

Hemoglobina glicosilada

Turbidimetría látex

Determinación cuantitativa de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) en sangre humana

IVD

Conservar a 2 - 8°C.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Este método utiliza la interacción de antígeno y anticuerpo para determinar directamente HbA_{1c} en sangre total. La hemoglobina total y Hb_{1c} tienen la misma absorción inespecífica para las partículas de látex. Cuando se añade el anticuerpo monoclonal anti-HbA_{1c} (ratón) (R2), se forma el complejo latex HbA_{1c}- anticuerpo HbA_{1c} de ratón. Se produce aglutinación cuando el anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón interactúa con el anticuerpo monoclonal. La cantidad de aglutinación es proporcional a la cantidad de HbA_{1c} absorbida en la superficie de las partículas de látex. La cantidad de aglutinación se mide como absorbancia. El valor de HbA_{1c} se obtiene de la curva de calibración.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A lo largo de la vida circulatoria de los hematíes, se forma continuamente hemoglobina A_{1c} por la adición de glucosa al grupo N- terminal de la cadena beta de la hemoglobina. Este proceso, que es no -enzimático, refleja la exposición media de hemoglobina a glucosa durante un periodo prolongado. En un estudio clásico, Trivelli et al¹ mostró que la Hemoglobina A_{1c} se incrementa 2-3 veces en individuos con diabetes en comparación con individuos normales. Varios investigadores han recomendado que Hemoglobina A_{1c} sirve como indicador del control metabólico de diabéticos, ya que los niveles de Hemoglobina A_{1c} alcanzan valores normales para diabéticos en control metabólico.^{2,3,4} La Hemoglobina A_{1c} se ha definido como la 'fracción rápida' de hemoglobina (Hb_A, A₁B, A₁C) que eluye la primera en una cromatografía de columna con resinas de intercambio catiónico. La hemoglobina no-glicosilada, que consiste en la mayor parte de hemoglobina, se ha designado como HbA₀. Este procedimiento utiliza una reacción antígeno-anticuerpo para determinar directamente la concentración de HbA_{1c}.

REACTIVOS

R1	Latex 0,13%, Tampón, estabilizante.
R2	Anticuerpo monoclonal anti-HbA _{1c} (ratón) 0,05 mg/mL, anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-ratón 0,08 mg/dL, tampón, estabilizantes
R3(Reactivo hemolizante)	Agua y estabilizantes
Opcional	HbAB1Bc CALIBRADOR (4 niveles). HbAB1Bc CONTROL. (2 niveles)

PRECAUCIONES

Todas las muestras humanas se deben tratar como potencialmente biopeligrosas. Por tanto se deben usar las precauciones universales de tratamiento de muestras (guantes, vestimenta de laboratorio, evitar producción de aerosoles, etc.)

PREPARACIÓN

R1, R2 y R3 están listos para su uso. Mezclar suavemente antes de usar.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el envase cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No deben dejarse los reactivos dentro del analizador después de su uso; conservar refrigerados a 2-8°C. El látex puede sedimentar. Agitar suavemente los reactivos antes de usar.

No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

R1 y R2 una vez abiertos son estables durante al menos 1 mes si se conservan a 2-8°C.

Indicadores de deterioro de los reactivos: Alteraciones en el aspecto físico de los reactivos o valores de los controles fuera del rango establecido.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 660 nm.
- Equipamiento habitual de laboratorio ^(nota 1)

MUESTRAS

No es necesaria una preparación especial del paciente, ni condiciones de alimentación específicas. No se requiere de otros aditivos ni conservantes especiales aparte de anticoagulantes. Recoger la sangre venosa con EDTA usando técnicas asépticas. HbA_{1c} en sangre total recogida con EDTA es estable durante 1 semana a 2-8°C. Para determinar HbA_{1c}, se debe preparar un hemolizado para cada muestra:

1. Dispensar 1 mL de Reactivo hemolizante en tubos etiquetados: Calibrador, Control, pacientes, etc. Nota: Son válidos tubos de plástico o vidrio de tamaño apropiado.
2. Colocar 20 µL de sangre total bien mezclada en el tubo correctamente etiquetado. Mezclar.
3. Dejar reposar durante 5 minutos o hasta que sea evidente la lisis completa. Los hemolizados se pueden conservar durante 10 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones de ensayo:
Longitud de onda: 660 nm (600 – 660)
Temperatura: 37°C
Paso de luz de la cubeta: 1 cm
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta ^(nota 2)

R1 (µL)	360
Calibrador o muestra (µL)	10

4. Mezclar e incubar 5 minutos.

5. Pipetear en la misma cubeta:

R2 (µL)	120
---------	-----

6. Mezclar y leer la absorbancia (A) a los 5 minutos de la adición del Reactivo R2.

CÁLCULOS

Concentración HbA_{1c} (%)

Representar la absorbancia (A) obtenida frente a las concentraciones de HbA_{1c} de cada Calibrador (del 1 al 4). El porcentaje de HbA_{1c} en la muestra se calcula por interpolación de su absorbancia (A) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático.

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA

Valores recomendados: inferior a 6% para no-diabéticos, inferior a 7% para control glicémico de persona con diabetes.

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. En el uso de Hemoglobina A_{1c} para el control de pacientes diabéticos, los resultados se deben interpretar individualmente. Significa que el paciente se debe controlar frente a él mismo. Hay un intervalo de tiempo de 3-4 semanas antes que Hemoglobina A_{1c} refleje cambios en el nivel de glucosa en sangre.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 2% hasta el límite de linealidad de 16%.

	Intraserie (n = 20)		Interserie (n=20)	
	Media (%)	SD	Media (%)	SD
Media (%)	5.95	12.15	5.97	12.21
SD	0.19	0.18	0.14	0.15
CV (%)	3.20	1.47	2.31	1.24

Sensibilidad analítica: 1% = 0,056 (A)

Exactitud: Los reactivos REACTIVA SEARCH (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 40 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,995.

Ecuación de la recta de regresión: y=0,989x - 0,047

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES

1. Bilirrubina hasta 50 mg/dL, ácido ascórbico hasta 50 mg/dL, triglicéridos hasta 2000 mg/dL, Hb carbamylada hasta 7,5 mmol/L y Hb acetilada hasta 5,0 mmol/L no interfieren en el ensayo.
2. Los resultados pueden ser inconsistentes en pacientes con las siguientes condiciones: adicción de opiáceos, envenenamiento por plomo, alcoholismo, grandes ingestas de aspirina.^{5, 7, 8, 9}
3. Se ha demostrado que valores elevados de HbF pueden conducir a una infravaloración de HbA_{1c}, y que la uremia no interfiere con la determinación de HbA_{1c} por inmunoensayo¹⁰. También se ha demostrado que intermedios lábiles (base Schiff) no son detectados y no interfieren con la determinación de HbA_{1c} por inmunoensayo.
4. Se ha determinado que las variantes de Hemoglobina HbA₂, HbC y HbS no interfieren con este método.
5. No se han evaluado otras variantes raras de hemoglobina (ej. HbE).

NOTAS

1. Para evitar la contaminación, se recomienda el uso de material desechable.
2. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.

BIBLIOGRAFÍA

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).
5. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.794-795 (1999).
6. Ceriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1982).
7. Little, R.R., et al, Clin. Chem. 32, pp. 358-360 (1986).
8. Fluckiger, R., et al, New Eng.J. Med. 304 pp. 823-827 (1981).
9. Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, pp. 466-469 (1983).
10. Engbaek, F., et al, Clin. Chem. 35, pp. 93-97 (1989).
11. American Diabetes Association: Clinical Practice Recommendations (Position Statement). Diabetes Care 24 (Suppl. 1): S33-S55, (2001).

CODIGO: RS29066