

COD 13044 1 x 50 mL
CONSERVAR A 2-8°C
Reactivos para medir la concentración de HbA1C Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico

HEMOGLOBIN A1C-TURBI
(HbA1C-TURBI)



HEMOGLOBINA A1C
TURBIDIMETRÍA

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Después de preparar un hemolizado empleando como detergente Bromuro de tetradeciltrimetilamonio (TTAB), la concentración de la hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) se cuantifica mediante un procedimiento inmunoturbidimétrico de inhibición. En primer lugar, mediante la adición de la muestra a un reactivo formado por anticuerpos dirigidos contra un sitio específico de la HbA_{1c}, se forman complejos solubles formados por la unión de ambas moléculas. Tras la adición a la mezcla de reacción de un segundo reactivo compuesto por polihaptenos, los anticuerpos anti-HbA_{1c} excedentes forman complejos insolubles, anticuerpo-polihapteno, que se miden turbidimétricamente. La estimación del porcentaje de la Hb A_{1c} se realiza por medición de la concentración de la hemoglobina total por espectrometría¹.

COMPOSICIÓN

- A. Reactivo: 2 x 95 mL. TTAB 9 g/L.
 B. Reactivo: 1 x 40 mL. Tampón fosfatos 20 mmol/L, pH 7,4.
 C. Reactivo: 1 x 40 mL. Tampón MES 25 mmol/L, Tampón TRIS 15 mmol/L, anticuerpos de cabra anti-HbA1C, pH 6,2.
 D. Reactivo: 1 x 10 mL. Tampón MES 25 mmol/L, Tampón TRIS 15 mmol/L, polihapteno HbA1C ≥ 8 µg/mL, pH 6,2.
 S1-S4 Patrones de HbA1C. 1 x 2 mL. Sangre humana y sangre ovina, TTAB 80 g/L.

La sangre humana utilizada en la preparación de los patrones era negativa para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, los patrones deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

Irritante (X_i): R36/38: Irrita los ojos y la piel. S24/25: Evítese el contacto con los ojos y la piel.

Utilizar únicamente reactivos B, C, D y S1-S4 del mismo número de lote.

CONSERVACIÓN

Conservar a 2-8°C.

Los Reactivos y los patrones son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre que se conserven bien cerrados y se evite la contaminación durante su uso.

Indicaciones de deterioro:

- Reactivo A: Presencia de partículas, turbidez.
- Reactivo B: Absorbancia del blanco superior de Hb Total a 0,010 a 560 nm.
- Reactivo C y D: Absorbancia del blanco inferior de HbA1C a 0,650 a 340 nm.
- Patrones de HbA1C S1-S4: Presencia de humedad.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Los Reactivos (A), (B), (C) y (D) están listos para su uso.

Patrones de HbA1C (S1-S4): Reconstituir el liofilizado con 2,0 mL de agua destilada. La concentración de HbA1C y de hemoglobina viene indicada en la etiqueta del vial. Estable 8 horas a 15-25°C, 2 días a 2-8°C y 3 meses a -20°C. Congelar sólo una vez.

MUESTRAS

Sangre capilar o venosa recogida mediante procedimientos estándar y con heparina o EDTA como anticoagulante.

HbA1C en sangre es estable 3 días a 15-25°C, 7 días a 2-8°C y 6 meses a -20°C. Congelar sólo una vez.

VALORES DE REFERENCIA

Los siguientes valores discriminantes han sido establecidos por el Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) y han sido aceptados en varios países para la población no diabética y para la evaluación del grado de control de la glucosa en sangre en pacientes diabéticos^{2,3}.

DCCT / NGSP	IFCC	Grado de control
4,0 - 6,0	2,0 - 4,2	No diabético
6,0 - 6,5	4,2 - 4,8	Objetivo
6,5 - 8,0	4,8 - 6,4	Buen control
> 8,0	> 6,4	Precisa actuación

CALIBRACIÓN

Hemoglobina:

- Blanco: Realizar el blanco del reactivo con cloruro de sodio 154 mmol/L.
- Calibrador: Patrón S4. El valor de concentración de hemoglobina es trazable al Patrón de Referencia Certificado 522 (IRMM).

HbA1C:

- Blanco: Realizar el blanco del reactivo con cloruro de sodio 154 mmol/L.
- Calibradores 1-4: Patrones S1-S4. El valor de concentración de HbA1C es trazable al método de referencia estandarizado por la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)⁴.

PROCEDIMIENTO

Preparación del hemolizado

Los calibradores no requieren tratamiento previo.

1. Dejar atemperar el reactivo A hasta que alcance la temperatura ambiente.
2. Pipetear en un tubo de ensayo:

Sangre	10 µL
Reactivo (A)	1000 µL

3. Agitar ligeramente. Evitar la formación de espuma. El hemolizado está listo para su uso cuando el color haya pasado del rojo a marrón verdoso (aproximadamente 3 minutos).

El hemolizado es estable 4 horas a 15-25°C, 24 horas a 2-8°C y 6 meses a -20°C. Congelar sólo una vez.

Parámetros del ensayo (Nota 1)

Reagent 1: Reactivo B.

		A25	A15	
GENERAL	Test name	Hb Total endpoint mon.	Hb Total endpoint mon.	
	Analysis mode	whole blood	whole blood	
	Sample type	g/dL	g/dL	
	Units	increasing	increasing	
	Reaction type	No	No	
	Turbidim. test	1	1	
	Decimals	1	1	
	Replicates	-	-	
	Name of assoc. constituent	-	-	
	PROCEDURE	Type of reading	bichrom.	bichrom.
Volumes	Sample	30	30	
	Reagent 1	170	170	
	Reagent 2	-	-	
	Washing	1.2	1.2	
	Predilution factor	-	-	
	Filters	Main	560	560
		Reference	670	670
	Times	Reading 1	300 s	312 s
		Reading 2	-	-
		Reagent 2	-	-
Postdilution factor		1.2	1.2	
CALIBRATION	Type of calibration	specific	specific	
	Calibrator number	1	1	
	Calibrator replicates	3	3	
	Blank replicates	3	3	
	Calibration curve	-	-	
OPTIONS	Blank with saline solution	yes	yes	
	Blank absorbance limit	-	-	
	Kinetic blank limit	-	-	
	Linearity limit	-	-	

Reagent 1: Reactivo C; Reagent 2: Reactivo D.

		A25	A15	
GENERAL	Test name	HbA1C differential bir.	HbA1C differential bir.	
	Analysis mode	whole blood	whole blood	
	Sample type	g/dL	g/dL	
	Units	increasing	increasing	
	Reaction type	Yes	Yes	
	Turbidim. test	2	2	
	Decimals	1	1	
	Replicates	-	-	
	Name of assoc. constituent	-	-	
	PROCEDURE	Type of reading	monoch.	monoch.
Volumes	Sample	8	8	
	Reagent 1	200	200	
	Reagent 2	40	40	
	Washing	1.2	1.2	
	Predilution factor	-	-	
	Filters	Main	340	340
		Reference	-	-
	Times	Reading 1	180 s	168 s
		Reading 2	480 s	480 s
		Reagent 2	195 s	192 s
Postdilution factor		2	2	
CALIBRATION	Type of calibration	specific	specific	
	Calibrator number	4	4	
	Calibrator replicates	3	3	
	Blank replicates	3	3	
	Calibration curve	decreasing polygonal	decreasing polygonal	
OPTIONS	Blank with saline solution	Yes	Yes	
	Blank absorbance limit	-	-	
	Kinetic blank limit	-	-	
	Linearity limit	-	-	

CÁLCULO

El tanto por ciento de HbA1c en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general. Los valores obtenidos son trazables al método de referencia descrito por la IFCC:

$$\% \text{HbA1C} - \text{IFCC} = \frac{\text{HbA1C (g/dL)}}{\text{Hb (g/dL)}} \times 100$$

Los valores trazables al método de referencia descrito por el US National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) se obtienen mediante la siguiente fórmula⁵:

$$\% \text{HbA1C-NGSP} = 0,915 \times \% \text{HbA1C-IFCC} + 2,15$$

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda el uso de los Controles de Hemoglobina A1C, Normal (cod. 18001) y elevado (cod. 18002), para verificar la funcionalidad del procedimiento de medida.

Cada laboratorio debe establecer su propio programa de Control de Calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

Los datos siguientes se obtuvieron usando un analizador A25. Los resultados son similares a los del A15. Los detalles sobre los datos de evaluación están disponibles bajo solicitud.

– Límite de detección:

Hb: 1,3 g/dL
HbA_{1c}: 0,07 g/dL

– Intervalo de medida:

Hb: 1,3-40 g/dL
HbA_{1c}: (valor aproximado dependiendo de la concentración del calibrador más elevado): 0,07-2,50 g/dL. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/2 con Reactivo A y repetir la medición de Hb y HbA_{1c}. El resultado en porcentaje puede emplearse sin conversión.

– Repetibilidad (intraserie):

Concentración media de Hb	CV	n
16,3 g/dL	1,3 %	20
9,6 g/dL	1,4 %	20

Concentración media de HbA _{1c}	CV	n
0,58 g/dL	3,0 %	20
0,82 g/dL	2,1 %	20

Concentración media de HbA _{1c} -IFCC	CV	n
3,6 %	3,2 %	20
8,6 %	2,7 %	20

Concentración media de HbA _{1c} -NGSP	CV	n
5,4 %	1,9 %	20
10,0 %	2,1 %	20

– Reproducibilidad (interserie):

Concentración media de Hb	CV	n
16,3 g/dL	2,0 %	25
9,6 g/dL	2,4 %	25

Concentración media de HbA _{1c}	CV	n
0,58 g/dL	3,1 %	25
0,82 g/dL	2,4 %	25

Concentración media de HbA _{1c} -IFCC	CV	n
3,6 %	3,6 %	25
8,6 %	3,2 %	25

Concentración media de HbA _{1c} -NGSP	CV	n
5,4 %	1,7 %	25
10,0 %	1,9 %	25

– Veracidad: Los resultados obtenidos con estos reactivos no muestran diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con el método de referencia descrito por la IFCC y con el método de referencia descrito por el NGSP. Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

– Interferencias: la lipemia (triglicéridos 8 g/L), el factor reumatoide (<750 IU/mL) y la bilirrubina (50 mg/dL) no interfieren. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir⁶.

Para los anticuerpos anti-HbA_{1c} empleados en este equipo de reactivos no se han encontrado reacciones cruzadas con HbA₀, HbA_{1a}, Hb_{1b}, hemoglobina acetilada, hemoglobina carbamida, albúmina glicada, HbA_{1c} lábil ni HbA_{1d}. Las variantes de hemoglobina HbS y HbC no interfieren. Concentraciones muy elevadas de HbF pueden provocar valores de HbA_{1c} inferiores a los esperados^{7,8}.

En los pacientes con anemia hemolítica, anemia por deficiencia de hierro o cuando se ha practicado una transfusión, la edad media de los eritrocitos se ve alterada. Por este motivo, los resultados de HbA_{1c} de estos pacientes deben interpretarse con precaución.

CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS

La Hemoglobina A_{1c} es el producto de la condensación irreversible de la glucosa con el residuo N-terminal de la cadena β de la hemoglobina A.

La concentración de HbA_{1c} en sangre es directamente proporcional a la concentración media de glucosa (MGS) durante un período de tiempo de 6-8 semanas, equivalente a la vida media de los eritrocitos, según las siguientes fórmulas²:

$$\text{MGS (mg/dL)} = 31,7 \times \% \text{HbA}_{1c} - 66,1$$

$$\text{MGS (mmol/L)} = 1,76 \times \% \text{HbA}_{1c} - 3,67$$

Los niveles de HbA_{1c} son un valioso complemento a las determinaciones de glucosa en sangre en la valoración del control glucémico para el seguimiento de los pacientes diabéticos, proporcionando una información más fiable que la concentración de glucosa. Existen varios estudios que indican que las complicaciones relacionadas con la diabetes pueden reducirse mediante un estrecho control de los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, la determinación de HbA_{1c} no es adecuada para el diagnóstico de la diabetes mellitus^{2,3}.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

NOTAS

1. Para evitar posibles interferencias con otro tipo de ensayos se recomienda realizar las mediciones de hemoglobina total y de HbA_{1c} en series independientes del resto de técnicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Karl J et al. Development and standardization of a new immunoturbidimetric HbA_{1c} assay. *Klin Lab* 1993;39:991-996.
2. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*, 3rd ed. Saunders Co, 1999.
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
4. Jeppson JO, Kodold U, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umamoto M, Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.
5. Hoelzel W et al. IFCC reference systems for measurement of hemoglobin A_{1c} in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004;50:166-174
6. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 4th ed. AACC Press, 1995.
7. Bry L, Chen P, Sacks D. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;41:153-163.
8. Roberts WL, De BK, Brown D, Hanbury MC, Hoyer JD, John WG, Lambert TL, Lundell RB, Rohlfing C, Little RR. Effects of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. *Clin Chem* 2002;48:383-385.