

HEMOGLOBINA A_{1c} (HbA_{1c})

RX DAYTONA PLUS

USO PREVISTO

Un sistema de análisis de la hemoglobina A_{1c} es un dispositivo diseñado para realizar la determinación cuantitativa *in vitro* de la concentración de hemoglobina A_{1c} en la sangre total. Este producto es apto para usar en el analizador RX **daytona plus** de la RX series.

Este dispositivo solo está destinado para uso recetado.

Nro. de catálogo

HA 8321	R1 de HbA _{1c} : Reactivo de anticuerpos	4 x 7.8 mL
	R2 de HbA _{1c} : Reactivo aglutinante	4 x 7.8 mL
	R3: Reactivo desnaturalizante de hemoglobina	4 x 40 mL
	R1 de Hb: Reactivo de hemoglobina total	4 x 12.7 mL

GTIN: 05055273208856

Kit adicional

HA 3450	Reactivo desnaturalizante de hemoglobina (Hb REAC DNT)	2 x 50 ml
---------	---	-----------

IMPORTANCIA CLÍNICA ⁽¹⁻⁹⁾

La medición de la HbA_{1c} se usa en el control a largo plazo de la diabetes *mellitus*. Este análisis no debe usarse para el diagnóstico de la diabetes *mellitus* ni para el control diario de la glucosa.

La diabetes *mellitus* es una enfermedad asociada con un control deficiente de la glucemia. Varios estudios clínicos, incluido el Ensayo sobre el control y las complicaciones de la diabetes, indicaron que se pueden reducir las complicaciones relacionadas con la diabetes mediante el control estricto y a largo plazo del nivel de glucemia.

El paciente diabético, que tiene un nivel de glucemia anormalmente elevado, también tendrá un nivel de HbA_{1c} elevado, ya que la HbA_{1c} está formada por la glucosilación no enzimática del extremo N de la cadena β de la hemoglobina A₀.

El nivel de HbA_{1c} es proporcional al nivel de glucemia, y se ha aceptado ampliamente como indicador de la concentración media diaria de glucemia durante las 6 a 8 semanas anteriores. Por lo tanto, es un indicador a largo plazo del control de la diabetes, mientras que la medición de la glucemia es solo un indicador a corto plazo.

PRINCIPIO

Se miden tanto la concentración de HbA_{1c} como la concentración de hemoglobina total. El resultado informado de la HbA_{1c} se calcula como un porcentaje de la concentración de hemoglobina total. Los valores de la HbA_{1c} y de la hemoglobina total obtenidos en este análisis se usarán en el cálculo de la proporción HbA_{1c}-hemoglobina total (porcentaje de HbA_{1c}) y no se deben usar individualmente para fines de diagnóstico.

El algunos métodos, la fracción inestable de la hemoglobina glucosilada (base de Schiff) puede mostrar una falsa elevación del porcentaje de HbA_{1c}. Sin embargo, este análisis no está afectado por la "HbA_{1c} inestable", ya que se usa un anticuerpo específico contra la HbA_{1c} (una cetamina estable).

(a) Tratamiento previo de la muestra

El primer paso del procedimiento es el tratamiento previo de la muestra de sangre total. Dicho tratamiento lisa los eritrocitos e hidroliza la hemoglobina por acción de una endopeptidasa en el reactivo desnaturalizante de hemoglobina.

(b) Determinación de la hemoglobina total ⁽¹⁰⁾

El reactivo de hemoglobina total se usa para determinar la concentración de hemoglobina total. El método implica la conversión de todos los derivados de la hemoglobina en hematina en una solución alcalina de detergente no iónico, como describe Wolf y col. (1984).

La reacción comienza al agregar la muestra previamente tratada al reactivo de hemoglobina total, lo que producirá una solución verde. La conversión de los derivados de la hemoglobina en hematina alcalina con un espectro de absorción definido permite realizar la medición final de la hemoglobina total a 600 nm.

(c) Determinación de la HbA_{1c}

La determinación de la HbA_{1c} está basada en un análisis de inhibición de la aglutinación en látex.

El aglutinante, un polímero sintético que contiene varias copias de la porción inmunorreactiva de la HbA_{1c}, aglutina el látex recubierto con anticuerpos monoclonales de ratón específicos contra la HbA_{1c}.

Si no hay HbA_{1c} en la muestra, el aglutinante del reactivo 2 de HbA_{1c} y las micropartículas recubiertas con anticuerpos del reactivo 1 de HbA_{1c} se aglutinarán, lo que hará que aumente la absorbancia.

La presencia de HbA_{1c} en la muestra reducirá la velocidad de aglutinación, ya que compite con el aglutinante de HbA_{1c} por los sitios de unión de los anticuerpos en el látex.

Por lo tanto, el aumento de la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de HbA_{1c} en la muestra.

El aumento de la absorbancia debido a la aglutinación se mide a 700 nm, y el alcance de la aglutinación se usa para calcular la concentración de HbA_{1c} a partir de una curva de calibración. Luego, se calcula el porcentaje de HbA_{1c} usando los valores de la hemoglobina total y de la HbA_{1c} en g/dl.

RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS ⁽¹¹⁾

Se puede usar venopunción o muestras de sangre capilar.

Se recomienda usar EDTA potásico y heparina de amonio como anticoagulantes.

Las muestras de sangre con EDTA potásico y heparina de amonio son estables a -70°C durante 6 meses o a +5°C durante 2 semanas.

Las muestras congeladas deben descongelarse a temperatura ambiente, mezclarse bien antes de usar y no deben volver a congelarse.

Nota. Todas las muestras de sangre deben mezclarse bien inmediatamente antes del análisis.

Estabilidad de la muestra previamente tratada

La muestra tratada puede almacenarse durante un máximo de 2 horas a temperatura ambiente, o durante un máximo de 8 horas a una temperatura de +2 a +8°C si se almacena en un recipiente sellado.

Cuando están almacenadas, algunas muestras lisadas tienden a precipitarse. Por lo tanto, es una buena práctica de laboratorio mezclar/remover las muestras antes de transferirlas al sistema para analizarlas.

Si fuera necesario almacenarlas de un día para el otro, recomendamos almacenar las muestras lisadas a una temperatura de +2 a +8°C.

COMPOSICIÓN DEL REACTIVO

Contenido

R1 de HbA_{1c}: Reactivo de anticuerpos

Partículas acopladas de anticuerpo (de ratón) contra HbA_{1c} < 0,1 % p/v

Albúmina de suero bovino

Tampón

Tensioactivo no iónico

0,6 % p/v

Proclin 150

0,1 % p/v

pH 8,1

R2 de HbA_{1c}: Reactivo aglutinante

Hapteno de HbA_{1c} enlazado al polímero de manera covalente

Albúmina de suero bovino

Tampón

Proclin 150

0,1 % p/v

Tensioactivo no iónico

0,2 % p/v

pH 2,0

R3: Desnaturalizante de hemoglobina

Pepsina porcina

Tampón

pH 2,4

R1 de Hb: Reactivo de hemoglobina total

Hidróxido de sodio

0,4 % p/v

Triton

2,5 % p/v

Octilfenoxipolióxietanol

2,5 % p/v

pH 13

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

Únicamente para uso diagnóstico *in vitro*. No utilizar la pipeta con la boca. Tomar las precauciones habituales necesarias para manipular reactivos de laboratorio.

El reactivo de Hb total contiene hidróxido de sodio, que es cáustico. En caso de contacto accidental, lavar la zona afectada con abundante cantidad de agua y solicitar atención médica de inmediato.

Se encuentran disponibles Hojas de Datos de Salud y Seguridad si se las solicita.

Desechar todos los materiales biológicos y químicos de acuerdo con los lineamientos locales.

Los reactivos solo deben ser utilizados con su propósito previsto por personal de laboratorio debidamente calificado en condiciones de laboratorio apropiadas.

ESTABILIDAD Y PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Todos los reactivos son estables en la forma suministrada hasta la fecha de vencimiento si se almacenan a una temperatura de +2 a +8 °C protegidos del calor extremo, la luz y el congelamiento.

Los reactivos deben mezclarse bien y adaptarse a la temperatura del sistema durante aproximadamente ½ hora antes de usarlos en el sistema.

ANÁLISIS DE LA Hb TOTAL

Reactivo 1 = Reactivo de Hb total

ANÁLISIS DE LA HbA_{1c}

Reactivo 1 = R1 de HbA_{1c}: Reactivo de anticuerpos

Reactivo 2 = R2 de HbA_{1c}: Reactivo de aglutinación

MATERIALES SUMINISTRADOS

Reactivo desnaturalizante de Hb

Reactivo de Hb total

R1 de HbA_{1c}: Reactivo de anticuerpos

R2 de HbA_{1c}: Reactivo aglutinante

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

Calibrador de hemoglobina A_{1c}, nro. de catálogo HA 3444

Juego de control de hemoglobina A_{1c}, nro. de catálogo HA 5072

Reactivo desnaturalizante de Hb HA 3450

Solución salina de la RX series, nro. de catálogo SA 8396

Micropipetas de vidrio

Controlador de micropipetas de vidrio

OBSERVACIONES SOBRE EL PROCEDIMIENTO

Ingrese los valores específicos del lote de acuerdo con los que figuran en el inserto del calibrador HA 3444. Los calibradores no necesitan tratamiento previo.

Los parámetros de bioquímica para los análisis especializados de la RX series de Randox están predefinidos en el disco duro de la PC del analizador. Los programas necesarios deben descargarse en el software del analizador. Debe tenerse en cuenta que los parámetros de bioquímica predefinidos utilizan unidades del SI. Si se necesitan unidades alternativas, el usuario puede editarlas. En este caso, el intervalo técnico debe editarse de acuerdo con las unidades escogidas por el usuario. Todas las instrucciones necesarias están codificadas en el código de barras. Si el analizador no lee el código de barras, la serie de números que figura debajo de este debe ingresarse en forma manual. Si el problema persiste, comuníquese con el servicio técnico de Randox, Irlanda del Norte, al +44 (0) 28 9445 1070.

TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA

Mezcle **10 µl** de la muestra de sangre total con **400 µl** del reactivo desnaturalizante de hemoglobina (dilución 1:41).

Recomendamos usar micropipetas de vidrio para medir el volumen de la muestra de sangre.

Evite la formación de espuma. Incube durante un mínimo de 5 minutos a temperatura ambiente antes del análisis.

CALIBRACIÓN DE RX DAYTONA PLUS

HbA_{1c}

Recomendamos calibrar este análisis con la serie de calibradores de hemoglobina A_{1c} Randox, niveles 1 a 6.

Hemoglobina total

Recomendamos calibrar este análisis con una solución de NaCl al 0,9 % como calibrador cero y la serie de calibradores de hemoglobina A_{1c} Randox, nivel 1 únicamente.

Nota. Los calibradores NO NECESITAN TRATAMIENTO PREVIO.

Los calibradores están relacionados con un método de HPLC para la HbA_{1c} y con el método de Drabkin para la hemoglobina total.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar los controles de hemoglobina A_{1c} Randox, nivel 1 y nivel 2, para el control de calidad diario. Deben analizarse dos niveles de controles al menos una vez por día. Los valores obtenidos deben estar dentro del intervalo especificado. Si estos valores no están dentro del intervalo y la repetición excluye error, deben realizarse los siguientes pasos:

1. Comprobar la programación del instrumento y la fuente de luz.
2. Comprobar la limpieza de todo el equipo en uso.
3. Comprobar el agua. Los contaminantes, por ejemplo, el crecimiento de bacterias, pueden contribuir con la inexactitud de los resultados.
4. Comprobar la temperatura de reacción.
5. Comprobar la fecha de vencimiento del kit y sus componentes.
6. Ponerse en contacto con el Servicio Técnico de Laboratorios Randox, Irlanda del Norte +44 (0) 28 9445 1070.

Los requisitos de control de calidad deben determinarse en conformidad con las reglamentaciones gubernamentales o los requisitos de acreditación.

Nota: Los controles NECESITAN TRATAMIENTO PREVIO DESPUÉS DE HABERLOS RECONSTITUIDO. Los controles deben tratarse de la misma manera que las muestras de los pacientes, de acuerdo con el kit o reactivo utilizado.

CÁLCULO

La concentración de hemoglobina A_{1c} se calcula usando la siguiente ecuación:

Se calcula el porcentaje de HbA_{1c}:

$$\% \text{ de HbA}_{1c} = \frac{\text{HbA}_{1c} \text{ (g/dl)}}{\text{Hb total (g/dl)}} \times 100$$

Este valor se puede calcular automáticamente usando la función Análisis Calculado de los analizadores de la RX series. Consulte el manual del operador de la RX series correspondiente para obtener más información.

Conversión de valores del NGSP a valores de la IFCC equivalentes⁽¹⁶⁾

Se evaluó la relación entre los porcentajes de HbA_{1c} obtenidos de la red NGSP y de la red IFCC, y se desarrollaron las siguientes ecuaciones principales:

$$\begin{aligned} \text{NGSP} &= (0,0915 \times \text{IFCC}) + 2,15 \\ \text{IFCC} &= (\text{NGSP} - 2,15) \times 10,929 \end{aligned}$$

Los resultados obtenidos con los instrumentos de la RX series están expresados en unidades del NGSP y pueden convertirse a unidades equivalentes de la IFCC usando la ecuación anterior.

VALORES PREVISTOS^(6, 12-14)

Cada laboratorio debe fijar su propio intervalo normal.

Según el análisis que se use, la HbA_{1c} será de aproximadamente un 4 a un 6 % en no diabéticos, de un 6 a un 8 % en diabéticos controlados, y puede llegar al 20 % en diabéticos no controlados.

Se usó este análisis para determinar la HbA_{1c} en 124 mujeres y hombres aparentemente sanos ("normales") sometidos a un examen físico. Se obtuvo el intervalo previsto de 4,5 a 6,2 % y una media del 5,4 %.

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia para reflejar la edad, el sexo, la dieta y la ubicación geográfica de la población.

ESPECIFICIDAD/INTERFERENCIAS⁽¹⁵⁾

El análisis brinda resultados precisos para un intervalo de hemoglobina total de 7 g/dl a 23 g/dl. No debe usarse este método para analizar a pacientes con anemia grave (hemoglobina total < 7 g/dl) o con policitemia (hemoglobina total > 23 g/dl).

Todo caso de supervivencia de eritrocitos reducida, como la anemia hemolítica u otra enfermedad hemolítica, embarazo, hemorragia considerable reciente, etc. hará que disminuya el porcentaje de hemoglobina glucosilada.

Las muestras que contengan las variantes S y C de la hemoglobina presentarán un aumento del 40 % en el valor previsto de la HbA_{1c}. Además, las que contengan la variante F (> 10 %) presentarán un valor más bajo que el previsto. Por lo tanto, las muestras que contengan las variantes S, C y F (> 10 %) no deben compararse con los valores normales o anormales publicados.

Se demostró que la variante E de una muestra no produce interferencia.

Sustancia interferente	Concentración sin interferencia
Bilirrubina:	513 µmol/l (30 mg/dl)
Trigs:	18 mmol/l (1600 mg/dl)
RF:	2000 IU/ml
Ácido acetilsalicílico:	60 mg/dl
Cianato de sodio:	50 mg/dl
Urea:	83 mmol/l (500 mg/dl)

La fracción inestable de la hemoglobina glucosilada (base de Schiff) no interfiere, ya que el anticuerpo es específico contra la cetamina estable.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los siguientes datos sobre el funcionamiento se obtuvieron utilizando un analizador RX daytona plus a +37°C.

INTERVALO ANALÍTICO

El intervalo de análisis del porcentaje de HbA_{1c} depende del nivel de hemoglobina total en la muestra y de la concentración de HbA_{1c} (g/dl) en el calibrador nivel 6. En la siguiente tabla se muestran los extremos bajo (intervalo bajo) y alto (intervalo alto) del intervalo analítico del porcentaje de HbA_{1c} con una concentración de hemoglobina típica de 14 g/dl. El LDC del análisis de HbA_{1c} determina el extremo bajo del intervalo del análisis, y la concentración del calibrador nivel 6 determina el extremo alto del intervalo del análisis.

Hemoglobina total en g/dl	Límite de cuantificación (LDC) de HbA _{1c} en g/dl	Intervalo de análisis del % de HbA _{1c}	
		Intervalo bajo (%)	Intervalo alto (%)
14,0	0,20	1,43	14,7

PRECISIÓN

Precisión en un mismo análisis

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Media (%)	4,61	7,61	10,58
DE	0,161	0,267	0,234
CV (%)	3,50	3,50	2,21
n	80	80	80

Precisión total

	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Media (%)	4,61	7,61	10,58
DE	0,211	0,338	0,430
CV (%)	4,58	4,45	4,06
n	80	80	80

CORRELACIÓN

Este método (Y) se comparó con otro método comercial disponible (X) y se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:

$$Y = 1,05X - 0,48$$

y un coeficiente de correlación $r = 0,9899$

Se analizaron 47 muestras de pacientes con valores de 4,56 % a 13,65 %.

REFERENCIAS

1. Cohen P.M. Perspective: measurement of Circulating Glycated Protein to Monitor Intermediate – Term Changes in Glycaemic Control Eur J Clin Chem. Clin. Biochem. 1992;**30** (12): 851-859.
2. The Diabetes Control of complications Trial Research on the Development and Progression of Long – Term Complicity of Insulin – Dependent Diabetes Mellitus. The New England Journal of Medicine 1993;**329** (14): 977-986.
3. Mayer T.K. and Freedman Z.R.: Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility. Clin. Chem. Acta **127**: 147-184 (1983).
4. Baynes J.W., Bunn H.F., Goldstein D.E. et al: National Diabetes Group: Report of the expert committee on glucosylated hemoglobin. Diabetes Care **7**: 602-606 (1984).
5. Koenig R.J., Petersen C.M., Kilo C et al: Hemoglobin A_{1c} as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. Diabetes **25**: 230-232 (1976).
6. Nathan D.M., Singer D.E., Hurxthal K. and Goodson J.D.: The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. NE J Med **310**: 341-346 (1984).
7. McCarren M: DCCT and its works: Intensive therapy reduces the risk of diabetic eye, kidney, and nerve disease. Diabetes Forecast 49-51 (September 1993).
8. Larsen M.L., Horder M, and Mogensen E.F.: Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. NE J Med. **323**: 1021-1025 (1990).
9. Nathan D.M.: Hemoglobin A_{1c} – Infatuation or the real thing? NE J Med. **323**: 1062-1063 (1990).
10. Wolf HU, Lang W., and Zander R: Alkaline haematin D – 575, a new tool for the determination of haemoglobin as an alternative to the Cyanhaemoglobin method. Clin. Chem. Acta **136**: 83-104 (1984).
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Skin Puncture – third edition: approved standard. NCCLS Publication H4 – A3 Villanova, PA: NCCLS 1991.
12. Goldstein D.E., Little R.R., Wiedmeyer H.M., et al. Glycated Hemoglobin: Methodologies and clinical applications. Clin. Chem. **32**: B64-B70 (1986).
13. Ellis G., Diamonds E.P., Giesbrecht E.E. , et al: An automated “high-pressure” liquid chromatographic assay for hemoglobin A_{1c}. Clin. Chem **30**: 1746-1752 (1984).
14. Burtis C.A. and Ashwood E.R. (eds.) : Tietz textbook of Clinical Chemistry, 2nd edition. W.B. Sands Company, Philadelphia, PA, p.2021 (1994).
15. Knowles W.J., Haigh W.B., and Michaud G.C. : A monoclonal antibody-based immunoassay for hemoglobin A_{1c} Diabetes **35** Supplement 94A (1986).
16. The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP): www.ngsp.org. IFCC Standardization of HbA_{1c}.

Revisado 05 May 16 bi
Rev. 006