



# HbA1c Direct

Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of HbA1c in human blood by turbidimetric assay

REF	Content	
Y04602	4x 22.5 mL R1	+ 1x 30 mL R2
Y04606	4x 7.5 mL R1	+ 1x 10 mL R2
Y04601	4x 45 mL R1	+ 1x 60 mL R2
YA1004	1x 30 mL R1	+ 1x 10 mL R2
YT1204	1x 30 mL R1	+ 1x 10 mL R2
Y06911	1x 30 mL R1	+ 1x 10 mL R2
Y06917	1x 30 mL R1	+ 1x 10 mL R2

Additionally offered:

Y04605	5x 100 mL	Hemolysis Reagent
Y04603	5x 1 mL	HbA1c Direct Calibrator 5 Level Series
Y04604	4x 1 mL	HbA1c Direct Control Set

## GENERAL INFORMATION

Method	Immunoturbidimetric
Wavelength	660 nm
Assay Temperature	37 °C
Sample	Whole blood with EDTA
Measuring range	approx. 0 – 14 %

## INTENDED USE

The determination of HbA1c is most commonly performed for the evaluation of glycemic control in diabetes mellitus. HbA1c values provide an indication of glucose levels over the preceding 4-8 weeks. A higher HbA1c value indicates poorer glycemic control.

## REAGENT COMPOSITION

<b>Reagent 1</b>	
Latex	
Sodium azide	0.95 g/L
<b>Reagent 2</b>	
Anti-human HbA1c mouse monoclonal antibody	
Stabilizers	

## REAGENT PREPARATION

Reagent 1 and 2 are ready to use. Mix gently before use.

## REAGENT STABILITY AND STORAGE

Conditions:	Protect from light. Close immediately after use. Do not freeze the reagents!
Storage:	at 2 – 8 °C
Stability:	up to the expiration date
R1 and R2 are stable for 30 days after opening if stored at 2 – 8 °C	

## SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use fresh EDTA whole blood.  
 To determine HbA1c, a hemolysate must be prepared for each sample:

- Dispense 1 mL Hemolysis Reagent into a test tube.
- Add 10 µL of well mixed EDTA whole blood into the tube and mix.
- Allow to stand for 5 minutes or until complete lysis is evident.

Hemolysate stability: at 2 – 8 °C 72 hours

Discard contaminated specimens.

## GENERAL TEST PROCEDURE

Solve calibrators and controls, do not lyse them. Perform lysis with samples only.  
 Use the HbA1c Direct Calibrator 5 Level Series to generate a calibration curve.

Pipette into test tubes:	Calibrators	Samples/Controls
HbA1c Reagent 1	180 µL	180 µL
Calibrators/Controls/Samples	5 µL	5 µL
Mix. Incubate for 2 minutes at assay temperature. Then add:		
HbA1c Reagent 2	60 µL	60 µL
Mix and read A1 of calibrators and samples/controls at 660 nm. Incubate for 5 minutes, then read A2 at 660 nm. Calculate: $\Delta A = (A2 - A1)$		

## CALCULATION (light path 1 cm)

HbA1c results according to NGSP for the samples and controls are determined using the prepared calibration curve.

For calculating results according to IFCC, use IFCC calibrator values (see insert calibrator series) or use the following equation:

$$\text{IFCC (mmol/mol)} = (\text{HbA1c in \% NGSP} - 2.15) / 0.0915$$

## REFERENCE RANGE

According to NGSP: < 6 % for a non-diabetic  
 < 7 % for glycemic control of a person with diabetes

According to IFCC: < 42.0 mmol/mol Hb for a non-diabetic  
 < 53.0 mmol/mol Hb for glycemic control of a person with diabetes

It is recommended that each laboratory establishes its own normal range. In using Hemoglobin A1c to monitor diabetic patients, results should be interpreted individually (the patient should be monitored against him or herself). There is a 3-4 week time lag before Hemoglobin A1c reflects changes in blood glucose level.

## TEST PRINCIPLE

This method utilizes the interaction of antigen and antibody to determine directly the HbA1c in whole EDTA blood. HbA1c in test samples is adsorbed onto the surface of latex particles, which react with Anti-HbA1c (antigen-antibody reaction) and gives agglutination. The amount of agglutination is measured as absorbance. The HbA1c value is obtained from a calibration curve.

## DIAGNOSTIC IMPLICATION

Throughout the circulatory life of the red cell, HbA1c is formed continuously by the addition of glucose to the N-terminal end of the haemoglobin beta chain. The process, which is non-enzymatic, reflects the average exposure of haemoglobin to glucose over an extended period. In a classical study, Trivelli et al<sup>1</sup> showed HbA1c in diabetic subjects to be elevated 2-3 folds over the levels found in normal individuals. Several investigators have recommended that HbA1c serves as an indicator of metabolic control of the diabetic, since HbA1c levels approach normal values for diabetics in metabolic control.<sup>2,3,4</sup>  
 HbA1c has been defined operationally as the "fast fraction" haemoglobins (HbA1a, A1b, A1c) that elute first during column chromatography with cation-exchange resins. The non-glycosylated haemoglobin, which consists of the bulk of the haemoglobin has been designated HbA0.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### LINEARITY

The Hemoglobin A1c assay range is 0 % - 14 % (NGSP).

### PRECISION [%CV]

	Low	Medium	High
Intra-Assay	1.14	0.72	1.22
Inter-Assay	1.85	2.05	2.97

### ACCURACY [%]

Control	Assigned Value	Measured Value
DIALAB L1	5.8 (4.9 – 6.7)	6.0
DIALAB L2	10.1 (8.6 – 11.6)	10.1
BIORAD L1	5.48 (4.39 – 6.58)	5.81
BIORAD L2	9.42 (7.54 – 11.3)	9.08

### METHOD COMPARISON

A comparison study of this Hemoglobin A1c procedure and ROCHE gave the following results:  $y = 0.9286x + 0.26$  /  $r = 0.9656$

### SENSITIVITY

The change of absorbance units per concentration unit was calculated for the up going part of the nonlinear curve. Result was measured: 0.0458744 Absorbance/Concentration units.

### INTERFERING SUBSTANCES

No interference of:  
 High Lipids: 3000 formazin turbidity units  
 Free Bilirubin: 30 mg/dL  
 Conjugated Bilirubin: 30 mg/dL  
 The reagent cannot detect HbF therefore elevated levels of HbF can lead to underestimation of HbA1c results. Patients suffering from Thalassemia might show lower results due to short lifespan of HbA1c in samples.

### QUALITY CONTROL

All control material with % HbA1c values determined by this method can be used. We recommend the DIALAB HbA1c Direct Control Set.

### CALIBRATION

The assay requires the use of a HbA1c calibrator. We recommend the DIALAB HbA1c Direct Calibrator 5 Level Series.

### AUTOMATION

Applications for automated systems are available upon request.

### WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- Sodium azide has been reported to form lead or copper azide in laboratory plumbing, which may explode on percussion. Flush drains with water thoroughly after disposing of fluids containing sodium azide.
- Each donor unit used in the preparation of the calibrators and controls was found to be negative for the presence of HIV1 and HIV2 antibodies, as well as for the hepatitis B surface antigen and anti-hepatitis C antibodies, using a method approved by the FDA.
- This assay should not be used for the diagnosis of diabetes mellitus.

### WASTE MANAGEMENT

Please refer to local legal requirements.

### REFERENCES

- 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).





## HbA1c Direkt

Diagnostisches Reagenz für den quantitativen Nachweis von Hämoglobin A1c (HbA1c) in Humanblut mittels turbidimetrischer Methode

REF	Inhalt
Y04602	4x 22.5 mL R1 + 1x 30 mL R2
Y04606	4x 7.5 mL R1 + 1x 10 mL R2
Y04601	4x 45 mL R1 + 1x 60 mL R2
YA1004	1x 30 mL R1 + 1x 10 mL R2
YT1204	1x 30 mL R1 + 1x 10 mL R2
Y06911	1x 30 mL R1 + 1x 10 mL R2
Y06917	1x 30 mL R1 + 1x 10 mL R2

Zusätzlich wird angeboten:  
 Y04605 5x 100 mL Hämolyse-Reagenz  
 Y04603 5x 1 mL HbA1c Direkt Kalibrator 5 Level Serie  
 Y04604 4x 1 mL HbA1c Direkt Kontrollset

### ALLGEMEINE INFORMATION

**Methode** Immunturbidimetrisch  
**Wellenlänge** 660 nm  
**Testtemperatur** 37 °C  
**Probe** Vollblut mit EDTA  
**Messbereich** ca. 0 - 14 %

### VERWENDUNGSZWECK

Der Nachweis von HbA1c wird hauptsächlich für die Evaluierung der glykämischen Kontrolle bei Diabetes mellitus durchgeführt. HbA1c-Werte geben einen Hinweis auf die Glucosewerte der letzten 4 – 8 Wochen. Ein höherer Wert weist auf schlechte glykämische Kontrolle hin.

### REAGENZENZUSAMMENSETZUNG

**Reagenz 1**  
 Latex  
 Natrium azide 0.95 g/L  
**Reagenz 2**  
 Maus Anti-human HbA1c monoklonaler Antikörper  
 Stabilisatoren

### REAGENZVORBEREITUNG

**Reagenz 1 und 2** sind gebrauchsfertig. Vor Gebrauch sanft mischen.

### REAGENZSTABILITÄT UND -LAGERUNG

Bedingungen: Vor Licht schützen. Nach Verwendung sofort verschließen. Nicht einfrieren!

Lagerung: bei 2 – 8 °C  
 Haltbarkeit: bis zum Verfallsdatum

Nach dem ersten Öffnen sind R1 und R2 30 Tage stabil bei korrekter Lagerung bei 2 – 8 °C.

### PROBENVORBEREITUNG UND -STABILITÄT

Frisches Vollblut, stabilisiert mit EDTA, verwenden.  
 Für die HbA1c-Bestimmung muss für jede Probe ein Hämolytats vorbereitet werden:

- 1 mL Hämolyse-Reagenz in ein Röhrchen pipettieren.
- 10 µL gut gemischtes Vollblut zugeben und mischen.
- 5 min. stehen lassen oder solange, bis eine vollständige Lyse klar erkennbar ist.

Hämolytats-Stabilität: bei 2 – 8 °C 72 Stunden

Kontaminierte Proben verwerfen.

### ALLGEMEINE TESTDURCHFÜHRUNG

Kalibratoren und Kontrollen auflösen, nicht lysieren. Hämolytate nur für Proben herstellen.

Kalibrationskurve mittels HbA1c Direkt Kalibrator 5 Level Serie erstellen.

In Küvetten pipettieren	Kalibratoren	Proben/Kontrollen
HbA1c Reagenz 1	180 µL	180 µL
Kal./Ktrl./Proben	5 µL	5 µL
Mischen. Für 2 Minuten bei Testtemperatur inkubieren. Dann zufügen:		
HbA1c Reagenz 2	60 µL	60 µL
Mischen and A1 der Kalibratoren und Proben/Kontrollen bei Testtemperatur bei 660 nm ablesen. 5 min. bei Testtemperatur inkubieren, dann A2 bei 660 nm ablesen. Berechnung: $\Delta A = (A2 - A1)$		

### BERECHNUNG (Lichtweg 1 cm)

HbA1c-Werte gemäß NGSP für die Proben und Kontrollen werden mit der vorbereiteten Kalibrationskurve bestimmt.

Für die Berechnung der Ergebnisse gemäß IFCC, die IFCC Kalibratorwerte (siehe Gebrauchsanweisung Kalibratorserie) oder die folgende Gleichung verwenden:

$$\text{IFCC (mmol/mol)} = (\text{HbA1c in \% NGSP} - 2.15) / 0.0915$$

### REFERENZBEREICH

Gemäß NGSP: < 6 % für Nicht-Diabetiker  
 < 7 % für die glykämische Kontrolle bei Diabetikern

Gemäß IFCC: < 42,0 mmol/mol Hb für Nicht-Diabetiker  
 < 53,0 mmol/mol Hb für die glykämische Kontrolle bei Diabetikern

Jedes Labor sollte wenn möglich seinen eigenen Normalbereich ermitteln. Wenn Hämoglobin A1c für die Überwachung diabetischer Patienten verwendet wird, sollten alle Ergebnisse individuell bewertet werden (der/die Patient/in sollte gegen sich selbst überwacht werden). Hämoglobin A1c reflektiert Änderungen in den Blutzuckerwerten erst mit 3-4 wöchiger Verzögerung.

### TESTPRINZIP

Die Methode verwendet Antigen-Antikörper Interaktionen, um HbA1c direkt in EDTA-Vollblut zu bestimmen. HbA1c in Proben bindet an die Oberfläche von Latexpartikel welche mit Anti-HbA1c (Antigen-Antikörper Reaktion) reagieren und dadurch zu einer Agglutination führen. Das Ausmaß der Agglutination wird als Absorption gemessen. Der HbA1c-Wert wird mithilfe einer Kalibrationskurve ermittelt.

### DIAGNOSTISCHE BEDEUTUNG

Im Lebenszyklus der roten Blutkörperchen wird kontinuierlich HbA1c durch die Bindung von Glukose ans N-terminale Ende der Hämoglobin Beta Kette gebildet. Somit spiegelt der Prozess den durchschnittlichen Kontakt von Hämoglobin und Glukose über einen längeren Zeitraum wieder. Eine Studie von Trivelli et al<sup>1</sup> zeigte, dass bei Diabetikern im Vergleich zu gesunden Individuen 2-3 fache höhere Levels an HbA1c vorliegen. Diverse Wissenschaftler empfehlen die Verwendung von HbA1c als metabolische Kontrolle bei Diabetes mellitus, da HbA1c Werte sich unter glykämischer Kontrolle dem Normalbereich annähern.<sup>2,3,4</sup>

HbA1c wird auch als „schnelle Fraktion“ Hämoglobin (HbA1a, A1b,A1c) bezeichnet, da es bei Säulenchromatographie mit Kationen-Austauscher zuerst eluiert wird. Das nicht glykosylierte Hämoglobin wird als HbA0 bezeichnet.

### LEISTUNGSMERKMALE

#### LINEARITÄT

Der Hämoglobin A1c Messbereich beträgt 0 - 14 % (NGSP).

#### PRÄZISION [%CV]

	Niedrige Konz.	Mittlerer Konz.	Hohe Konz.
Innerhalb der Serie	1.14	0.72	1.22
Zwischen den Serien	1.85	2.05	2.97

#### GENAUIGKEIT[%]

Kontrolle	Bestimmter Wert	Gemessener Wert
DIALAB L1	5.8 (4.9 – 6.7)	6.0
DIALAB L2	10.1 (8.6 – 11.6)	10.1
BIORAD L1	5.48 (4.39 – 6.58)	5.81
BIORAD L2	9.42 (7.54 – 11.3)	9.08

#### METHODENVERGLEICH

Eine Vergleichsstudie von DIALAB HbA1c mit ROCHE ergab folgende Ergebnisse:  $y = 0.9286x + 0.26$  /  $r = 0.9656$

#### SENSITIVITÄT

Die Extinktionsänderung pro Konzentrationseinheit wurde für den ansteigenden Bereich der nicht linearen Kurve bestimmt. Das Ergebnis beträgt 0.0458744 Extinktionsänderung pro Konzentrationseinheit.

#### STÖRENDE SUBSTANZEN

Keine Interferenzen durch:  
 Lipide: 3000 FTU  
 Freies Bilirubin: 30 mg/dL  
 Konjugiertes Bilirubin: 30 mg/dL  
 HbF kann mit dem Reagenz nicht detektiert werden. Erhöhte Konzentrationen von HbF können daher zur Ermittlung niedrigerer HbA1c Werte führen. Für Patienten mit Thalassämie können aufgrund der kurzen Lebensdauer des HbA1c zu niedrige Werte bestimmt werden.

#### QUALITÄTSKONTROLLE

Die Verlässlichkeit von Testergebnissen sollte immer überwacht werden, wenn Patientenproben getestet werden. Kalibratoren und Kontrollmaterial sind zu verwenden. Alle Kontrollen, bei denen % HbA1c-Werte mit dieser Methode gemessen wurden, können verwendet werden. Wir empfehlen das DIALAB HbA1c Direkt Kontrollset. Falls Kontrollen nicht in den angegebenen Bereich fallen, sollten Patientenproben dieses Testlaufs nicht bewertet werden. Der Testlauf sollte wiederholt werden und es ist sicherzustellen, dass alle Misch- und Handlungsanweisungen genau befolgt werden.

#### KALIBRATION

Für diesen Test werden HbA1c Kalibratoren benötigt. Wir empfehlen die DIALAB HbA1c Direkt Kalibrator 5 Level Serie.

#### AUTOMATISIERUNG

Spezielle Adaptionen für automatisierte Systeme sind auf Anfrage erhältlich.

#### WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Die Reagenzien sind nur für die In-Vitro-Diagnostik bestimmt.
2. Natriumazid bildet Blei- oder Kupferazide in Laborleitungen, was bei Erschütterung zu Explosionen führen kann.
3. Jede Spendereinheit, die für die Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet wurde, wurde negativ auf HIV 1&2 –Antikörper, Hepatitis B Oberflächen-Antigen und Anti-Hepatitis C Antikörper unter Verwendung einer FDA-geprüften Methode getestet.
4. Der Test ist nicht für die Diagnose von Diabetes mellitus zu verwenden.

#### ABFALLENTSORGUNG

Die lokalen Bestimmungen sind zu beachten.

#### BIBLIOGRAPHIE

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).

