



TECO GRAM S.A.
Av. San Jorge 428 y 10ma.
Guayaquil - Ecuador
042396966 – 042397979 – 042396610
tecogram@gye.satnet.net

Juego de Reactivos Para Glicohemoglobina

JUEGO DE REACTIVOS PARA GLICOHEMOGLOBINA

Para la determinación de glicohemoglobina en sangre.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Durante la vida circulante de los glóbulos rojos, la glicohemoglobina se forma continuamente por la agregación de la glucosa al N-terminal de la cadena beta de la hemoglobina. Este proceso, el cual no es enzimático, refleja la exposición de la hemoglobina y la glucosa por determinado periodo. En un estudio clásico, Trivelli y colaboradores demostraron que el nivel de la glicohemoglobina se eleva de 2 a 3 veces en los sujetos diabéticos con respecto a los sujetos normales. Varios investigadores han recomendado que la glicohemoglobina sirve como indicador del control del diabético, puesto que los niveles de la glicohemoglobina se acercan a los valores normales de los diabéticos en el control metabólico.

La glicohemoglobina a sido definida operacionalmente como la “fracción rápida” de las hemoglobinas (HbA_{1a}, A_{1c}) la cual se presenta primero durante la cromatografía con resinas de intercambio catiónico. La hemoglobina no glicosilada ha sido llamada HbA₀. Este procedimiento para hemoglobina utiliza una resina débil de intercambio catiónico para la separación rápida de la glicohemoglobina (fracción factor) de la hemoglobina no glicosilada.

PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

Una preparación hemolizada de la sangre total mezclada continuamente durante 5 minutos con una resina débil de intercambio catiónico. Durante este tiempo de la HbA₀. Se une la resina. Después del periodo de mezcla, se usa un filtro para separar un sobrenadante que contiene la glicohemoglobina de la resina. El por ciento de la glicohemoglobina se determina midiéndola absorbancia a 415nm. De la fracción glicohemoglobina y la fracción de la hemoglobina total. La división de la hemoglobina entre la hemoglobina total y su multiplicación por el factor de dilución 10 nos da el por ciento de la glicohemoglobina.

REACTIVOS

Contenido del juego para 40 pruebas:

1frasco: 8mg/ml de resina de intercambio catiónico tamponada a pH 6.9, 120ml

1 frasco: reactivo hemolizante para glicohemoglobina, 10nm de cianuro de potasio, reductor de tensión superficial añadido, 20 ml.

1 vial: standard de glicohemoglobina.

40: separadores de sueros.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

1. Reactivo hemolizante para glicohemoglobina: lleve los contenidos a temperaturas ambiente.

2. Resina de cambio catiónico para glicohemoglobina; lleve a los contenidos a temperatura ambiente. Mezcle por inversión ampliamente por lo menos 10 veces, rote el frasco cada vez que agregue el reactivo a 5 tubos.

ALMACENAMIENTO

Mantenga los reactivos entre 21 – 24° C.

FECHA DE EXPIRACIÓN

Todos los reactivos son estables hasta la fecha de expiración impresa en las etiquetas.

INDICADORES DE INESTABILIDAD FISICA O QUIMICA

Las alteraciones en la apariencia física de los reactivos o valores de control fuera el campo aceptable planteado por el fabricante pueden ser indicadores de inestabilidad del reactivo.

INSTRUMENTOS

Espectrofotometro o colorimétricos capaz de leer en 415nm.

RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y PREPARACIÓN

No es necesaria preparación especial de los pacientes. No se requieran aditivos aparte del coagulante. Obtenga sangre venosa con EDTA usando técnica antiséptica.

CONSERVACIONES

La glicohemoglobina en sangre total con EDTA es estable por una semana entre 2 – 8° C.

SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Muestra con lipemia severa pueden dar resultados elevados. La hemoglobina fetal (HbF) si está presente, tiene características similares a la resina de la absorción. Las glicohemoglobinas HbS y HbC se unen más fuertemente que la HbA₁ y dan resultados más bajos. Otras hemoglobinas tales como la beta talasemia y las anemias hemolíticas también provocan resultados bajos.

MATERIALES PROVISTOS

Se refiere a reactivos.

MATERIALES REQUERIDOS Y NO PROVISTOS

1. Pipetas de 20 y 100 ul.
2. Pipetas de 500 ul 1.3ml y 5ml (o dispensadores)
3. Tubos de cristal de 13 x 100 ml
4. Agitador rotatorio.
5. Controles de glicohemoglobina (valor normal y valor alto).

PROCEDIMIENTO

Detalles del procedimiento:

Preparación del hemolizado.

Dispense 500 ul de reactivo hemolizante en tubos adecuados (plásticos o cristal) y rotúelos: estándar, control, muestras.

Dispense 100 ul de la muestra de sangre bien mezclada. Déjelos en reposo por 5 minutos.

- a) Preparación de la glicohemoglobina
- ◆ Dispense 3.0 ml de resina de intercambio catiónico para glicohemoglobina en tubos de cristal de 13x100. Para muestras, controles y estándar. **Nota: antes de usar mezcle la resina por inversión por lo menos 10 veces que dispense si son algunas muestras.**
 - ◆ Agregue 100 ul de hemolizado (del paso A3)
 - ◆ Coloque los filtros separadores en los tubos de manera tal que la goma quede a 1 cm aproximadamente por encima del nivel del líquido.
 - ◆ Coloque los tubos en el agitador rotatorio y mezclelos continuamente durante 5 minutos
 - ◆ Retire los tubos del rotor.
 - ◆ Empuje los filtros separadores dentro de los tubos hasta que la resina se compacte.
 - ◆ El sobrenadante puede vertirse a otro tubo o directamente a las cubetas para la medición de la absorbancia.
 - ◆ Ajuste el espectrofotometro a cero con agua desionizada o vi destilada como blanco.
 - ◆ Lea y anote los valores de absorbancia del estándar, muestras, controles, etc., estas lecturas son para glicohemoglobina. Léase a 415 nm.
- b) Hemoglobina Fracción:
- ◆ Dispense 5.0 ml de agua desionizada en tubos rotulados: muestra, estándar, control, etc.
 - ◆ Agregue 20 ul de hemolizado (del paso A3) en el tubo correspondiente. Mezcle.
 - ◆ Ajuste el espectrofotometro a cero con agua desionizada o bidestilada como blanco y 415 nm.
 - ◆ Lea y anote los valores de absorbancia de las muestras, estándar y controles, etc. estas lecturas son para la hemoglobina fracción.

CONTROL DE CALIDAD

Los resultados de la pruebas deben ser monitoreados rutinariamente utilizando material de control de calidad y analizadas de la misma manera que las muestras. Sugerimos el uso de controles para glicohemoglobinas: normal y ambiental entre 21 – 24° C. cuando se realice la prueba fuera de este rango de temperatura los resultados pueden corregirse con un factor. La reacción final para glicohemoglobina y hemoglobina total son muy estables. Sin embargo las muestras deben leerse dentro de una hora que la evaporación no resulte significativa.

CALCULOS

Los resultados de las muestras y controles se calculan como sigue:

Abs.= Absorbancia.

Abs.de la glicohemoglobina x 10 = % de glicohemoglobina
Abs. de la hemoglobina total

10= factor de dilución.

Ejemplo: una muestra desconocida tiene una absorbancia de 0.662 para glicohemoglobina y una absorbancia para hemoglobina total de 0.737 la concentración de glicohemoglobina de la muestra será:

$$0.662 \times 10 = 9.0\% \\ 0.737$$

Nota: cuando se utilice un estándar o cuando el examen se realice fuera del rango de temperatura planteado (ver sección “Control de entidad”) los resultados pueden corregirse multiplicándolos por un factor (F).

$$F = \frac{\text{Conc. del estándar} \times \text{Abs del estándar de Hemoglobina total}}{\text{Abs del estándar de glicohemoglobina}}$$

Ejemplo: La concentración del estándar es 8%. La absorbancia de la hemoglobina total es 0.590 y la de la glicohemoglobina es 0.484. el factor será:

$$F = \frac{8 \times 0.590}{10 \times 0.484} = 0.975$$

Resultado correlacionado: 9.0% x 0.975 = 8.8%

LIMITES DEL PROCEDIMIENTO

Muestras de pacientes con hemoglobinopatías o tiempo de supervivencia leucocitaria disminuida pueden dar resultados incorrectos. Vea la sección recolección de muestras.

VALORES ESPERADOS

Entre 6.5 – 8.6%

CARACTERISTICAS DE LA INVESTIGACIÓN

LINEARIDAD:

La prueba de glicohemoglobina muestra una linealidad para niveles de glicohemoglobina en el rango de 4.0 a 20.0 %. Muestras de sangre con hemoglobina total mayor de 18 g/dl. deben diluirse x 2 con agua desionizada antes de realizar el examen.

PRECISIÓN:

Dentro de la corrida (repetibilidad): la precisión interna de la prueba se estableció examinando sangres con niveles normales y elevados de glicohemoglobina 20 veces cada una.

Nivel	Valor	D.S.
C.V.%		
Normal	7.8	0.21
2.7		
Elevado	13.4	0.23
1.7		

De corrida a corrida (reproductibilidad): la precisión establecida examinando muestras de sangre con valores normales y elevados de glicohemoglobina 10 veces en un periodo de 5 días.

Nivel	Valor	D.S.
C.V.%		
Normal	7.6	0.31
4.1		
Elevado	13.0	0.60
4.6		

ESPECIFICIDAD

Un estudio comparativo de este procedimiento para glicohemoglobinay otro procedimiento comercial ampliamente utilizado mostró una correlación de 0.96

SENSIBILIDAD

Este procedimiento para glicohemoglobina tiene una sensibilidad de 0.02% de glicohemoglobina por 0.001 unidades de absorbancia.