



PROCEDIMIENTO DE GLICOHEMOGLOBINA

Para la Determinación Cuantitativa de Glicohemoglobina en la Sangre

SUMARIO Y EXPLICACION

A lo largo de la vida circulatoria de los glóbulos rojos, la glicohemoglobina es formada continuamente por la adición de glucosa a la terminal N de la cadena de la hemoglobina. Este proceso, el cual no es enzimático, refleja el promedio de la glucosa en la sangre sobre un periodo de tiempo extendido. En un estudio, Trivelli, et al (1) mostró que la glicohemoglobina en las personas diabéticas se encontraba elevada de 2 a 3 veces el nivel encontrado en personas normales. Varios investigadores han afirmado que la glicohemoglobina es un indicador del control diabético, ya que los niveles de glicohemoglobina se aproximan al valor normal cuando el paciente diabético responde al tratamiento (2-4).

La glicohemoglobina ha sido definida operacionalmente como la "fracción rápida" de la hemoglobina (HbA1a, A1b, A1c) la cual fluye primero durante la cromatografía en columna con resinas de intercambio iónico. La hemoglobina no glucosilada, que constituye el resto de la hemoglobina, ha sido designada HbAo. El procedimiento para la determinación de la glicohemoglobina emplea una resina de intercambio catiónico de unión tenue para la separación de la glicohemoglobina (fracción rápida) de la hemoglobina no glucosilada.

PRINCIPIO

Una preparación hemolizada de sangre entera se mezcla continuamente durante cinco minutos con una resina de intercambio iónico de ligadura tenue. Durante este tiempo, el HbAo se une a la resina. Después del periodo de mezclado se usa un filtro separador para retirar la resina del líquido sobrenadante que contiene la glicohemoglobina. El porcentaje de glicohemoglobina se determina midiendo la absorbencia a 450 nm de la fracción de glicohemoglobina y la fracción de hemoglobina total, calculando la variación de las absorbencias, y comparando esta variación con la de un calibrador realizada durante el proceso de separación.

REACTIVOS: PARA USO IN-VITRO

Juego de Reactivos Cat. No. GH-110 suministra:

RESINA DE INTERCAMBIO IONICO PARA GLICOHEMOGLOBINA (Cat. No. GH-100)



INGREDIENTES REACTIVOS:

8 mg/dL de resina de intercambio iónico amortiguada a pH 6.9. MEZCLE BIEN ANTES DE USAR.

PRECAUCIONES:

Causa irritación. Evite el contacto con los ojos, piel y ropa. En caso de contacto lave con abundante agua.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacene de 15 - 30 grados C. Estable hasta la fecha de expiración marcada en la etiqueta.

DETERIORO:

El líquido sobrenadante encima de la resina debe ser claro e incoloro. La turbidez o coloración indicará deterioro y el reactivo no debe usarse.

REACTIVO SEPARADOR DE HEMOGLOBINA (Cat. No. GH-20)

INGREDIENTES REACTIVOS:

10mM Cianuro de potasio. Sufractante agregado.

PRECAUCIONES:

Contiene Cianuro. No mezcle con ácidos. Lávese las manos después de manejarse. Deseche al enjuagar con abundante agua.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD:

Almacene de 15 - 30 grados C. Estable hasta la fecha de expiración marcada en la etiqueta.



El reactivo debe ser claro e incoloro. La turbidez o coloración indicará deterioro y el reactivo no debe usarse.

INSTRUMENTOS:

Use un espectrofotómetro o colorímetro calibrado a 415 nm. Eagle Diagnostics tiene disponible el instrumento GLYCO-METER que está diseñado para proporcionar un cálculo directo de este método para glicohemoglobina.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

El procedimiento requiere el uso de sangre entera obtenida con EDTA como anticoagulante.

PRECAUCIONES:

Manéjese con las mismas precauciones usadas para todas las muestras de sangre.

ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA:

La glicohemoglobina permanece estable hasta por una semana de 2-8 grados C. en sangre entera usando EDTA como anticoagulante.

ADITIVOS:

No se requieren aditivos o preservativos especiales además de los anticoagulantes.

SUSTANCIAS INTERFERENTES

La lipemia excesiva puede causar resultados altamente falsos. Para muestras excesivamente lipémicas, centrifuge las células rojas y retire el plasma lipémico, reemplazándolo con una cantidad aproximadamente igual de salina. Resuspenda las células rojas en la solución salina y proceda con la prueba. Los HbS y HbC glicosilados se unen con la resina produciendo resultados bajos falsos. La hemoglobina fetal (HbF) no interfiere significativamente con el ensayo, la fracción inestable (aldimina) es eliminada durante la mezcla de la resina, por lo que no afecta el valor de la glicohemoglobina.



PROCEDIMIENTO

MATERIAL SUMINISTRADO:

JUEGO DE ENSAYO GLICOHEMOGLOBINA (Cat. No. GH-110) suministra Resina de Intercambio Iónico y Reactivo separador.

JUEGO DE REACTIVO PARA GLICOHEMOGLOBINA (Cat. No. GH-100) suministra el juego de ensayo GH-110 junto con los FILTROS SEPARADORES (Cat. No. GH-30) y el CALIBRADOR DE GLICOHEMOGLOBINA (Cat. No. GH-40) que se requieren para la realización de la prueba.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO:

1. Micropipetas de 0.02 mL y 0.10 mL .
2. Pipetas de 0.50 mL , 3.0 mL y 5.0 mL.
3. Tubos de ensayo 13 X100 mm
4. Mezclador o centrifugador
5. Cronómetro y tablero de tubos de ensayo
6. Instrumento

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Nota: 1) El reactivo de Resina/Separador debe estar a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento de prueba.

2) Cada muestra debe ensayarse; el Calibrador y los Controles requieren un tubo de ensayo para Separador, Separación de Resina y y Total de Hemoglobina.

A. PREPARACION DE HEMOLIZADO:

1. Coloque 0.5 mL de Reactivo Separador (Lysing Reagent) en tubos etiquetados: CALIBRADOR, CONTROL, MUESTRA 1, ETC.
2. Coloque 0.1 mL de muestra de sangre bien mezclada en un tubo debidamente etiquetado. Mezcle hasta que la separación completa sea evidente.
3. Permita reposar por 5 minutos.



B. SEPARACION DE GLICOHEMOGLOBINA:

Nota: Antes de usarse, mezcle bien la resina invirtiendo la botella por lo menos seis veces. Menee la botella entre cada servido.

1. Coloque 3.0 mL de Resina de intercambio iónico para Glicohemoglobina en tubos de 13 X 100 mL etiquetados: CALIBRADOR, CONTROL, MUESTRA1, etc.
2. Coloque 0.1 mL del hemolizado del paso A en el tubo de resina propiamente etiquetado.
3. Coloque el filtro separador en el tubo de modo que la manga de goma esté aproximadamente a 2 cm por encima del nivel de líquido.
4. Coloque los tubos en el mezclador automático y mezcle continuamente durante 5 minutos.
5. Retire los tubos del mezclador o centrifugador.
6. Para facilitar la separación, permita que los tubos estén verticales en el tablero de tubos de ensayo durante unos cuantos minutos, luego empuje el filtro separador en el tubo hasta que la resina esté firmemente compactada.
7. Coloque el líquido sobrenadante en otro tubo o directamente en una cubeta para medir la absorbencia.
8. Ajuste el instrumento cero absorbencia a 415 nm utilizando agua desionizada como blanco.
9. Lea y registre los valores de absorbencia para CALIBRADOR, CONTROL, MUESTRA 1, etc. Estas lecturas son para glicohemoglobina.

C. Fracción del Total de Hemoglobina

1. Coloque 5.0 mL de agua desionizada en tubos etiquetados: CALIBRADOR, CONTROL, MUESTRA 1, etc.
2. Coloque 0.02 mL de hemolizado del Paso A en el tubo propiamente etiquetado. Mezcle bien.
3. Ajuste el instrumento cero absorbencia a 415 nm usando agua desionizada como blanco.
4. Lea y registre los valores de absorbencia para CALIBRADOR, CONTROL, MUESTRA 1, etc. Estas lecturas son para el total de hemoglobina.

ESTABILIDAD DE LA REACCION FINAL DEL PRODUCTO:

Las muestras ensayadas deben leerse antes de una hora.



CALIBRACION:

El Calibrador de Glicohemoglobina (Cat. No. GH-40) tiene un valor asignado establecido por un método de referencia aceptado (1) y debe usarse para la calibración de este método. Refiérase a la hoja de instrucciones del instrumento para instrucciones especiales de manejo.

CONTROL DE CALIDAD:

La confiabilidad de los resultados de la prueba deben ser monitoreados regularmente usando materiales de control de calidad adecuados analizados de la misma manera que los Desconocidos. EAGLE DIAGNOSTICS tiene disponibles para este propósito tres niveles de control: Normal (GH-50), Medio (GH-70) y Elevado (GH-60). La falla en alcanzar los valores ensayados de materiales de control recién preparados debe ser ampliamente investigada antes de reportar los valores del paciente.

CALCULO DE RESULTADOS

Los usuarios del GLYCO-METER Eagle deben referirse al manual del instrumento para instrucciones completas. El cálculo mayor de resultados para los desconocidos debe determinarse de la siguiente manera.

Para cada muestra, calcule la variación (R) de la absorbencia de glicohemoglobina a la absorbencia total de hemoglobina. Use la siguiente ecuación para determinar las concentraciones de los Desconocidos:

1) Absorbencia Calibrador Glyco = R (Variación del Calibrador)

Absorbencia Calibrador Total

2) Absorbencia Desconocida Glyco = (Variación de Desconocidos)

Absorbencia Desconocida Total

3) R (Variación de Desconocidos) X Valor de Calibrador (5) = Glico % de Desconocidos

R (Variación de Calibrado)



EJEMPLO:

Un calibrador conteniendo 10.0% de glicohemoglobina tuvo una Abs.+0.610 para la fracción de glicohemoglobina y una Abs.+ 0.635 para la fracción total de hemoglobina. Una muestra desconocida tuvo una Abs. de Glicohemoglobina = 0.775 y una Abs. de Total de Hemoglobina = 0.710, la concentración de glicohemoglobina del Desconocido es:

$$R \text{ Calibrador} = \frac{0.610}{0.635} = 0.961$$

0.635

$$R \text{ Desconocido} = \frac{0.775}{0.710} = 1.09$$

0.710

$$\% \text{ Desconocido} = \frac{1.09}{0.961} \times 10.0\% = 11.3\%$$

0.961

LIMITACIONES

Las muestras de pacientes con hemoglobinopatías o tiempos disminuídos de supervivencia de células rojas pueden mostrar resultados incorrectos. Vea la Sección sobre RECOLECCION DE LA MUESTRA.

VALORES ESPERADOS:

Este procedimiento de Glicohemoglobina reporta valores como una Glicohemoglobina A1 (a+b+c):

NORMAL 6.0-8.3%

BUEN CONTROL 7.5-9.0%



REGULAR CONTROL 9.0-10.0%

POBRE CONTROL >10.0%

Recientemente los expertos han sugerido que los métodos de glicohemoglobina deben reportar valores en relación a la Hemoglobina 1c. Al compararse con un método de referencia A1, el método Eagle mostró una correlación de 98% con una ecuación de:

$$Y (\text{valor A1c}) = 0.838 X (\text{valor Eagle}) - 0.732$$

El valor obtenido por el método Eagle puede ser convertido a un valor Calculado A1c al usar esta fórmula. Para un valor directo Calculado A1c, el valor del calibrador puede ser cambiado a = 7.6% en proporción al 10.0% y los resultados reportados serán valores A1c (calculado).

Si los resultados son reportados como A1c Calculado, use entonces como VALORES ESPERADOS:

NORMAL 4.2% - 6.2%

BUEN CONTROL 5.5% - 6.8%

REGULAR CONTROL 6.8% - 7.6%

POBRE CONTROL >7.6%

PROMEDIO DE GLUCOSA SANGUINEA ESTIMADA

En una prueba de estudio realizada por el Dr. D.M. Nathan (5), la prueba de glicohemoglobina mostró tener una correlación linear con los resultados del promedio de glucosa sanguínea de pacientes que monitoreaban frecuentemente sus niveles de glucosa. Esta relación se describe mejor como una línea recta entre valores de glicohemoglobina A1 en un rango de variación de 6.5 - 13.0% con la ecuación:

$$\text{MBG (mg/dL)} = 36.7 X \text{ valor A1} - 185$$

Usando esta ecuación, Eagle Diagnostics ha producido una tabla para convertir los resultados del % de glicohemoglobina A1 a un valor estimado MBG. Contacte el Servicio al Cliente de Eagle Diagnostics para obtener una copia de esta tabla de conversión.



CARACTERISRTICAS DE DESEMPEÑO

LINEARIDAD:

Este Procedimiento de Glicohemoglobina muestra una linealidad para niveles de glicohemoglobina en el rango de 4.0%-20%. Las muestras de sangre con un total de hemoglobina mayor que 18 g/dL deben diluirse x 2 con agua des-ionizada antes de ensayarse.

PRECISION:

Dentro del Ensayo. La precisión dentro del ensayo fue establecida al ensayara sangre con niveles normales y elevados de glicohemoglobina veinte veces cada una.

MEDIA VARIAC. ESTD. %CV

Normal 7.8 0.21 2.7

Elevada 13.4 0.23 1.7

De ensayo a ensayo. La precisión de ensayo a ensayo fue establecida al ensayar sangre con niveles normales y elevados de glicohemoglobina diez veces cada una, conducidas por un periodo de cinco días.

MEDIA VARIAC. ESTD. %CV

Normal 7.6 0.31 4.1

Elevada 13.0 0.60 4.6

ESPECIFICIDAD:

Un estudio comparativo del Procedimiento Eagle de Glicohemoglobina y otro método comercial ampliamente usado mostró una correlación de 0.96.

SENSIBILIDAD:

Este Procedimiento de Glicohemoglobina tiene una sensibilidad de 0.02% de glicohemoglobina por 0.001 unidades de absorción.

REFERENCIAS

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., y Lai, T.H., New Eng. J. Med. 284, 353 (1971).
2. Goen, B., y Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
3. Gabby, K.H., Hasty, K., Breslow, J.L., Ellison, et al. Clin Endocrinol. Metab. 44, 859 (1977).
4. Bates, H.M., Lab. Manag. Vol. 16,(Enero 1978).