

Glycohemoglobina Reactivo 40 Pruebas

Uso:

Para la determinación cuantitativa de Glycohemoglobina (HbA_{1c}) en sangre por medio de un intercambio catiónico de resinas. La prueba es usada para monitorear el control de glucosa en períodos de tiempo prolongados en pacientes con diabetes mellitus.

Resumen y Explicación de la Prueba

Durante la vida circulatoria de las células rojas, la glycohemoglobina se forma continuamente por la aducción de glucosa a la N-terminal de la cadena beta de hemoglobina. Este proceso, el cual es no-enzimático, refleja el promedio de exposición de hemoglobina a glucosa a través de un período extenso. En un estudio clásico, Trivelli et al¹ muestra que la glycohemoglobina en pacientes diabéticos se eleva 2 a 3 veces más sobre los niveles encontrados en pacientes normales. Varios investigadores recomiendan que la glycohemoglobina sirve como un indicador del control metabólico de los diabéticos, desde que los niveles de glycohemoglobina se acercan a las normales de diabéticos con control metabólico.^{2,3,4}

La Glycohemoglobina ha sido definida operacionalmente como la "fracción rápida" hemoglobinas (HbA_{1a}, A_{1b}, A_{1c}) que eluden primero durante el intercambio cromatográfico con intercambio-catiónico de resinas. La hemoglobina no-glycosilada, la cual consiste de la mayoría de la mayoría de la hemoglobina ha sido designada como HbA₀. El presente procedimiento de glycohemoglobina emplea un débil intercambio-catiónico de resinas para la rápida separación de la glycohemoglobina (fracción rápida) de la hemoglobina no-glycosilada. Alrededor del 80% de la fracción de glycohemoglobina es removida durante el paso de separación en este procedimiento, debido a la inclusión del sistema de buffer de borato.⁵

Principio

Una preparación previa de sangre total es continuamente mezclada por 5 minutos con un enlace débil de intercambio-catiónico de resinas. Durante este tiempo, la HbA₀ se enlaza a la resina. Después del periodo de mezclado, un filtro es usado para separar el sobrenadante que contiene la glycohemoglobina de la resina. (Nota: Este enlace es dependiente de la temperatura, por lo tanto un estándar tiene que ser incluido en cada ensayo.) El porcentaje de Glycohemoglobina es determinado por la medición de la absorbancia a 415 nm (405-420 nm aceptable) de la fracción de glycohemoglobina y la fracción de hemoglobina total. La proporción de dos absorbancias da como resultado el porcentaje de glycohemoglobina.

Reactivos

Equipo para 40 Pruebas:

Frasco de 1 x 120ml 8mg/ml con Resina de Intercambio-catiónico en buffer de Borato, pH 6.9.

Frasco de 1 x 30ml con Resina Lizante de Glycohemoglobina, 10mM Potassium Cyanide, es agregado como surfactante.

40 separadores para sueros.

Almacenamiento del Reactivo

Almacene el reactivo a Temp. Ambiente (21-26°C).

Fecha de Vencimiento

Todos los reactivos son estables hasta la fecha de vencimiento puesta en las etiquetas de cada reactivo. No use este producto después de la fecha de vencimiento.

Deterioro del Reactivo

Alguna alteración en la apariencia física de los reactivos o valores de control fuera del rango aceptable por el fabricante puede ser indicador del deterioro del reactivo.

Instrumentos

Use espectrofotómetros disponible para leer 415 nm con linealidad en unidades de por lo menos 1.5 O.D. (405-420 nm es aceptable.)

Precauciones

1. Este reactivo es únicamente para uso diagnóstico *in-vitro*
2. No es para uso interno o externo en humanos o animales. El reactivo lizante contiene cianuro (veneno). No ingerir. No mezclar con ácido o gas HCN el cual puede ser liberado.

Preparación y Colección de la muestra

No se necesita una preparación especial del paciente. No se necesitan muestras en ayuno. No se requiriere aditivos o preservativos especiales u otros anticoagulantes. Coleccione sangre venosa con EDTA usando una técnica aséptica. Todas las muestras humanas son potencialmente peligrosas. Por lo tanto tomar las precauciones debidas para su manejo y colección (guantes, bata de laboratorio, evitar la producción de aerosoles, etc.)

Almacenamiento

La Glycohemoglobina en sangre total colectada en tubo con EDTA es estable por una semana a 2-8°C.

Interferencias

Muestras severamente lipémicas pueden dar valores elevados. Ha sido reportado que la bilirrubinemia interfiere con métodos de intercambio de iones.⁶

La Hemoglobina Fetal (HbF) puede interferir en este ensayo. Muestras de sangre con Hemoglobina Total arriba de 18 g/dl deben ser diluidas x 2 con agua deionizada antes del procedimiento.

Materiales Proveídos

Ver sección de "Reactivos"

Materiales Requeridos pero no Proveídos

1. Micro pipetas de 20 µl y 100 µl
2. Pipetas o Dispensores de 500 µl, 3 ml y 5 ml
3. Tubos de Vidrio 13 x 100 mm
4. Tubos de plástico o vidrio con capacidad de 0.6 ml y 5 ml
5. Agitador o Rotador (e.g. Miles Inc., Diagnostics Division 4651)
6. Estándar de Glycohemoglobina (Cat. No. PSI/G7540-STD)
7. Controles de Glycohemoglobina Cat. No. PSI/G7540-2)
8. Agua deionizada

Procedimiento

- A. Preparación del Hemolizado
 1. Dispense 500 µl del Reactivo Lizante dentro de los tubos etiquetados como: Estándar, Control, Paciente, etc. Nota: Tubos de plástico o vidrio pueden ser usados en la medida apropiada.
 2. Agregue 100 µl de la muestra perfectamente mezclada, estándar o Controles dentro del tubo etiquetado como reactivo lizante. Mezcle.
 3. Espere 5 minutos o hasta que la lysis completa sea evidente.
- B. Preparación de la Glycohemoglobina
 1. Dispense 3.0 ml de la Resina de intercambio-catiónico de Glycohemoglobina en un tubo **13 x 100 mm de Vidrio** previamente etiquetado: Estándar, Control, etc. Nota: Antes de usarse, mezcle la resina invirtiéndola por lo menos 10 veces. Gire el frasco después de agregarla resina a cada uno de los tubos.
 2. Agregue 100 µl del hemolizado (del paso A3) al reactivo de resina.
 3. Poner el filtro separador en los tubos hasta que la manga del plástico esté por aproximadamente 1 cm por encima del nivel del líquido.
 4. Ponga los tubos en un agitador o rotador y mezcle continuamente por 5 minutos.
 5. Quite los tubos del agitador.

6. Presione el filtro separador dentro de los tubos hasta que la resina este firmemente compactada.
 7. Pasar el sobrenadante a otro tubo o vaciarlo directamente a la cubeta en la que se va a medir la lectura de absorbancia.
 8. Poner el instrumento en cero con blanco de agua deionizada a 415 nm. (405-420 nm aceptable).
 9. Lea el record de absorbancias del Estándar, Control, etc. Estas lecturas son para la glycohemoglobina.
- C. Fracción de Hemoglobina Total
1. Dispense 5.0 ml de agua deionizada en los tubos de plástico o vidrio etiquetados como Estándar, Control, etc.
 2. Agregue 20 µl del hemolizado (del paso A3) a los tubos etiquetados como diluyente de hemoglobina total. Mezclar.
 3. Ajustar el instrumento en cero de absorbancia a 415nm (405-420 nm aceptable) con agua deionizada como blanco.
 4. Lea el record de absorbancias del Estándar, Control, etc. Estas lecturas son para Hemoglobina Total.

NOTA: Esta prueba de glycohemoglobina puede realizarse a temperatura ambiente, 21-26°C. Los productos de las reacciones finales para glycohemoglobina y hemoglobina total son completamente estables. Sin embargo las muestras de los pacientes tienen que ser leídas dentro de una hora antes de que empiece una evaporación significativa.

Limitaciones

1. Este ensayo no debe ser usado para el diagnostico de diabetes mellitus.
2. Este método puede ser influenciado por la temperatura. Muestras de pacientes, deben siempre procesarse con un calibrador incluido en la corrida de la prueba, para eliminar influencias y variantes por temperaturas.
3. Hbs Glycosilada y el enlace HbC mas estrechos que HbA, producen valores bajos. Otras hemoglobinopatías (ej. Beta-talasemia y anemia hemolítica también dan resultados bajos.)
4. Los resultados pueden ser inconsistentes en pacientes que tienen las siguientes condiciones: adicción a los opiáceos, envenenamiento con plomo, uremia (carbamylated Hb), alcoholismo, ingestión de grandes dosis de aspirina.^{7,8,9,10}

Control de Calidad

La veracidad de los resultados de las muestras podría ser monitoreada cuando las muestras de los pacientes son procesadas usando un estándar y materiales de control de calidad en la misma sesión usada para muestras desconocidas. Se recomienda el uso de controles de glycohemoglobina con un rango de valores promedio conocidos. Si los controles no caen dentro de los rangos aceptables en la tabla de controles, los valores obtenidos para los pacientes no serían reales y se tendría que repetir la prueba y seguir perfectamente las instrucciones sobretodo los pasos de mezclado de reactivos y de muestras según las indicaciones.

La linealidad de la prueba podría revisarse con un equipo especial para linealidad, o hacienda diluciones de una muestra con resultados elevados, todo esto por lo menos cada seis meses.

Cálculos

Los resultados de muestras desconocidas son calculados de la sig. manera: Para cada muestra, calcule el radio (R) de la absorbancia de la Glycohemoglobina a la absorbancia de la hemoglobina total. Use la sig. Ecuación para determinar las concentraciones desconocidas:

$$(\%) \text{ Desconocido} = \frac{R (\text{Desc})}{R (\text{Estándar})} \times \text{Conc. Del Estándar} (\%)$$

Ejemplo: Un estándar contiene 10 % de glycohemoglobina y obtuvo una Abs.=0.490 para la fracción de glycohemoglobina y una Abs.=0.560 para la fracción de hemoglobina total. Una muestra desconocida de glycohemoglobina dio una Abs.=0.750 y una Abs.= 0.625 de Hemoglobina total. Por lo tanto, a concentración de una muestra desconocida es:

$$\text{Estándar R} = \frac{0.490}{0.560} = 0.875$$

$$\text{Desconocido R} = \frac{0.750}{0.625} = 1.200$$

$$\% \text{ Desconocido} = \frac{1.200}{0.875} \times 10.0\% = 13.7\%$$

Valores Normales

Normal: 6.0 – 8.3%

El rango normal representa el 95 % de confiabilidad entre 75 personas con valores normales de glucosa y sin un historial diabético. Cada laboratorio tiene que establecer el promedio de sus propios valores normales esperados. El uso en general de Hb glycosilada es para monitorear pacientes diabéticos, Esto es, en un paciente con Hb glycosilada detectable, significa que 3 o 4 semanas antes ya reflejaba cambios en sus niveles de glucosa en sangre.

Desempeño

1. Linealidad: La prueba de glycohemoglobina muestra una linealidad para los niveles de glycohemoglobina en un rango de 4.0%-20%.
2. Estudio Comparativo: Un estudio en muestras humanas normales y anormales entre este procedimiento de glycohemoglobina y uno similar usando procedimiento por columnas produce un coeficiente de correlación de 0.970 y una ecuación de regresión lineal de $y=1.10x-3.00$. (n=36, rango=5.9-14.2%)

3. Precisión:

Entre pruebas: La precisión entre pruebas fue establecida por el ensayo en sangre de niveles normales y elevados de glycohemoglobina por 20 veces cada una.

Nivel	Signif.	Desv. Est.	% C.V.
Normal	7.7	0.24	3.1
Elevado	12.8	0.21	1.6

Prueba a Prueba: La precisión entre pruebas fue establecida corriendo sangres con niveles de glycohemoglobina normales y elevados por 10 veces por 5 días.

Nivel	Signif.	Desv. Est.	% C.V.
Normal	8.0	32	4.0
Elevado	14.8	0.45	3.0

4. Sensibilidad: Este procedimiento tiene una sensibilidad de 0.02 % de glycohemoglobina por 0.001 unidades de absorbancia.

Referencias

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284,353 (1971).
2. Gonen, B., and Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
3. Gabbay, K.H., Hasty, K., Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F., and Gallop, P.M., J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 859 (1977).
4. Bates, H.M., Lab. Mang., Vol 16 (Jan. 1978).
5. PSI Records (8/84).
6. Eissler, S.M., Diabetes 29, p. 467-474 (1980).
7. Coriello, A., et al, Diabetologia 22, p. 379 (1962).
8. Goldstein, D.E., et al, Clin. Chem. 32, pp. 364-370 (1986).
9. Fluckiger, R., et al, Med Intelligence 304 p. 823-827 (1981).
10. Nathan, D.M., et al, Clin. Chem. 29, p. 466-469 (1983).

Rev 2/02 P803-G7540-01



DISTRIBUIDOR:
MYM Laboratory & Medical Supply, Inc.
 8684 Ave. de la Fuente Ste. 14
 San Diego CA. 92154
 Tel. (619) 710-0126 Fax. (619) 710-0297
 www.mymssupply.com
 email: mail@mymssupply.com