



HbA1c

enzymatic

Método enzimático para la determinación de HbA1c en sangre entera

SIGNIFICACION CLINICA

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, que comprende un conjunto de desórdenes del metabolismo de los hidratos de carbono que cursan con una manifestación común: la hiperglicemia.

El control glicémico periódico permite prevenir los trastornos agudos y reducir el riesgo de las complicaciones tardías de la enfermedad (retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedades cardiovasculares).

La relación entre el desarrollo y progresión de las complicaciones microvasculares y el control glicémico ha sido debatida por muchos años, en parte debido a los métodos inadecuados para realizar un control glicémico retrospectivo. Los métodos tradicionales de medición de glucosa en sangre y orina tienen un valor limitado para este propósito, y sólo fue con el desarrollo de determinaciones para proteínas glicosiladas o glicadas, que se ha logrado un conocimiento exacto y objetivo del estado glicémico a largo plazo. Las glicohemoglobinas, también llamadas hemoglobinas glicosiladas o glicadas, fueron descritas por primera vez en 1968 por Rahbar como "hemoglobinas diabéticas". Su producción depende de la concentración de glucosa y ocurre a través de un proceso no enzimático post-traducciona llamado glicación, donde el azúcar es unido a los grupos amino de las moléculas de hemoglobina (Hb). La glicación de los aminoácidos N terminales de las cadenas α y β como así también los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina en la molécula de hemoglobina, resultan en una variedad de hemoglobinas glicadas, incluyendo HbA1c, que es la especie glicosilada en la valina N-terminal de la cadena β . Los niveles de %HbA1c son proporcionales a la concentración de glucosa en sangre durante las últimas 6-8 semanas. Así, la determinación de %HbA1c provee un parámetro integral para monitorear el curso del control de glucosa a largo plazo.

FUNDAMENTOS DEL METODO

HbA1c enzymatic es un método enzimático en el cual muestras de sangre entera lisadas son sometidas a una digestión proteica por medio de una proteasa. Este proceso libera aminoácidos, incluyendo valinas glicadas de las cadenas beta de hemoglobina. Las valinas glicadas actúan como sustratos de la enzima fructosil valina oxidasa (FVO). Esta enzima cliva específicamente valinas N terminales y genera peróxido de hidrógeno. Este último a su vez, es cuantificado en una reacción catalizada por la peroxidasa (POD) en presencia de un cromógeno. No es necesaria una medida separada de la hemoglobina total (Hb).

La concentración de HbA1c se expresa directamente como %HbA1c.

REACTIVOS PROVISTOS

A₁. Reactivo A₁: buffer de Goods 5 mM, pH 7,0, Tritón X-100 0,5% y proteasas 4 kU/ml.

A₂. Reactivo A₂: buffer de Goods 1 mM, pH 6,3.

B. Reactivo B: buffer Tris 15 mM, pH 8,0, FVO > 10 U/ml, POD 90 U/ml y cromógeno 0,8 mM.

REACTIVOS NO PROVISTOS

- **HbA1c enzymatic Lysis Buffer** de Wiener lab.

- **HbA1c enzymatic Control** de Wiener lab.

- **HbA1c enzymatic Calibrator** de Wiener lab.

- Agua desmineralizada.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivos A₁, A₂ y B: listos para usar para analizadores capaces de trabajar con tres reactivos.

Para analizadores que trabajen con dos reactivos, premezclar los reactivos A₁ y A₂ en una relación 7:3 respectivamente. Mezclar por inversión y dejar en reposo a 2-10°C por al menos 12 horas previas al uso.

HbA1c enzymatic Lysis buffer: listo para usar.

PRECAUCIONES

Los Reactivos Provistos son para uso diagnóstico "in vitro". Los reactivos A₂ y B son fotosensibles. Conservar en lugar oscuro.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los **Reactivos Provistos** son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

Reactivos A₁, A₂ y B: una vez abiertos se recomienda conservar los reactivos en refrigerador (2-10°C) bien cerrados. No congelar.

Reactivos A₁ y A₂ premezclados: estables 4 semanas a 2-10°C

HbA1c enzymatic Lysis Buffer: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta. Evitar contaminaciones (no introducir pipetas u otros elementos en su interior. Cerrar el frasco luego de su uso.

MUESTRA

Sangre entera anticoagulada

- a) Recolección:** obtener la muestra de la manera usual.
- b) Aditivos:** se recomienda el uso de EDTA (**Anticoagulante W** de Wiener lab) como anticoagulante.
- c) Sustancias interferentes conocidas:** no se observan interferencias por bilirrubina (conjugada y no conjugada) hasta 15 mg/dL, triglicéridos hasta 2000 mg/dL, ácido ascórbico hasta 25 mg/dL, glucosa hasta 4000 mg/dL, ácido úrico hasta 20 mg/dL y urea hasta 100 mg/dL. Deberán interpretarse con cuidado los valores de %HbA1c obtenidos en aquellas patologías o situaciones que alteran la vida media de los eritrocitos, como anemias hemolíticas, anemias ferropénicas, transfusiones, pérdidas de sangre, etc.

Referirse a las bibliografías de Young para los efectos de las drogas y las enfermedades en el presente método.

- d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** la muestra es estable 3 días a temperatura ambiente (15-25°C) o 14 días refrigerada (2-10°C).

PREPARACION DE LA MUESTRA

Permitir que **HbA1c enzymatic Lysis Buffer** tome temperatura ambiente antes de usar. Homogeneizar la muestra de sangre por inversión repetida, hasta obtener una suspensión completa, evitando la formación de espuma.

En un tubo de Kahn o hemólisis, agregar:

HbA1c enzymatic Lysis Buffer	250 uL
Muestra	20 uL

Mezclar, agitando por inversión repetida o bien emplear vórtex. Evitar la formación de espuma. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por al menos 10 minutos para asegurar la lisis completa de los eritrocitos. La muestra hemolizada podrá ser empleada una vez obtenida una solución roja oscura y limpia, sin partículas en solución.

Los calibradores y controles deben ser tratados exactamente igual que las muestras de pacientes.

Estabilidad de las muestras hemolizadas: estables 4 horas a temperatura ambiente (< 25°C).

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Analizador automático.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de Kahn o hemólisis.

CONDICIONES DE REACCION

Parámetros generales para analizadores automáticos capaces de trabajar con 3 reactivos:

HbA1c enzymatic es un método de punto final y el primer punto de lectura es inmediatamente anterior al agregado del reactivo B.

Nombre del test	HbA1c enzymatic
Tipo de reacción	Punto final
Long. de onda primaria	700 nm
Long. de onda secundaria	800 nm
Temperatura	37°C
Volumen de Reactivo A ₁	112 uL
Volumen de muestra	25 uL
Incubación	120 segundos
Volumen de Reactivo A ₂	48 uL
Incubación	300 segundos
Volumen de Reactivo B	70 uL
Incubación	180 segundos
Calibración	2 puntos
Calibradores	1 y 2

Parámetros generales para analizadores automáticos capaces de trabajar con 2 reactivos:

HbA1c enzymatic es un método de punto final y el primer punto de lectura es inmediatamente anterior al agregado del reactivo B. Premezclar los reactivos A₁ y A₂ como se describe en la sección preparación de reactivos.

Nombre del test	HbA1c enzymatic
Tipo de reacción	Punto final
Long. de onda primaria	700 nm
Long. de onda secundaria	800 nm
Temperatura	37°C
Volumen de Reactivo A ₁₋₂	160 uL
Volumen de muestra	25 uL
Incubación	300 segundos
Volumen de Reactivo B	70 uL
Incubación	180 segundos
Calibración	2 puntos
Calibradores	1 y 2

Los volúmenes de muestra y reactivos pueden variarse proporcionalmente, sin que se alteren los factores de cálculo. Solicitar aplicaciones para los analizadores comercializados por Wiener lab. Las aplicaciones no provistas por Wiener lab. deben ser validadas.

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Los valores de %HbA1c son expresados directamente según el National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) y el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Los resultados según DCCT/NGSP (%) pueden ser convertidos a IFCC (%) a través de la siguiente fórmula: IFCC (%) = [NGSP (%) - 2,15] / 0,915

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

HbA1c enzymatic Control de Wiener lab.

Los controles requieren tratamiento previo con el reactivo **HbA1c enzymatic Lysis buffer** al igual que los calibradores y muestras de pacientes.

VALORES DE REFERENCIA

Personas con metabolismo sano, de acuerdo a DCCT/NGSP: 4,8-5,9% de HbA1c.

En base a los estudios de DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) se considera que niveles mayores a 7% de HbA1c se asocian a mayor riesgo de complicaciones crónicas. En general se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia, dentro de su población de pacientes.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.
Se recomienda realizar una calibración completa, cuando se cambia de lote de reactivo y/o de lote de **HbA1c enzymatic Lysis Buffer** o cuando el control de calidad así lo determina. Este método fue diseñado para informar %HbA1c, por lo que no deben ser informados por separado los valores de HbA1c y Hb.

El kit **HbA1c enzymatic** debe ser usado siempre que el valor de hemoglobina del paciente se encuentre dentro del rango 9-21 g/dL. No utilizar este método para valores de Hb fuera de este rango.

Para preservar la integridad de los reactivos debe evitarse todo tipo de contaminaciones, empleando para la medición únicamente micropipetas perfectamente limpias y secas.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: fue evaluada a través del protocolo EP15-A de CLSI. Para ello se procesaron en Wiener lab CT600i, 3 muestras con niveles diferentes de HbA1c, obteniéndose los siguientes resultados:

Precisión intraensayo

Nivel	D.S.	C.V.
5,39 %	0,04 %	0,72 %
10,89 %	0,06 %	0,56 %
12,11 %	0,09 %	0,71 %

Precisión total

Nivel	D.S.	C.V.
5,39 %	0,07 %	1,32 %
10,89 %	0,09 %	0,82 %
12,11 %	0,19 %	1,54 %

b) Límite de detección: 4%. (%HbA1c).

c) Linealidad: HbA1c enzymatic posee un rango lineal entre 4% y 14%. Muestras con valores superiores a 14% no deben ser diluidas y ensayadas nuevamente. Los resultados deben ser reportados como mayores a 14% (> 14%).

PRESENTACION

1 x 18 mL Reactivo A₁
1 x 8 mL Reactivo A₂
1 x 12 mL Reactivo B
(Cód. 1999735)

1 x 18 mL Reactivo A₁
1 x 8 mL Reactivo A₂
1 x 12 mL Reactivo B
(Cód. 1009368)

Wiener lab. provee separadamente:

HbA1c enzymatic Lysis Buffer: 1 x 50 mL (Cód.1999729)

BIBLIOGRAFIA

- Rahbar, S. - Clin. Chim. Acta 22:296 (1968).
- Bunn, H. et al - Science 200:21 (1978).
- Goldstein, D. et al - Diabetes Care 17:938 (1994).
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N. Engl. J. Med. 329:977 (1993).
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group - Lancet 352:837 (1998).
- Weykamp C.W. et al - Clin. Chem. 41:82 (1995).
- Sacks, D. - Clin. Chem. 49:1245 (2003).
- Martina, W. et al - Clin. Chem. 39:2259 (1993).
- Karl, J. et al - Klin. Lab. 39:991 (1993).
- American Diabetes Association - Diabetes Care [Supl] 24/1(2001).
- John, G. - Clin. Chem. Lab. Med. 41:1199 (2003).
- Jeppsson, J. et al - Clin. Chem. Lab. Med. 40:78 (2002).
- Jarausch, J. et al - Clin. Chem. 42:116 (Abstract 094) (1996).
- Junge, W. et al - Poster presentation 18th International Diabetes Federation Congress, Paris 2003.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Burtis, C.; Ashwood, E. (5ª Ed.) WB Saunders, 2001.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- Young D.S. - "Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) Protocols EP15-A, 1999 / EP17-A, 2004.

Símbolos

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.



Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Uso diagnóstico "in vitro"



Contenido suficiente para <n> ensayos



Fecha de caducidad



Límite de temperatura (conservar a)



No congelar



Riesgo biológico



Volumen después de la reconstitución



Contenido



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar instrucciones de uso



Calibrador



Control



Control Positivo



Control Negativo



Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
PM-1102-71



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina