



COD 11044 20 determinaciones	COD 11045 100 determinaciones
CONSERVAR A 15-30°C	
Reactivos para medir la concentración de HbA1C Sólo para uso <i>in vitro</i> en el laboratorio clínico	

HEMOGLOBINA A1C

Cromatográfica - espectrofotométrica
INTERCAMBIO IÓNICO

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Después de preparar un hemolizado, donde se elimina la fracción lábil, las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose de forma específica la hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) previa eliminación por lavado de la Hemoglobina A_{1a+b} (HbA_{1a+b})¹. La estimación del porcentaje de la Hb A_{1c} se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm.

CONTENIDO

	COD 11044	COD 11045
1. Reactivo	1 x 30 mL	1 x 30 mL
2. Reactivo	1 x 50 mL	1 x 240 mL
3. Reactivo	1 x 450 mL	4 x 450 mL
4. Microcolumnas	1 x 20	1 x 100

COMPOSICIÓN

- Reactivo.** Ftalato de potasio 50 mmol/L, detergente 5 g/L, azida de sodio 0,95 g/L, pH 5,0.
- Reactivo.** Tampón fosfatos 30 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L.
- Reactivo.** Tampón fosfatos 72 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L.
- Microcolumnas.** Contienen resina de intercambio catiónico equilibrada con tampón fosfatos 72 mmol/L, pH 6,5, azida de sodio 0,95 g/L.

Utilizar únicamente Microcolumnas (4) y reactivos 2 y 3 del mismo número de lote.

CONSERVACIÓN

Conservar a 15-30°C.

Reactivos 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:

- Reactivos: Presencia de partículas, turbidez.
- Microcolumnas (4): Ausencia de tampón sobre el lecho de la resina.

EQUIPO ADICIONAL

- Fotómetro para lecturas a 415 nm (405-425)

MUESTRAS

Sangre total recogida mediante procedimientos estándar.

La Hemoglobina A1C es estable 7 días a 2-8°C. Puede utilizarse heparina o EDTA como anticoagulante.

PROCEDIMIENTO

Preparación del hemolizado y eliminación de la fracción lábil

- Dejar atemperar reactivos y columnas durante unos minutos, hasta que alcancen la temperatura ambiente (21-26°C) (Nota 1).

- Pipetear en un tubo de ensayo:

Sangre	50 µL
Reactivo (1)	200 µL

- Agitar y dejar a temperatura ambiente durante 10-15 min. Este hemolizado se utilizará en los pasos 6 y 11.

Preparación de la columna (Notas 2 y 3)

- Destapar la parte superior de la columna y romper a continuación la lengüeta inferior.
- Con la ayuda del extremo plano de una pipeta, bajar el disco superior hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla. Dejar gotear hasta que el líquido alcance el nivel del disco, desechando el eluido.

Separación y lectura de la HbA_{1c}

- Aplicar cuidadosamente sobre el disco superior:

Hemolizado	50 µL	Desechar el eluido
------------	-------	--------------------

- Quando haya penetrado todo el hemolizado añadir, procurando arrastrar los posibles restos del mismo:

Reactivo (2)	200 µL	Desechar el eluido
--------------	--------	--------------------

- Pipetear:

Reactivo (2)	2,0 mL	Desechar el eluido
--------------	--------	--------------------

- Colocar la columna sobre un tubo de ensayo y añadir:

Reactivo (3)	4,0 mL	Recoger el eluido (Fracción HbA _{1c})
--------------	--------	---

- Agitar bien y leer la absorbancia de la fracción HbA_{1c} a 415 nm frente a agua destilada (A_{HbA1c}). La absorbancia es estable durante al menos una hora.

Lectura de la Hb_{TOTAL}

- Pipetear en un tubo de ensayo:

Reactivo (3)	12,0 mL
Hemolizado	50 µL

- Agitar bien y leer la absorbancia de la Hb_{TOTAL} a 415 nm frente a agua destilada (A_{Hb TOTAL}). La absorbancia es estable durante al menos una hora.

CÁLCULOS

El tanto por ciento de HbA_{1c} en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{HbA1c} \times V_{HbA1c}}{A_{HbTOTAL} \times V_{HbTOTAL}} \times 100 = \% HbA1C$$

El volumen de HbA_{1c} (V_{HbA1c}) es 4 mL, el volumen de Hb total (V_{HbTOTAL}) es 12 mL. Se deduce la fórmula siguiente para el cálculo de la concentración:

$\frac{A_{HbA1c}}{A_{HbTOTAL}}$	$\times \frac{100}{3} = \% HbA1C$
---------------------------------	-----------------------------------

Los resultados obtenidos con el presente método, pueden convertirse en equivalentes a los de un método certificado según el US National

Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), o en equivalentes a los del método estandarizado por la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), mediante las siguientes fórmulas:

$$\%HbA1C-NGSP = 0,86 \times \%HbA1C-BioSystems + 0,24$$

$$\%HbA1C-IFCC = 0,94 \times \%HbA1C-BioSystems - 2,09$$

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	BioSystems	Grado de control
4,0 - 6,0	2,0 - 4,2	4,4 - 6,7	No diabético
6,0 - 6,5	4,2 - 4,8	6,7 - 7,3	Objetivo
6,5 - 8,0	4,8 - 6,4	7,3 - 9,1	Buen control
> 8,0	> 6,4	> 9,1	Precisa actuación

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

- Límite de detección: Menor que 4,3 %.
- Límite de linealidad: Mayor que 17,0 %.
- Repetibilidad (intraserie):

Concentración media	CV	n
7,2 %	5,4 %	25
9,9 %	6,3 %	25

- Reproducibilidad (interserie):

Concentración media	CV	n
7,2 %	7,3 %	25
9,9 %	5,9 %	25

- Veracidad: Al comparar los resultados obtenidos con este método con los de un método certificado por NGSP, se obtiene la siguiente ecuación:

$$(\%HbA1C-BS) = 1,17 \times (\%HbA1C-Certified) - 0,28$$

Los detalles del estudio comparativo están disponibles bajo solicitud.

- Interferencias: Lípidos (triglicéridos 10 g/L) y bilirrubina (20 mg/dL) no interfieren. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir⁴. En los métodos cromatográficos de intercambio iónico, la presencia de hemoglobina C o S en la muestra puede alterar ligeramente los resultados, pero las diferencias no son clínicamente significativas⁵. Otras variantes de hemoglobina, como la HbE, la HbF, la Hb-carbamilada y la Hb-acetilada, pueden interferir^{5,6}. La incubación con el Reactivo (1) elimina la interferencia de la HbA_{1c}-lábil.

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 HbA1C 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 HbA1C 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:

$$MGS \text{ (mg / dL)} = 31,7 \times \%HbA1C - 66,1$$

$$MGS \text{ (mmol / L)} = 1,76 \times \%HbA1C - 3,67$$

Los niveles de HbA1C 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 HbA1C 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. Los resultados obtenidos son independientes de la temperatura entre los 21-26°C. Si la temperatura de trabajo es superior o inferior, multiplicar el valor obtenido por el factor correspondiente, según la siguiente tabla:

Temperatura ensayo	Factor cálculo
18-20°C	1,15
27-30°C	0,90

2. El almacenaje prolongado de las columnas puede ocasionar un excesivo empacado de la resina que disminuiría el flujo. Para evitarlo, colocar la columna en posición invertida unos 10 min, volverla a su posición original y esperar que sedimente la resina antes de bajar el disco superior.
3. La ocasional presencia de burbujas no afecta la determinación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bissé E, Abraham EC. New less temperature-sensitive microchromatographic method for the separation and quantitation of glycosylated hemoglobins using a non-cyanide buffer system. *J Chromatog* 1985; 344: 81-91.
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. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Press, 1995.
5. Roberts WL et al. Effects of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. *Clin Chem* 2002; 48: 383-385.
6. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-163.