:	Elueringsbuffertarna är succinatbuffertar. Förpackningen innehåller mindre än 0,05% natriumazid som konserveringsmedel.
Beredning:	Färdiga att användas.
Förvaring Hållbarhet	Oöppnad vid 4-25°C till utgångsdatum. Öppnade förpackningar är hållbara 3 mån i 4-25°C. Lösningarna ska vara rumstempererade vid användning.

G8 Hemolys- och wash lösning Tosoh	
Innehåll:	Innehåller avjoniserat vatten, EDTA och Triton X. Lösningen innehåller mindre än 0,1% natriumazid som konserveringsmedel.
Beredning:	Färdiga att användas.
Förvaring Hållbarhet	Oöppnad förpackning är hållbar i 4-25°C till utgångsdatum. Öppnad förpackning är hållbar i 3 mån vid 4-25°C. Lösningen ska vara rumstempererade vid användning.

Metodkontroll

Extern kontroll

Se referens till dokument om externa kontroller.

Intern kontroll

Hemoglobin A1c kontroll (019405) Nivå 1 och 2 Tosoh	
Innehåll:	
Beredning:	Kontrollen löses i 500 µL avjoniserat vatten och späds sedan med avjoniserat vatten till 25 mL. Kontrollerna fryses i rör med 1 mL i varje, som sedan tas fram varje dag.
Förvaring: Hållbarhet:	Hållbara 90 dagar i -20°C eller i 7 dagar i kylskåp efter uppspädning.

Analysfrekvens intern kontroll

Förmiddag analyseras en kontroll på två nivåer.

Eftermiddag analyseras en kontroll på en kontrollnivå.

Kontroller analyseras ej lördag, söndag och helgdag.

Efter reagensbyte	Ingen åtgärd	
Efter lot-byte reagens	Ingen åtgärd	
Efter filterbyte	En kontroll / nivå	
Efter standardisering		Fyra kontroller/nivå

Utförande

Kontrollerna som är förspädda placeras i Hitachikopp i adapter.

Utförande

Se referens till dokument:

Std.Arbetssätt- HbA1c

TOSOH G8

Piano, mjukvara för TOSOH G8

För laddning på automationen se standardiserat arbetssätt preanalys

Vid laddning på instrumentet sätts proverna i rackar med barcoden vänd åt rätt håll.

Blanda proverna manuellt och ladda på instrumentet. Om man inte har fler prover, sätt in en tom rack. Apparaten går i Wash efter den. Vill man avbryta tvätten så ladda prover och tryck start.

Det behövs 1 mL helblod för att köra primärrör. Instrumentet är inställt så att primärrör betraktas som ospätt material medan koppar betraktas som spädda prover. I STAT-positionen finns möjligheten att ange om provet är spätt eller inte och om man kör i kopp eller rör. Det möjliggör helblodsanalys i kopp med minsta mängd 50 µL. Är provet spätt är minsta volymen 150 µL i kopp.

Prover med mindre mängd (< 1 mL) kan spädas manuellt 1:200 (10 µL prov + 1990 µL Hsi) med hemolys/wash lösning (dunk) och sätts i en kopp med adapter i rack. Skapa en ny barcodeetikett som sätts på adaptern. Alternativt kan provet analyseras som helblod i kopp i STAT-positionen. Lidnummer (inklusive lidext) skrivs in manuellt vid beställning, se instruktioner i handhavande av utrustning.

Analys av Bio Rads HbA1c kapillära provtagningssystem.

Skapa en ny barcodeetikett som sätts på adaptern. Häll över vätskan från det lila röret till en kopp. Analysera därefter provet.

Interferens, felkällor

Se referens till provtagningsanvisning i QNova.

Bilirubin upp till 340 mmol/L påverkar ej resultatet.

Lipemi, triglycerider upp till 40,6 mmol/L påverkar ej resultatet.

Ascorbinsyra, salicylsyra, natriumcyanat och acetaldehyd i koncentrationerna 500 mg/L interfererar ej med bestämningen.

Mätintervall

Mätområdet innefattar en total area mellan 500 – 4000.

Se Standardiserat Arbetssätt om arean avviker.

Beräkning/ Tolkning av resultat

Kontrollregler skall följas för godkännande av analys. Se även avsnitt Interferens, felkällor.

- Areal av eluerade fraktioner beräknas av instrumentet och mängden HbA1c uttrycks som procent av den totala mängden hemoglobin.

Ex

$$\frac{\text{Area}_{SA1c}}{[\text{Area}_{\text{total}} - \text{Area}_F - \text{Area}_{H-V} - \text{Area}_{P00\text{toppar efter } A0}]} \times 100 \% = SA1c \text{ area\%}$$

Men eftersom man kalibrerar metoden har instrumentet en kalibreringsfaktor inlagd, som den använder för att göra den slutliga beräkningen.

CalibY = kX + I

Calib Y = k (SA1c) + I (från ex ovan). Kalibreringen görs i IFCC-enheter.

- Kontrollera kromatogrammen för prover som valideras manuellt.

Arbetsätt vid bedömning av kromatogram/resultat

avsnitt "Kontroll av kurvor" slut

Svarsrutin

Svar ges i mmol/mol utan decimal.

Referensintervall, beslutsgräns

Se referens till provtagningsanvisning.

Källa

Som en följd av samkalibrering kan detta referensområde användas. Referensmaterialet är insamlat i Kristianstad. Två slumpmässigt valda individer per kön och ålder 20-80 år analyserades med monoS-tekniken.

Metodstandardisering

Spårbarhet för kalibrator/standard

Kalibratorerna är spårbara till IFCC:s referensmätmetod för HbA1c.

Kalibrator/standard

HbA1c kalibratorset (0018767) Tosoh	
Innehåll:	Kalibrator 1 $\approx$ 40 mmol/mol, 5 x 4 mL Kalibrator 2 $\approx$ 90 mmol/mol, 5 x 4 mL Buffrade humana röda blodkroppar 2 g/L humant hemoglobin och 0,5 mM EDTA som konserveringsmedel.
Beredning:	Till kalibratorm sätts 4,00 mL avjoniserat vatten, blanda noga. Vid kalibrering behövs 1 mL. De övriga 3 mL som finns kvar fryses i 3 portioner som tas fram vid senare kalibreringar.
Förvaring:	Upplöst kalibrator är hållbar 7 dagar i kylskåp.

Hållbarhet:

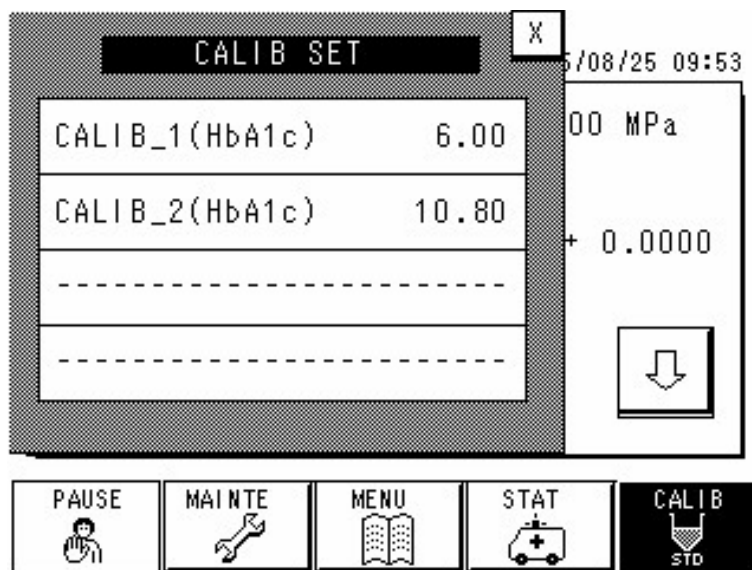
Analysen standardiseras med brukskalibratoren efter kolonnbyte, efter underhåll som kan ha påverkan på kalibreringen, eller om kontrollerna hamnar utanför specificerat intervall. Kontrollera innan standardisering att kromatogrammen är fina.

Metodstandardisering

Tryck på CALIB-knappen nere till höger på huvudskärmen.

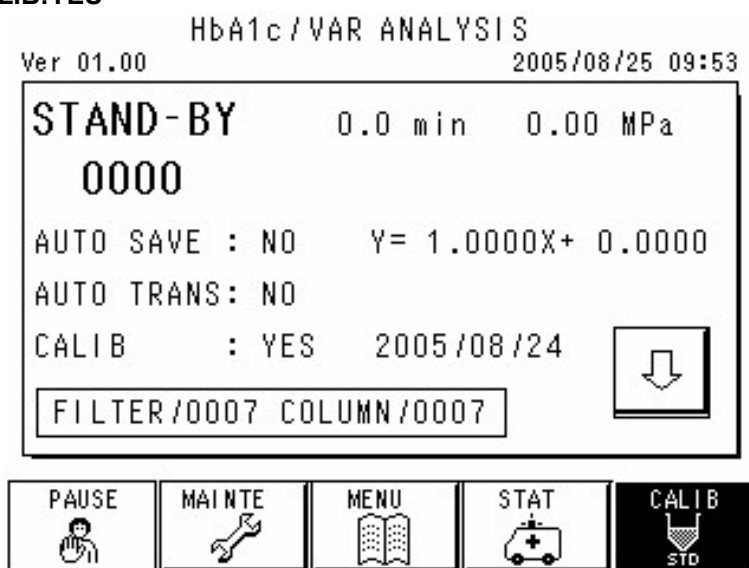
Knappen markeras och skärmen för inmatning av kalibrators tillskrivna värde visas, dvs kontrollera att rätt värde står på skärmen för Calib 1 och Calib 2. Om värdet är felaktigt, ange det rätta värdet. Bekräfta med Enter.

Stäng inmatningsskärmen genom att trycka på X.



Bekräfta att CALIB-knappen på huvudskärmen är upplyst och att CALIB-meddelandet är YES.

Skärm visar CALIB:YES



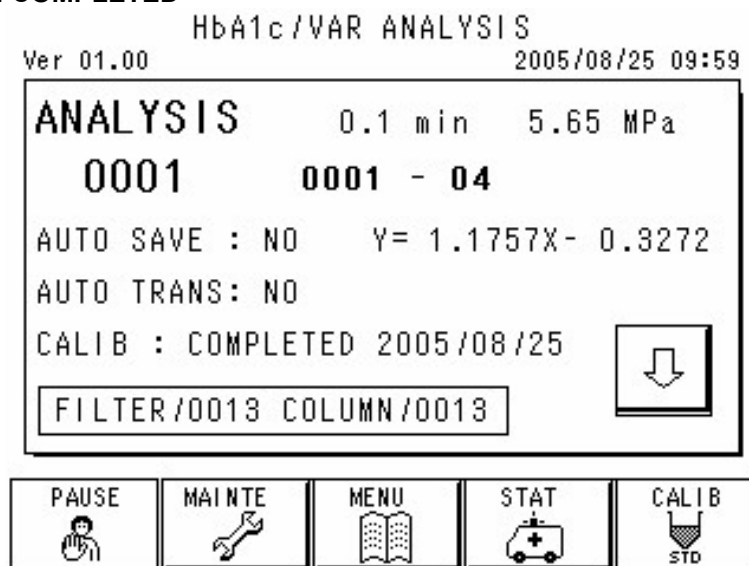
Sätt Nivå 1 och Nivå 2- kalibratorerna i kopp med adapter i rack i position 1 och 2.

Tryck sedan på START-knappen. Kalibratoren kommer att bearbetas automatiskt.

När den automatiska kalibreringen väl är avslutad kommer CALIB-meddelandet att ändras till COMPLETED och CALIB-knappen inte längre att vara upplyst.

Dessutom kommer kalibratorfaktorerna som fastställts att visas på skärmen.

Skärm visar CALIB: COMPLETED



När kalibreringen är klar körs kontroller på båda nivåerna. Kontrollera i huvudmenyn att det står kalibrering NO.

Vid kalibreringen mäts kalibrator 1 tre gånger och kalibrator 2 två gånger. Apparaten förkastar den första bestämningen och beräknar faktorn på de fyra nästkommande.

När kalibreringen är klar accepteras eller förkastas kalibreringsresultaten. Kalibreringsfel kan bero på;

1. Att de två bestämningarna på kalibrator 1 och 2 skiljer sig 0,3 % eller mer från varandra.
2. Någon av kalibreringsvärdena är över eller lika med $\pm 30\%$ från åsatt värde.

Om kalibreringen inte accepteras felsök och kalibrera om efter åtgärd.

Validering/Verifiering

Umeå:

G8

Verifiering utförd under februari 2009. Förvaras i arkivskåp.

Imprecision

Kontrollmaterial: Hemoglobin A1c kontroll, nivå 1 och 2

Tidsperiod: 090202-090219

Instrument	HbA1C kontroll 1 %	HbA1C kontroll 2 %
Nivå	4,5	9,4
Repeterbarhet, CV% inom serie ^{a)}	0,89	0,43
	1,50	0,88

Inom laboratorie imprecision, CV% totalt ^{b)}		
CV% mellan serie	1,21	0,76

a) n = 3 upprepningar inom dag

b) n = 31 antal värden, d = 10 antal dagar

Kontroll av HbA1c Via post (lapp) lot 90227
090227-090309

	HbA1c kontroll, lapp
Nivå:	4,7%
Cvc tot%	1,12

Data framtagen vid uppsättande av metod.

Ackrediterings CV%

Ackrediterings CV framtagen 010701-011231 vid uppsättande av metod, totala CV = 3 %.

Metodjämförelse

Metodjämförelse utförd februari 2009. Metoderna ställda mot Equalis kalibrator. HbA1C% analyserad på Tosoh G5 jämfördes med HbA1C% analyserad på Tosoh G8.

Korrelationen r^2 är: 0,996 n = 34Regressionskurvans formel är: $HbA1C_{TosohG8} = 1,010 \times HbA1C_{TosohG5} + 0,047$

Verifiering utförd av HbA1C-Capillary Collection system utförd i mars 2010. Förvaras i arkivskåp.

Verifiering utförd vid övergång från monoS till IFCC-enhet maj-december 2010. Förvaras i arkivskåp.

Verifiering utförd vid övergång till BioRAD-kalibrator mars 2012 se referens. Förvaras i arkivskåp.

G8LA

Verifieringen är utförd Nov-Dec 2015 vid klinisk kemi i Umeå. Se referens till B-HbA1C i kvalitetshandbok.

Verifiering av Tosohs kalibratorset utfört 2016-04-27 vid klinisk kemi i Umeå. Se referens till B-HbA1C i kvalitetshandbok.

Anmärkningar**Historik****Referenser**Bannon B. Effect of pH on the Elimination of the Labile Fraction of Glycosylated Hemoglobin. Clin Chem **28**, 2183 (1982).Jeppsson J-O, Jerntorp P, Sundkvist G, Englund H och Nylund V. Measurement of Hemoglobin A1c by a New Liquid-Chromatographic Assay: Methodology, Clinical Utility and Relation to Glucose Tolerance Evaluated. Clin Chem **32**, 1867-1872 (1986).

Ganrot PO, Grubb A, Stenflo J, Lundh B: Laurells Klinisk kemi i praktisk medicin, 7 uppl. Lund: Studentlitteratur 1997: 303-304.

Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Wilke AL, Rohlfing CL, Wians FH Jr, Jacobson JM, Zellmer V och Goldstein DE. Interlaboratory Standardization of Measurements of Glycohemoglobins. Clin Chem **38**, 2472-2478 (1992).

Dokumentrevision

dokumentslut

Referenser	
QNovareferenser 01.09.15.01.196 Externa kontroller, Metoder, beredning, frekvens mm i Kvalitetshandbok Laboratoriemedicin 01.09.15.10.735 Std.Arbetssätt IT - HbA1c i Kvalitetshandbok Laboratoriemedicin 01.09.75.15.08.286 B-HbA1C i Kvalitetshandbok Laboratoriemedicin 01.09.75.15.08.287 HbA1C-B, kalibrator i Kvalitetshandbok Laboratoriemedicin 01.10.15.10.612 PIANO-mjukvara för TOSOH G8 i Kvalitetshandbok Laboratoriemedicin 01.10.15.10.781 TOSOH G8 i Kvalitetshandbok Laboratoriemedicin HBA10 HbA1c, B- i Provtagningsanvisningar	
Attribut	
Dokumenttyp	Metodbeskrivning
Dokumenttyper grupp ett	Metodbeskrivning