



# HbA1c v.2

Método de inhibición inmunoturbidimétrica para la determinación cuantitativa de HbA1c

## SIGNIFICACION CLINICA

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, que comprende un conjunto de desórdenes del metabolismo de los hidratos de carbono que cursan con una manifestación común: la hiperglicemia.

El control glicémico periódico permite prevenir los trastornos agudos y reducir el riesgo de las complicaciones tardías de la enfermedad (retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedades cardiovasculares).

La relación entre el desarrollo y progresión de las complicaciones microvasculares y el control glicémico ha sido debatida por muchos años, en parte debido a los métodos inadecuados para realizar un control glicémico retrospectivo. Los métodos tradicionales de medición de glucosa en sangre y orina tienen un valor limitado para este propósito, y sólo fue con el desarrollo de determinaciones para proteínas glicosiladas o glicadas, que se ha logrado un conocimiento exacto y objetivo del estado glicémico a largo plazo.

Las glicohemoglobinas, también llamadas hemoglobinas glicosiladas o glicadas, fueron descritas por primera vez en 1968 por Rahbar como "hemoglobinas diabéticas". Su producción depende de la concentración de glucosa y ocurre a través de un proceso no enzimático post-traducciona llamado glicación, donde el azúcar es unido a los grupos amino de las moléculas de hemoglobina (Hb). La glicación de los aminoácidos N-terminales de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  como así también los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina en la molécula de hemoglobina, resultan en una variedad de hemoglobinas glicadas, incluyendo HbA1c, que es la especie glicosilada en la valina N-terminal de la cadena  $\beta$ .

Los niveles de HbA1c son proporcionales a la concentración de glucosa en sangre durante las últimas 6-8 semanas. Así, la determinación de HbA1c provee un parámetro integral para el control glicémico a largo plazo en el paciente diabético.

## FUNDAMENTOS DEL METODO

**HbA1c v.2 Turbitest AA** es un método de inhibición inmunoturbidimétrica para determinar la cantidad de hemoglobina A1c (HbA1c) como una proporción de la hemoglobina total, en sangre entera humana (% o mmol/mol HbA1c). Para ello, es necesario liberar la hemoglobina contenida en los glóbulos rojos, mediante la hemólisis de la muestra. La sangre del paciente se pone en contacto con el **Reactivo Hemolizante** que contiene un detergente (bromuro de tetradeciltrimetilamonio - TTAB) que lisa los glóbulos rojos específicamente. A partir del hemolizado obtenido, se determina mediante dos reacciones independientes, el nivel de HbA1c y Hb de la muestra.

## HbA1c

Durante la primera fase de la reacción, la HbA1c de la muestra reacciona con el anticuerpo específico anti-HbA1c (Reactivo A<sub>1</sub>), formando complejos antígeno-anticuerpo solubles. Dado que la molécula de HbA1c posee un solo epítopo por  $\beta$ -globina para la fijación del anticuerpo específico, no pueden formarse redes de inmunocomplejos.

Con la adición del polihapteno (Reactivo A<sub>2</sub>), que posee numerosos epítopos por molécula, se produce la reacción de dichas moléculas con el exceso de anticuerpo específico de la primera reacción, dando lugar a inmunocomplejos insolubles que pueden ser medidos turbidimétricamente a 340 nm. De esta manera, cuanto mayor es el contenido de HbA1c de la muestra, menor es la formación de inmunocomplejos insolubles y menor la señal turbidimétrica obtenida.

## Hb

La hemoglobina liberada al hemolizar la muestra, es convertida en un derivado que puede ser medido espectrofotométricamente (Reactivo B).

Este método es capaz de detectar todas las variantes de hemoglobina glicadas en la porción N-terminal de la cadena  $\beta$ , cuya región reconocida por el anticuerpo es idéntica a la HbA1c. De esta manera permite controlar el estado metabólico del diabético con hemoglobinopatías y uremia.

## REACTIVOS PROVISTOS

**A<sub>1</sub>. Reactivo A<sub>1</sub>:** anticuerpos monoespecíficos anti-HbA1c en buffer pH 6,2.

**A<sub>2</sub>. Reactivo A<sub>2</sub>:** polihapteno-HbA1c en buffer pH 6,2.

**B. Reactivo B:** buffer fosfato pH 7,4.

## REACTIVOS NO PROVISTOS

- **HbA1c Calibrator Turbitest AA** de Wiener lab.

- **Reactivo Hemolizante**, de Wiener lab.

- Agua desmineralizada.

- Solución fisiológica.

## INSTRUCCIONES PARA SU USO

**Reactivos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y B:** listos para usar.

**Reactivo Hemolizante:** listo para usar.

**HbA1c Calibrator Turbitest AA:** ver reconstitución en el manual de instrucciones correspondiente. El calibrator no requiere tratamiento previo con el Reactivo Hemolizante.

## PRECAUCIONES

Los Reactivos Provistos son para uso diagnóstico "in vitro". El detergente TTAB es corrosivo. H314: Provoca quema-

duras graves en la piel y lesiones oculares graves. P305 + P351 + P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando. P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

## ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Los **Reactivos Provistos** son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar.

**Reactivos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y B:** una vez abiertos y en uso son estables 1 mes en refrigerador (2-10°C). Se recomienda conservar los reactivos en heladera bien cerrados cuando no se usan, para evitar recalibraciones frecuentes. No congelar.

**Reactivo Hemolizante:** estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en el rótulo. Evitar contaminaciones (no introducir pipetas u otros elementos en su interior) y cerrar el frasco luego de su uso.

## MUESTRA

Sangre entera anticoagulada

**a) Recolección:** obtener la muestra de la manera usual.

**b) Aditivos:** se recomienda el uso de heparina o EDTA (**Anticoagulante W** de Wiener lab) como anticoagulante.

**c) Sustancias interferentes conocidas:** no se observan interferencias por bilirrubina (conjugada y no conjugada) hasta 40 mg/dL, triglicéridos hasta 13 g/L, ácido ascórbico hasta 50 mg/dL y factor reumatoideo hasta 500 U/mL.

Deberán interpretarse con cuidado los valores de HbA1c obtenidos en aquellas patologías o situaciones que alteran la vida media de los eritrocitos, como anemias hemolíticas, anemias ferropénicas, transfusiones, pérdidas de sangre, etc. Referirse a las bibliografías de Young para los efectos de las drogas y las enfermedades en el presente método.

**d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** la muestra es estable 3 días a temperatura ambiente (15-25°C), 7 días refrigerada (2-10°C) o 6 meses congelada (-20°C). Sólo puede ser descongelada una vez.

## PREPARACION DE LA MUESTRA

Permitir que el Reactivo Hemolizante tome temperatura ambiente antes de usar. Homogeneizar la muestra de sangre por inversión repetida, evitando la formación de espuma. En un tubo de Kahn o hemólisis, agregar:

<b>Reactivo Hemolizante</b>	1000 uL
<b>Muestra</b>	10 uL

Mezclar, agitando por inversión repetida o bien emplear vortex. Evitar la formación de espuma. Después del cambio de color rojo a marrón verdoso (1-2 minutos), la muestra hemolizada podrá ser empleada.

**Estabilidad de muestras hemolizadas:** estables 4 horas a temperatura ambiente (15-25°C), 24 horas refrigeradas (2-10°C) o 6 meses congeladas (-20°C). Sólo pueden ser descongeladas una vez.

## MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Analizador automático.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de Kahn o hemólisis.

## CONDICIONES DE REACCION

### Parámetros generales para analizadores automáticos:

Nombre del test	HbA1c
Tipo de reacción	punto final
Long. de onda primaria	340 nm
Temperatura	37°C
Volumen de muestra	10 uL
Volumen de Reactivo A <sub>1</sub>	250 uL
Volumen de Reactivo A <sub>2</sub>	50 uL
Incubación de Reactivo A <sub>1</sub>	300"
Incubación de Reactivo A <sub>2</sub>	300"
Calibración	5 puntos
Calibradores	Diluciones del Calibrador: 10, 20, 40, 60 y 100%*

\*Las diluciones de HbA1c Calibrator se realizan con Reactivo Hemolizante.

Nombre del test	Hb
Tipo de reacción	punto final
Long. de onda primaria	570 nm
Long. de onda secundaria	660 nm
Temperatura	37°C
Volumen de muestra	20 uL
Volumen de Reactivo B	230 uL
Incubación de Reactivo B	300"
Calibración	2 puntos
Calibradores	C0* y HbA1c Calibrator

\*Como C0 (calibrador cero) puede utilizarse solución fisiológica o Reactivo Hemolizante.

Los volúmenes de muestra y reactivos pueden variarse proporcionalmente, sin que se alteren los factores de cálculo. Solicitar adaptaciones para los analizadores comercializados por Wiener lab. Las adaptaciones no provistas por Wiener lab. deben ser validadas.

## CALCULO DE LOS RESULTADOS

### 1) Expresión de resultados según IFCC:

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \times 1000$$

### 2) Expresión de resultados según DCCT/NGSP:

$$\text{HbA1c (%) = } 91,5 \times \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} + 2,15$$

Se recomienda el empleo de un decimal para la expresión de resultados NGSP (%) y sin decimales para los resultados IFCC (mmol/mol).

#### METODO DE CONTROL DE CALIDAD

HbA1c Control normal-patológico Turbitest AA.

Los controles no requieren tratamiento previo con el Reactivo Hemolizante.

#### VALORES DE REFERENCIA

Personas con metabolismo normal:

1- HbA1c (mmol/mol): 29 - 42 (según IFCC)

2- HbA1c (%): 4,8 - 5,9 (según DCCT/NGSP)

En base a los estudios de DCCT y UKPDS se considera que niveles mayores a 7% (DCCT/NGSP) o 53 mmol/mol (IFCC) de HbA1c se asocian a mayor riesgo de complicaciones crónicas.

En general se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia, dentro de su población de pacientes.

#### LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Los componentes del kit HbA1c v.2 Turbitest AA son lote-específicos por lo que no pueden intercambiarse con otros lotes. Se recomienda realizar una recalibración completa (HbA1c y Hb), cuando se cambia de lote de reactivo o cuando el control de calidad así lo determina.

Este método fue diseñado para informar HbA1c (mmol/mol) o HbA1c (%), por lo que no deben ser informados individualmente los valores de HbA1c y Hb.

Para preservar la integridad de los reactivos debe evitarse todo tipo de contaminaciones, empleando para la medición únicamente micropipetas perfectamente limpias y secas.

#### PERFORMANCE

**a) Imprecisión:** fue evaluada a través del protocolo EP5-A de CLSI. Para ello se procesaron en Konelab 60i, 3 muestras con niveles diferentes de HbA1c (%), obteniéndose los siguientes resultados:

##### Precisión intraensayo

#### Hb

Nivel	D.S.	C.V.
15,1 g/dL	0,093 g/dL	0,6 %
13,2 g/dL	0,061 g/dL	0,5 %
17,7 g/dL	0,152 g/dL	0,9 %

#### HbA1c

0,58 g/dL	0,006 g/dL	1,1 %
0,68 g/dL	0,006 g/dL	0,9 %
1,23 g/dL	0,016 g/dL	1,3 %

#### %HbA1c

5,7 %	0,049 %	0,9 %
6,9 %	0,054 %	0,8 %
8,5 %	0,087 %	1,0 %

#### Precisión total

#### Hb

Nivel	D.S.	C.V.
15,1 g/dL	0,132 g/dL	0,9 %
13,2 g/dL	0,081 g/dL	0,6 %
17,7 g/dL	0,203 g/dL	1,2 %

#### HbA1c

0,58 g/dL	0,013 g/dL	2,2 %
0,68 g/dL	0,013 g/dL	1,9 %
1,23 g/dL	0,036 g/dL	2,9 %

#### %HbA1c

5,7 %	0,076 %	1,3 %
6,9 %	0,092 %	1,3 %
8,5 %	0,195 %	2,3 %

**b) Rango de medición de HbA1c:** se pueden obtener valores de HbA1c entre 0,3 g/dL y la concentración del HbA1c Calibrator (2,6 g/dL), que corresponde a un rango dinámico aproximado de 23 a 200 mmol/mol de HbA1c según IFCC y de 4,3 a 20,5% según DCCT/NGSP, considerando un nivel de Hb normal (13 g/dL).

Si la concentración de HbA1c es menor a 0,3 g/dL, se aconseja hemolizar la muestra original 1 + 50 con el Reactivo Hemolizante y repetir las determinaciones de HbA1c y Hb, no requiriendo corrección de los resultados obtenidos.

Si la concentración de HbA1c es mayor a la concentración del calibrador más alta, se aconseja diluir el hemolizado 1+1 o hemolizar la muestra original 1 + 200 con el Reactivo Hemolizante y repetir las determinaciones de HbA1c y Hb, no requiriendo corrección de los resultados obtenidos.

**c) Rango de medición de Hb:** 6 a 30 g/dL.

#### PRESENTACION

1 x 50 mL Reactivo A<sub>1</sub>  
1 x 10 mL Reactivo A<sub>2</sub>  
1 x 50 mL Reactivo B  
(Cód. 1453861)

2 x 50 mL Reactivo A<sub>1</sub>  
2 x 10 mL Reactivo A<sub>2</sub>  
2 x 50 mL Reactivo B  
(Cód. 1009270)

2 x 52 mL Reactivo A<sub>1</sub>  
2 x 12 mL Reactivo A<sub>2</sub>  
2 x 52 mL Reactivo B  
(Cód. 1009385)

2 x 60 mL Reactivo A<sub>1</sub>  
2 x 12 mL Reactivo A<sub>2</sub>  
2 x 60 mL Reactivo B  
(Cód. 1009651)

Wiener lab. provee separadamente:

#### Reactivo Hemolizante:


- 1 x 500 mL (Cód. 1999701)

## BIBLIOGRAFIA

- Rahbar, S. - Clin. Chim. Acta 22: 296 (1968).
- Bunn, H. et al - Science 200: 21 (1978).
- Goldstein, D. et al - Diabetes Care 17 : 938 (1994).
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group - N. Engl. J. Med. 329: 977 (1993).
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group - Lancet 352: 837 (1998).
- Sacks, D. et al - Clin Chem 48: 436 (2002).
- Weykamp CW et al. - Clin. Chem. 41: 82 (1995).
- Sacks, D. - Clin Chem 49: 1245 (2003).
- Martina, W et al - Clin Chem 39 : 2259 (1993).
- Karl, J. et al - Klin. Lab 39:991 (1993).
- American Diabetes Association. Diabetes Care [Suppl] 24/1 (2001).
- John, G - Clin. Chem. Lab. Med. 41: 1199 (2003).
- Jeppsson, J. et al. - Clin. Chem. Lab. Med. 40: 78 (2002).
- Jarausch, J et al - Clin Chem. 42 :116 (Abstract 094) (1996).
- Junge, W et al. - Poster presentation 18<sup>th</sup> International Diabetes Federation Congress, Paris 2003.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Burtis, C.; Ashwood, E. (5<sup>o</sup> Edition) WB Saunders, 2001.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5 th ed., 2000.
- Hanas, R. - Clin Chem Lab Med 48 (6) 775-776 (2010).

## SIMBOLOS

Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución

 Contenido

 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Cáustico

 Irritante

 Consultar instrucciones de uso


 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 - Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com.ar>  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica  
Producto Autorizado A.N.M.A.T.  
PM-1102-85



**Wiener lab.**

2000 Rosario - Argentina