

USO:

Para la determinación cuantitativa de Glicohemoglobina (HbA₁) en sangre por medio de un intercambio iónico de resinas. La prueba es usada para monitorear el control de glucosa en períodos de tiempo prolongados en pacientes con diabetes mellitus.

RESUMEN

Durante la vida circulatoria de las células rojas, la glicohemoglobina 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 al muestra que la glicohemoglobina en pacientes diabéticos se eleva 2 a 3 veces más sobre los niveles encontrados en pacientes normales. Varios investigadores recomiendan que la glicohemoglobina sirve como un indicador del control metabólico de los diabéticos.

La glicohemoglobina ha sido definida operacionalmente como la "fracción rápida" hemoglobinas (HbA_{1a}, A_{1b}, A_{1c}) que eluden primero durante el intercambio cromatográfico con intercambio-iónico de resinas. La hemoglobina no-glicosilada, la cual consiste en la mayoría de la hemoglobina ha sido designada como HbA₀.

El presente procedimiento de glicohemoglobina emplea un débil intercambio-iónico de resinas para la rápida separación de la glicohemoglobina (fracción rápida) de la hemoglobina no-glicosilada. Alrededor del 80% de la fracción de glicohemoglobina es removida durante el paso de separación en este procedimiento, debido a la inclusión al sistema del buffer de borato.

PRINCIPIO

Una preparación previa de sangre total es continuamente mezclada por 5 minutos con un enlace débil de intercambio-iónico 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 glicohemoglobina 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 glicohemoglobina es determinado por la medición de la absorbancia a 415 nm (405-420 nm aceptable) de la fracción de glicohemoglobina y la fracción de hemoglobina total. La proporción de dos absorbancias da como resultado el porcentaje de glicohemoglobina.

REACTIVOS

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

Frasco de 1 x 30 ml con Resina Lizante de glicohemoglobina, 10mM Cianuro de Potasio y surfactante

Almacene el reactivo a Temperatura ambiente (21-26°C).

Este reactivo es únicamente para uso diagnóstico *in-vitro*

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.

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.

El reactivo lizante contiene cianuro de Potasio. No ingerir. No mezclar con ácido o gas HCN el cual puede ser liberado.

COLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPECÍMEN

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.)

La glicohemoglobina 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 bilirubinemia 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 des-ionizada antes del procedimiento.

MATERIAL

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, y surfactante.

40 separadores para sueros.

MATERIAL SOLICITADO NO PROVISTO

Instrumentos de pipeteo.

Tubos de ensayo y gradilla

Agitador o Rotador

Agua des-ionizada

Espectrofotómetro a 415 nm.

PROCEDIMIENTO (MANUAL)

- A. Preparación del Hemolizado
1. Dispense 500 µl del Reactivo Lizante dentro de los tubos etiquetados como: Estándar, Control, Paciente, etc.
 2. Agregue 100 µl de la muestra perfectamente mezclada, estándar o Controles dentro del tubo etiquetado como reactivo lizante.
 3. Mezcle. 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-iónico de Glycohemoglobina en un tubo previamente etiquetado: Estándar, Control, etc.
Nota: Antes de usarse, mezcle la resina invirtiéndola por lo menos 10 veces. Gire el frasco después de agregarle la resina a cada uno de los tubos.
 2. Agregue 100 µl del hemolizado 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 esté 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 des-ionizada 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 des-ionizada en los tubos 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 des-ionizada 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 más estrechos que HbA, producen valores bajos.
4. Otras hemoglobinopatías (ej. Beta-talasemia y anemia hemolítica también dan resultados bajos.)
5. 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.

CALCULOS

Los resultados de muestras desconocidas son calculados de la siguiente 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:

$$(\%) \text{ Desconocido} = \frac{R \text{ (Desconocido)}}{R \text{ (Estándar)}} \times \text{Concentración del Estándar } (\%)$$

Un estándar contiene 10 % de glicohemoglobina

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 glicohemoglobina con un rango de valores promedio conocidos. Si los resultados no caen dentro de los rangos aceptables en la tabla de controles, los valores obtenidos para los pacientes no son reales y se tiene que repetir la prueba y seguir perfectamente las instrucciones sobre todo los pasos de mezclado de reactivos y de muestras según las indicaciones.

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

VALORES ESPERADOS

6.0 – 8.3%

LINEARIDAD

4.0%-20%.

FABRICADO POR:

POINTE SCIENTIFIC, INC.
E.E.U.U.