

## Resine a scambio ionico per la determinazione della glicemoglobina nel sangue

### PRINCIPIO

Una piccola quantità di sangue intero è miscelata con un reattivo lisante al fine di liberare, con l'emolisi dei globuli rossi, tutta l'emoglobina in essi presente. Una aliquota di tale emolisato è quindi posta a diretto contatto con una resina in sospensione che lega l'emoglobina non glicosilata lasciando libera nel soprannatante la parte glicosilata. Questa, a sua volta, è separata mediante filtrazione. Infine si calcola la concentrazione percentuale per via spettrofotometrica.


### REATTIVI - Concentrazione iniziale

**R1** Reattivo lisante (KCN 10 mM + tensioattivo)

**R2** Resina a scambio ionico (resina cationica 8 mg/ml) tamponata a pH 6.9

**R3** Calibratore di glicemoglobina umana.  
Filtri separatori

### Note

 Il reattivo R3 (calibratore) è stato ottenuto utilizzando solo sangue di donatori risultati negativi con tests approvati dall'FDA per la rilevazione di HbsAg, HCV ed anticorpi anti HIV 1/2. Tuttavia, poiché nessun tests è in grado di assicurare che i prodotti derivanti da sangue umano non comportino rischi di trasmissione di agenti infettivi, è necessario considerare il prodotto comunque potenzialmente a rischio e conseguentemente manipolarlo con le stesse precauzioni che si usano per i campioni prelevati dai pazienti.

- La resina a scambio ionico può causare irritazioni. Evitare il contatto con occhi, pelle ed indumenti. In caso di contatto lavare abbondantemente con acqua.

- Il reattivo lisante contiene cianuro di potassio. Non mescolare con acidi ed al termine delle analisi lavarsi accuratamente e d'abbondantemente le mani.

- Sia il liquido sopra la resina a scambio ionico che il reattivo lisante devono essere limpidi e incolore. Torbidità o scolorimento indicano deterioramento ed i reattivi non devono essere utilizzati.

### CAMPIONI

- Sangue intero con EDTA.

### Note

- Trattare i campioni con le stesse precauzioni utilizzate per tutti i campioni di sangue umano.

- Non è richiesto nessun altro speciale additivo o conservante oltre agli anticoagulanti.

- L'iperlipemia può causare valori falsamente elevati. Per campioni fortemente lipemici centrifugare le emazie e rimuovere il plasma lipemico rimpiazzandolo con eguale quantità di soluzione salina. Risospendere le emazie nella soluzione salina e procedere con il test. L'HbS e l'HbC glicosilate si legano fortemente alla resina producendo valori falsamente ribassati. L'emoglobina fetale (HbF) non interferisce significativamente nel metodo. Una frazione instabile (aldimina) viene eliminata durante il mescolamento delle resine e non contribuisce al valore della glicemoglobina.

- La glicemoglobina nei campioni è stabile 7 giorni a 2-8°C.

### CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit a 2-8°C.

- I reattivi **R1** e **R2** sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulla confezione.

- Il reattivo **R3**, ricostituito con 1 ml di H<sub>2</sub>O, è stabile 14 giorni a 2-8°C chiuso perfettamente o congelato per 8 settimane. Usare immediatamente dopo lo scongelamento.

### MATERIALI AUSILIARI

Materiali necessari non contenuti nel kit: spettrofotometro o colorimetro con filtro a 415 nm, micropipette (da 0.02 ml e 0.10 ml), pipette (da 0.50 ml, 3.0 ml e 5 ml), centrifuga e provette per campioni.

### CONTROLLO DI QUALITÀ

L'affidabilità del test deve essere monitorata in routine utilizzando idoneo materiale di controllo testato allo stesso modo dei campioni.

### SMALTIMENTO RIFIUTI

Il prodotto deve essere smaltito secondo le locali normative in materia di gestione dei rifiuti.

### PROCEDIMENTO

#### Nota

La resina ed il lisante devono essere portati a temperatura ambiente prima di iniziare il test.

#### Preparazione dell'emolisato

	CALIBRATORE	CONTROLLO	CAMPIONE
<b>LISANTE</b>	500 µl	500 µl	500 µl
<b>CALIBRATORE</b>	100 µl	--	--
<b>CONTROLLO</b>	--	100 µl	--
<b>CAMPIONE</b>	--	--	100 µl

Mescolare con estrema cura onde raggiungere una completa lisi dei globuli rossi, quindi lasciar riposare per 5 min.

#### Separazione della glicemoglobina

#### Nota

Prima dell'uso mescolare bene la resina capovolgendo la provetta almeno per 6 volte. Agitare prima di ogni uso.

- Porre nelle provette con resina 100 µl di emolisato relativo al calibratore, controllo e campioni.

- Inserire in ogni provetta un filtro separatore e sospingere quest'ultimo verso il basso finché il suo margine inferiore in gomma non si trovi a circa 2 cm dal liquido sottostante.

- Mescolare per 5'.

- Sospingere nuovamente il filtro verso il basso fino a quando la resina non risulti pressata.

- Azzerare lo spettrofotometro con acqua deionizzata e leggere a 415 nm l'assorbanza del calibratore, dei controlli e dei campioni. **Queste letture sono per la glicemoglobina.**

#### Emoglobina totale

Gli emolisati relativi al calibratore, controllo e campioni, vanno analizzati come segue:

	CALIBRATORE	CONTROLLO	CAMPIONE
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5000 µl	5000 µl	5000 µl
<b>CALIBRATORE</b>	20 µl	--	--
<b>CONTROLLO</b>	--	20 µl	--
<b>CAMPIONE</b>	--	--	20 µl

Azzerare lo spettrofotometro con acqua deionizzata e leggere a 415 nm l'assorbanza del calibratore, dei controlli e dei campioni.

#### Nota

I risultati devono essere letti entro un'ora.

#### CALIBRAZIONE

Il calibratore della glicemoglobina ha un valore assegnato stabilito con un metodo di riferimento standard.

#### CALCOLO

Calcolare per ciascun campione e per il calibratore il rapporto (**R**) tra l'assorbanza della glicemoglobina e l'assorbanza della relativa emoglobina totale.

$$R(\text{camp.}) / R(\text{cal}) \times \text{conc. cal} = \text{Glicemoglobina HbA1 (\%)}$$

Il rapporto "R" (calibratore) è valido per tutto il kit e non è necessario ricalcolarlo di volta in volta.

## LIMITI DEL METODO

- I campioni di sangue con emoglobina totale maggiore di 18 g/dl devono essere diluiti 1:2 con soluzione salina prima del test.

## VALORI ATTESI

### Emoglobina totale (Hb tot)

VALORI NORMALI	6.0 - 8.3 %
CONTROLLO NORMALE	7.5 - 9.0 %
ELEVATO	9.0 - 10.0 %
BASSO	> 10.0 %

### Emoglobina HbA1C

VALORI NORMALI	4.2 - 6.2 %
CONTROLLO NORMALE	5.5 - 6.8 %
ELEVATO	6.8 - 7.6 %
BASSO	> 7.6 %

## STIMA DEL GLUCOSIO NEL SANGUE

In uno studio effettuato dal Dr. D.M. Nathan il test della glicemoglobina ha mostrato una correlazione lineare con la media dei risultati glicemici nel sangue di pazienti con frequenti monitoraggi.

## BIBLIOGRAFIA

- Trivelli, L.A., Ranney, H.M. and Lai, H.T. New Eng. J. Med. 284, 353 (1971).  
Goen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, (1978).  
Gabby, 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 Manag., Vol 16 (Jan 1978).  
Nathan, D.M., et al., The Clinical Information Value of the Glycosylated Hemoglobin Assay, The New England Journal of Medicine 310, 341-346 (1984).

## SIMBOLOGIA



Consultare istruzioni per l'uso



Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)



Limiti temperatura di conservazione



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Fabbricante

- Campioni di pazienti con emoglobinopatie o emivita delle emazia diminuite possono portare a dei risultati sbagliati (v. la sezione "CAMPIONI").

## PRESTAZIONI DEL REATTIVO

### Interferenze

La bilirubina non interferisce con il test.  
I sieri iperlipemici o torbidi possono interferire.  
L'interferenza dell'emoglobina non è valutabile.

### Linearità

La reazione è lineare sino alla concentrazione di 20 %. Campioni superiori a 20 % devono essere diluiti con soluzione fisiologica. Moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

### Precisione "intra-Assay" (NELLA SERIE)

Determinata su 5 replicati per ciascun controllo (N-H) (Normal-High).

Risultati ottenuti:

MEDIA (%)	N = 7.56	H = 11.90
D.S.	0.09	0.10
C.V.%	1.18	0.84

### Precisione "inter-Assay" (FRA LE SERIE)

Determinata su 5 replicati per ciascun controllo (N-H) per 3 giorni.

Risultati ottenuti:

MEDIA (%)	N = 7.58	H = 11.91
D.S.	0.08	0.09
C.V.%	1.10	0.79

### Sensibilità analitica

Soglia di sensibilità espressa dal metodo: 0.0151 %

### Correlazione

Il sistema correlato con un sistema analogo ha dato una correlazione pari al 98%.

## Ione exchange resin for glycohemoglobin detection in blood

### PRINCIPLE

A small quantity of whole blood is mixed with a lysing reagent to eliminate, with haemolysis red cells, all the hemoglobin present in them. A part of this hemolyzed preparation is in direct contact to a weak binding cation exchange resin which bind to the hemoglobin not glycosylated making free from the supernatant liquid the glycated part. This one is separated by filtration. The percentage of glycohemoglobin is determined by spectrophotometer.

### REAGENTS

- R1** Lysing reagent (KCN 10 nM + surfactant)  
**R2** Ione exchange resin (cation resin 8 mg/ml) buffered at pH 6.9  
**R3** Glycohemoglobin calibrator  
 Separator filters

### Note

**R3 reagent (calibrator)** is obtained using only blood of donors tested by an FDA method and found non-reactive for HbsAg and negative for antibodies to HIV-1/2 and HCV. However, no known test method can offer complete assurance that products derived from human blood will not transmit infectious diseases, this product should be handled as potentially infectious biological material.

- The ione exchange resin may cause irritation. Avoid contact with eyes, skin and clothing. In case of contact wash with large amounts of water.
- The lysing reagent contains cyanide. Do not mix acids. Wash hands after handling, discard by flushing with large amounts of water.
- The supernatant liquid above the resin and the lysing reagent should be clear and colourless. Turbidity or discoloration would indicate deterioration and the reagent should not be used.

### SAMPLE

- Whole blood collected with EDTA.

### Note

- Handle with same precautions used for all human blood samples.
- No special additives or preservatives other than anticoagulants are required.
- Gross lipemia may cause falsely high results. For grossly lipemic samples centrifugate the red cells and remove the lipemic plasma replacing it with an approximately equal amount of saline and proceed with performances of test. Glycosylated HbS and HbC bind lightly to the resin which produces falsely low results. Fetal hemoglobin (HbF) does not interfere significantly in the assay. The unstable fraction (aldimine) is eliminated during resin mixing and does not contribute to the glycohemoglobin value.
- Glycohemoglobin in the sample is stable for 7 days at 2-8°C.

### STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2-8°C.
- Reagent **R1** and **R2** are stable until expiration date showed on the package.
- Reagent **R3**, reconstituted with 1 ml of H<sub>2</sub>O, is stable 14 days at 2-8°C sealed tightly or frozen for 8 weeks. Removed from refrigerator must be used immediately.

### AUXILIARY EQUIPMENT

Materials not included in the kit: spectrophotometer or colorimeter calibrated at 415 nm, micropipettes (from 0.02 ml to 0.10 ml), pipettes (from 0.50 ml, 3.0 ml and 5 ml), rocker or rotator and test tubes.

### CONTROLLO DI QUALITÀ

The reliability of test results should be monitored routinely using suitable quality control materials analyzed in the same manner of samples.

### WASTE MANAGEMENT

Please refer to the local legal requirements.

## PROCEDURE

### Note

Resin and lysing reagent must be at room temperature before starting the test procedure.

### Hemolysate preparation

	CALIBRATOR	CONTROL	SAMPLE
LYSING REAGENT	500 µl	500 µl	500 µl
CALIBRATOR	100 µl	--	--
CONTROL	--	100 µl	--
SAMPLE	--	--	100 µl

Mix carefully until complete lysis is evident, then allow to stand for 5 min.

### Glycohemoglobin seaparation

### Note

Before use, mix the resin well by inverting the vial at least six times. Swirl the vial between each dispensing.

- Place into the resin tube 100 µl of the hemolysate relates to calibrator, control and samples.
- Put the filter separator in the tube so that the rubber sleeve is approximately 2 cm above the liquid level.
- Mix for 5'.
- Push the filter separator into the tube until the resin is firmly packed.
- Adjust the instrument to zero using deionized water, than read at 415 nm absorbance values for calibrator, control, samples. **These readings are for glycohemoglobin.**

### Total Hemoglobin fraction

The hemolysates obtained from calibrator, control and samples have to be analyzed as follows:

	CALIBRATOR	CONTROL	SAMPLE
H <sub>2</sub> O	5000 µl	5000 µl	5000 µl
CALIBRATOR	20 µl	--	--
CONTROL	--	20 µl	--
SAMPLE	--	--	20µl

Adjust the instrument to zero using deionized water, than read at 415 nm absorbance values for calibrator, control, samples.

### Note

The test samples should be read within 1 hour.

### CALIBRATION

Glycohemoglobin calibrator has an assigned value established by an accepted standard reference method.

### CALCULATION

For each sample and for the calibrator, calculate the ratio (**R**) of the glycohemoglobin absorbance to the total hemoglobin absorbance

$$R (\text{sample.}) / R(\text{cal}) \times \text{conc. cal} = \text{Glycohemoglobin HbA1 (\%)}$$

The ratio "R" (calibrator) is valid for all test performed with the kit.

### LIMITATIONS

- Blood samples with total hemoglobin greater than 18 g/dl should be diluted 1:2 with saline before assay.
- Samples from patients with hemoglobinopathies of decreased red cell survival times may show incorrect results (see "SAMPLES" section).

## EXPECTED VALUES

### Total hemoglobin (Hb tot)

NORMAL VALUES	6.0 - 8.3 %
NORMAL CONTROL	7.5 - 9.0 %
HIGH	9.0 - 10.0 %
LOW	> 10.0 %

### Hemoglobin HbA1C

NORMAL VALUES	4.2 - 6.2 %
NORMAL CONTROL	5.5 - 6.8 %
HIGH	6.8 - 7.6 %
LOW	> 7.6 %

## BLOOD GLUCOSE ESTIMATE

In a test study performed by Dr. D.M. Nathan the glycohemoglobin test was shown to have a linear correlation with mean blood glucose results from patients performing frequent self-monitoring of their blood glucose levels.

## BIBLIOGRAPHY

Trivelli, L.A., Ranney, H.M. and Lai, H.T. New Eng. J. Med. 284, 353 (1971).  
 Goen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, (1978).  
 Gabby, 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 Manag., Vol 16 (Jan 1978).  
 Nathan, D.M., et al., The Clinical Information Value of the Glycosylated Hemoglobin Assay, The New England Journal of Medicine 310, 341-346 (1984).

## SYMBOLS



Read instruction for use



CE mark (requirement of 98/79 regulation)



Storing temperature limits



In vitro medical device



Producer

## ANALYTICAL PERFORMANCES

### Interferences

Bilirubin does not interfere with the test.  
 Grossly lipemic or turbidity serum may interfere.  
 The hemoglobin interference is not valuable.

### Linearity

Reaction is linear up to a concentration of 20 %. Samples with values exceeding 20 % must be diluted with saline solution. Multiply, then, the result for diluting factor.

### “Intra-Assay” precision (within-Run)

Determined on 5 samples for each control (N-H) (Normal-High).  
 Results:

MEAN (%)	N = 7.56	H = 11.90
S.D.	0.09	0.10
C.V.%	1.18	0.84

### “Inter Assay” precision (between-Run)

Determined on 5 samples for each control (N-H) for 3 days  
 Results:

MEAN (%)	N = 7.58	H = 11.91
S.D.	0.08	0.09
C.V.%	1.10	0.79

### Analytical sensitivity

The test sensitivity in terms of detection limit is 0.0151%.

### Correlation

A study based comparing this method with a similar method has given a correlation of 98%.