

# HbA1c FS\*

## Reactivo para la determinación cuantitativa *In Vitro* de la hemoglobina A1c (HbA1c) en sangre entera en equipos fotométricos

### Información de pedido

N° de pedido	Tamaño del envase
1 3348 99 10 930	R1 3 x 18 mL + R2 3 x 6 mL
1 4590 99 10 113	1 x 500 mL HbA1c net solución hemolizante
1 3350 99 10 044	2 x 0.3 mL TruCal HbA1c net

### Resumen [1,2,3,11,14]

La hemoglobina A1c (HbA1c) es una hemoglobina glicada que se forma a partir de una reacción no enzimática de glucosa con hemoglobina nativa. Este proceso se produce constantemente mientras que se encuentre un eritrocito en la circulación sanguínea (la vida media de los eritrocitos es de 100 a 120 días). El grado de glicación es directamente proporcional a la concentración de glucosa en sangre. La proporción de HbA1c en la hemoglobina total integra el nivel medio de glucosa en sangre de los últimos 3 meses aproximadamente. Por este motivo, la HbA1c sirve como parámetro de glucemia a largo plazo para el seguimiento retrospectivo en casos de diabetes mellitus. Los estudios clínicos han demostrado que un ajuste adecuado del valor HbA1c puede impedir o retrasar las consecuencias diabéticas a largo plazo. El test de la HbA1c sirve igualmente para diagnosticar la diabetes mellitus. Debido a que la cantidad de HbA1c también depende de la cantidad total de hemoglobina, se indica la parte de HbA1c en la hemoglobina total.

### Método

Hemoglobina:	Test fotométrico
HbA1c:	Método enzimático y colorimétrico

### Principio

Las concentraciones de la HbA1c y de la hemoglobina se determinan por separado. El cálculo de la parte de HbA1c en la hemoglobina total se efectúa exclusivamente a base de las concentraciones de la HbA1c y de la hemoglobina.

#### Medición de la hemoglobina

Especímenes de sangre entera son hemolizados mediante la solución hemolizante. La hemoglobina es liberada de los eritrocitos. La absorbancia de hemoglobina es medida a 570 nm después de añadir el reactivo R2 y es proporcional a la concentración total de hemoglobina en el espécimen.

#### Medición de la HbA1c [16]

Después de añadir el reactivo 2, dipéptidos fructosilados del parte N-terminal de la beta cadena de la hemoglobina se liberan por proteasas. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) es liberado después de la separación oxidativa de los dipéptidos fructosilados por FPOX (fructosil péptido oxidasa). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado se determina por análisis colorimétrico mediante una reacción con un cromógeno y la enzima peroxidasa a 660 nm. El aumento de la absorbancia es proporcional a la concentración de la HbA1c.

### Estandarización

El test ha sido estandarizado a partir de los métodos de referencia aprobados IFCC [4] y DCCT/NGSP [7]. Es posible calcular los valores de control y los de pacientes según IFCC [mmol/mol] así como según DCCT/NGSP [%].

Los valores NGSP muestran una relación lineal a los del IFCC. Por lo tanto se pueden calcular mediante la siguiente fórmula:

$$\text{HbA1c (IFCC}^{\text{b}}) = (\text{HbA1c (NGSP}^{\text{a}}) - 2,15) / 0,0915$$
$$\text{HbA1c (NGSP}^{\text{a}}) = 0,0915 \times \text{HbA1c (IFCC}^{\text{b}}) + 2,15$$

a: Valores NGSP en %

b: Valores IFCC en mmol/mol

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry [4,5,10]

DCCT: Diabetes Control and Complications Trial [6]

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program [7]

### Concentraciones de HbA1c y de Glucosa Media [11]

Debido a la correlación lineal existente entre la hemoglobina A1c y las concentraciones medias de glucosa, los valores de HbA1c se pueden convertir en valores medios estimados de glucosa mediante las ecuaciones siguientes:

Normalización según IFCC (calculada conforme a la referencia bibliográfica [11]):

$$\text{Concentración media de glucosa [mg/dL]} = 2,63 \times \text{HbA1c}^{\text{b}} + 15,01$$

$$\text{Concentración media de glucosa [mmol/L]} = 0,146 \times \text{HbA1c}^{\text{b}} + 0,829$$

b: Valores HbA1c en mmol/mol IFCC

Normalización según NGSP:

$$\text{Concentración media de glucosa [mg/dL]} = 28,7 \times \text{HbA1c}^{\text{a}} - 46,7$$

$$\text{Concentración media de glucosa [mmol/L]} = 1,59 \times \text{HbA1c}^{\text{a}} - 2,59$$

a: Valores HbA1c en % NGSP

No se observan diferencias significativas en la ecuación de regresión para las variables existentes en la población estudiada (sexo, presencia o ausencia de diabetes, tipo de diabetes, edad, raza u origen étnico). Aunque esta ecuación puede emplearse en la mayoría de individuos, cada laboratorio tiene que verificar que la ecuación de regresión es válida para su grupo de pacientes.

### Reactivos

#### Componentes y concentraciones

<b>R1:</b>	Solución amortiguadora	100 mmol/L
	FPOX	≥ 0,5 kU/L
	Derivado de etileno glicol	< 10 %
<b>R2:</b>	Solución amortiguadora	20 mmol/L
	Proteasa	≥ 500 kU/L
	Colorante	≥ 0.05 mmol/L
	Derivado de etileno glicol	< 10 %

#### Conservación y estabilidad de los reactivos

A una temperatura de 2 a 8 °C, los reactivos se conservan hasta el final del mes de caducidad indicado en el envase siempre que se evite la contaminación y la evaporación. ¡No congelar los reactivos y protegerlos de la luz!

#### Preparación de los reactivos

Los reactivos son listos para usar.

Dejar llegar la solución hemolizante HbA1c net a temperatura ambiente y homogeneizarla antes de su uso por invertir varias veces. Debido a la composición de la solución hemolizante, una turbiedad ligeramente opalescente permanece. ¡Evitar la formación de espuma! ¡No agitar!

#### Advertencias y medidas de precaución

- Los reactivos contienen material de origen biológico. Tratar el producto como potencialmente infeccioso según las precauciones universales y la buena práctica de laboratorio.
- Los valores de la hemoglobina y de la hemoglobina A1c en g/dL determinados con DiaSys HbA1c net FS se utilizan exclusivamente para el cálculo de la cuota de la hemoglobina A1c en la hemoglobina total. ¡No utilizar los resultados individuales de la hemoglobina y de la HbA1c por objetivos diagnósticos!
- En enfermedades relacionadas con una vida media reducida de los eritrocitos (determinadas enfermedades hematológicas) o por pérdidas de sangre considerables durante las semanas anteriores (proporción mayor de eritrocitos jóvenes), se pueden presentar valores bajos falsos (HbA1c baja a pesar de un porcentaje alto de glucosa en sangre). Se han observado valores altos falsos (HbA1c alta a pesar del porcentaje normal de glucosa en sangre) en anemias por déficit de hierro (mayor proporción de eritrocitos viejos). Este tipo de enfermedades debe tenerse en cuenta en la interpretación clínica de los valores de HbA1c. ¡Cuidado igualmente con la interpretación clínica de valores de la HbA1c en pacientes con variantes de hemoglobina!
- En casos muy raros, especímenes de pacientes sufriendo de gammapatías podrían acabar en valores falsificados [15].
- La N-acetilcisteína (NAC), el acetaminofén y la medicación del metazolol conducen a resultados falsamente bajos en muestras de pacientes.
- Consultar las fichas de seguridad de los reactivos y observar todas las medidas de precaución necesarias para la manipulación de reactivos de laboratorio. Para un correcto diagnóstico, se recomienda evaluar los resultados según la historia médica del paciente, los exámenes clínicos así como los resultados obtenidos con otros parámetros.
- ¡Únicamente para el empleo profesional!

#### Eliminación de residuos

Obsérvese la normativa legal al respecto.

#### Equipo adicional necesario

Equipo usual de laboratorio

### Tipo de muestra

Sangre entera EDTA

Extraer la sangre total por toma de sangre estandarizada y llenar el tubo de recogida conforme a las especificaciones del fabricante.

#### Estabilidad de las muestras [8]

Sangre entera	1 semana	de	2 a 8 °C
Hemolizante	1 hora	de	15 a 25 °C

Desechar las muestras contaminadas.

## Preparación de muestras

Para la preparación de muestras se requiere la solución hemolizante DiaSys HbA1c net. Hemolizar los calibradores, los controles así como las muestras antes de utilizarlos. Usar los materiales hemolizados dentro de una hora después de su preparación. Se recomienda el procesamiento en modo batch. En caso de una hemolización manual, remitirse al esquema de pipetear abajo:

	Preparación			
	Calibrador Nivel 1	Calibrador Nivel 2	Control	Muestra
TruCal HbA1c net Nivel 1	16 µL	-	-	-
TruCal HbA1c net Nivel 2	-	50 µL	-	-
TruLab HbA1c net Nivel 1 e 2 / Muestra	-	-	50 µL	50 µL
Añadir				
HbA1c net Solución hemolizante	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Mezclar y dejar reposar por 1 minuto. La hemolisis está completa al cabo de 1 minuto. Dado la composición de la solución hemolizante, una turbiedad ligera perdurará.				

## Esquema de la prueba

Hay disponibles, a petición, aplicaciones para sistemas automáticos. Sírvase acudir a su proveedor.

Parámetros de base en Hitachi 917 con aplicación TWIN y hemolisis manual del calibrador, del control y de la muestra

### Determinación de la hemoglobina

Longitud de onda (Principal/Secundaria)	570/800 nm (bicromático)
Temperatura	37 °C
Método de medida	TWIN test/determinación punto 3
Muestra/calibrador	30 µL
Reactivo 1	180 µL
Reactivo 2	60 µL
Adición del reactivo 2	ciclo 15
Extinción	ciclo 15
Calibración	lineal

### Determinación del HbA1c

Longitud de onda (Principal/Secundaria)	660/800 nm (bicromático)
Temperatura	37 °C
Método de medida	TWIN test/determinación punto 3
Muestra/Calibrador	30 µL
Reactivo 1	180 µL
Reactivo 2	60 µL
Adición del reactivo 2	ciclo 15
Extinción 1	ciclo 18
Extinción 2	ciclo 34
Calibración	lineal

## Calibración

Las concentraciones del HbA1c y de la hemoglobina en muestras desconocidas se deducen de las curvas de calibración lineales. Cada curva de calibración se obtiene por medio de dos calibradores a diferentes niveles sin valor cero.

Estabilidad de la calibración: 6 semanas

## Cálculo

Después de introducir la fórmula de calculación, el analizador calcula automáticamente la cuota del HbA1c en la hemoglobina total. ¡Consultar el manual de uso!

Introducir una de las formulas siguientes, según la estandarización seleccionada:

### IFCC

Valores en mmol/mol según IFCC:

$$\text{HbA1c [mmol/mol]} = \left( \frac{\text{HbA1c [g/dL]}}{\text{Hb [g/dL]}} \right) \times 1000$$

### DCCT/NGSP

Valores en porcentaje según DCCT/NGSP:

$$\text{HbA1c [%]} = \left( 9,15 \times \frac{\text{HbA1c [g/dL]}}{\text{Hb [g/dL]}} \right) + 2,15$$

## Calibradores y controles

Se recomienda utilizar el calibrador DiaSys TruCal HbA1c net para la calibración. Para el control de calidad interno deben ensayarse los controles DiaSys TruLab HbA1c net nivel 1 e 2. Cada laboratorio debería establecer medidas correctoras en caso de obtener valores fuera del intervalo preestablecido.

	Nº de pedido	Tamaño del envase
TruLab HbA1c net nivel 1	5 9930 99 10 076	6 x 1 mL
TruLab HbA1c net nivel 2	5 9940 99 10 076	6 x 1 mL

## Características

### Rango de medida

El test tiene un rango de medida de 20 a 150 mmol/mol de la HbA1c según IFCC (4 – 16 % según DCCT/NGSP).

El test está indicado para una concentración total de la hemoglobina de 6 a 30 g/dL (3,73 – 18,6 mmol/L).

### Especificidad/Interferencias

Una estudio sobre interferencias fue realizada según el protocolo EP7-A2 CSLI.

### IFCC

Para cada sustancia interferente, tres muestras con valores diferentes de la hemoglobina y de la HbA1c fueron determinados; una muestra de un nivel bajo dentro de un intervalo de la hemoglobina de 8 a 10 g/dL y de un intervalo de la HbA1c de 28 a 35 mmol/mol; una muestra de nivel medio dentro de un intervalo de la hemoglobina de 11 a 15 g/dL y de la HbA1c de 28 a 35 mmol/mol; una muestra de nivel elevado dentro de un intervalo de la hemoglobina de 11 a 15 g/dL y un intervalo de la HbA1c de > 60 mmol/mol.

### DCCT/NGSP

Para cada sustancia interferente, tres muestras con valores diferentes de la hemoglobina y de la HbA1c fueron determinados; una muestra de un nivel bajo dentro de un intervalo de 9 a 10 g/dL y un intervalo de la HbA1c entre 4,7 y 5,4 %; una muestra de nivel medio dentro de un intervalo de la hemoglobina de 10 a 15 g/dL y un intervalo de la HbA1c de 4,7 a 5,4 %; una muestra de nivel elevado dentro de un intervalo de la hemoglobina de 10 a 15 g/dL y un intervalo de la HbA1c de > 7,65 %.

La tabla abajo resume los resultados cumpliendo con todos los niveles de test y son aplicables tanto para la estandarización IFCC como para DCCT/NGSP.

Sustancia interferente	Interferencias < 10 % en suero con corrección del hematocrito
Acido ascórbico	hasta 50 mg/dL
Bilirrubina (conjugada y no conjugada)	hasta 10 mg/dL
Glucosa	hasta 1000 mg/dL
Hemoglobina, acetilada	hasta 10 mmol/L
Hemoglobina, carbamilada	hasta 10 mmol/L
Lipemia (triglicéridos) at < 11 g/dL de la hemoglobina	hasta 400 mg/dL
Lipemia (triglicéridos) a > 11 g/dL de la hemoglobina	hasta 750 mg/dL
NAC (acetilcisteína)	hasta 2000 mg/dL
Urea	hasta 300 mg/dL
Ácido úrico	hasta 20 mg/dL
El alcoholismo y la ingestión de una dosis elevada de Aspirina pueden falsear resultados. Para más información sobre interferencias, véase Young DS [13].	

Las variantes de la hemoglobina podrían provocar resultados erróneos de la HbA1c. Las variantes de la hemoglobina testados (HbS, HbC, HbD, HbE, HbJ, HbG, HbSC, HbSE, HbEE y HbF) no presentan interferencias significativas.

Variante de la hemoglobina	Variante de la hemoglobina en por ciento ( $\leq$ )	Rango del valor de ensayo HbA1c [% DCCT/NGSP]	Valor medio de la exactitud de la HbA1c [%]
AS	40 % S	5,2 – 8,8	94,7
AC	36 % C	5,0 – 7,4	97,1
AD	41 % D	5,6 – 7,0	93,9
AE	26 % E	5,9 – 7,6	99,1
AJ	50 % J	5,2 – 8,4	100
AG	20 % G	6,1 – 6,6	97,4
SC	52 % S, 44 % C	4,5 – 7,0	91,6
SE	65 % S, 27 % E	7,4	95,4
EE	94 % E	5,1 – 8,9	98,0
F elevado	4,6 % F	6,5 – 8,1	93,6

#### Límite de detección del test/Límite de prueba

HbA1c: 0,2 g/dL

Hemoglobina: 1,5 g/dL

#### Imprecisión

Valores según IFCC (Hitachi 917)

En la serie n = 20	Valor medio [mmol/mol]	Desviación estándar [mmol/mol]	Coefficiente de variación (CV) [%]
Muestra 1	29,5	0,556	1,88
Muestra 2	32,9	0,197	0,60
Muestra 3	63,5	0,447	0,70

Precisión total CLSI n = 80	Valor medio [mmol/mol]	Desviación estándar [mmol/mol]	Coefficiente de variación (CV) [%]
Muestra 1	26,0	1,01	3,88
Muestra 2	32,5	1,23	3,78
Muestra 3	66,2	1,23	1,86

#### Comparación de métodos

En la comparación de DiaSys HbA1c net FS (y) con otro test inmunoturbidimétrico (x) se obtuvieron los siguientes resultados (IFCC) para 60 muestras:

$$y = 1,047 x - 0,782 \text{ mmol/mol}; r = 0,982$$

En la comparación de DiaSys HbA1c net FS (y) con un test HPLC (x) se obtuvieron los siguientes resultados (IFCC) para 100 muestras:

$$y = 1,031 x - 0,441 \text{ mmol/mol}; r = 0,989$$

#### Valores de referencia

##### Valores de referencia recomendados para HbA1c [9]:

	IFCC [mmol/mol]	NGSP [%]
Pacientes no diabéticos	20 – 42	4 – 6
Objetivo de la terapia	< 53	< 7
Modificación de la terapia	> 64	> 8

Cada laboratorio debe comprobar si los valores de referencia indicados son adecuados para sus pacientes y si es necesario, determinar sus propios valores de referencia.

##### Valor límite de la HbA1c para el diagnóstico de la diabetes mellitus [14]:



Según la recomendación de la Asociación Americana de la Diabetes (American Diabetes Association/ADA):  
 $\geq 6,5 \%$  (NGSP) (48 mmol/mol (IFCC))

Pacientes mostrando valores de HbA1c en el rango de 5,7 – 6,4 % (NGSP) o de 39 a 46 mmol/mol HbA1c (IFCC) corren el riesgo de desarrollar la diabetes.

#### Bibliografía

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 142-48.
2. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1999. p. 790-6.
3. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th edition St. Louis Missouri: Elsevier Saunders; 2006; p. 878-884.
4. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 78-89.
5. Hoelzel W, Weykamp C et al. IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in Human Blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method-Comparison Study. Clin Chem 2004; 50 (1): 166-74.
6. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes in the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med. 1993; 329: 977-86.
7. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL et al. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A Five-Years Progress Report. Clin Chem 2001; 47: 1985-92.
8. Data on file at DiaSys Diagnostic Systems GmbH.
9. Pantheghini M, John WG on behalf of the IFCC Scientific Division. Implementation of haemoglobin A1c results traceable to the IFCC reference system: the way forward. Clin Chem Lab Med 2007; 45(8): 942-4.
10. Nordin G., Dybkær R. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c". Clin Chem Lab Med 2007; 45(8): 1081-2.
11. Sacks DB. Translating Hemoglobin A1c into Average Blood Glucose: Implications for Clinical Chemistry. Clinical Chemistry 2008; 54: 1756-8.
12. Weykamp C. Carbamylated Hemoglobin Interference in Glycohemoglobin Assays. Clin Chem 1999; 45: 438-9.
13. Young DS. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 5th ed. Volume 1 and 2. Washington, DC: The American Association for Clinical Chemistry Press 2000.
14. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, AR Horvath et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2011; 57(6): e1-e47.
15. Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. ClinChemLabMed 2007; 45(9): 1240-1243.
16. Ferri S, Kim S, Tsugawa W, Sode K. Review of Fructosyl Amino Acid Oxidase Engineering Research: A Glimpse into the Future of Hemoglobin A1c Biosensing. Journal of Diabetes Science and Technology 2009; 3(3): 585-592.

#### Fabricado por

  DiaSys Diagnostic Systems GmbH  
 Alte Strasse 9 65558 Holzheim Alemania