

Diagnóstico Bioquímico

Hemoglobina Glicosilada por HPLC

Dr. Gabriel Agratti
Jefe División Química Clínica y Endocrinología
Laboratorio de Análisis Clínicos Dr. Stamboulían
gagratti@cei.com.ar

La diabetes mellitus constituye un grupo de trastornos caracterizado por niveles elevados de glucosa en sangre debido a una deficiente secreción de insulina y/o a un funcionamiento anormal de la hormona, siendo la enfermedad más común del grupo de patologías relacionadas con el metabolismo de los hidratos de carbono.

La hemoglobina glicosilada es una heteroproteína de la sangre que resulta de la unión de la hemoglobina con carbohidratos libres unidos a cadenas carbonadas con

funciones ácidas en el carbono 3 y 4.

La prueba de la hemoglobina glicosilada brinda información acerca de la media de los niveles de glucosa plasmáticos durante los dos o tres meses anteriores a su realización.

La mejora en el control de la glucemia se ha asociado con la prevención o retraso en la progresión de complicaciones microvasculares en la diabetes: el DCCT (Diabetes Control and Complications Trial Research Group) ha demostrado que el mantenimiento de valores bajos de glucosa en pacientes con diabetes tipo I, disminuye o previene el desarrollo de retinopatías, neuropatías y nefropatías según el siguiente detalle:

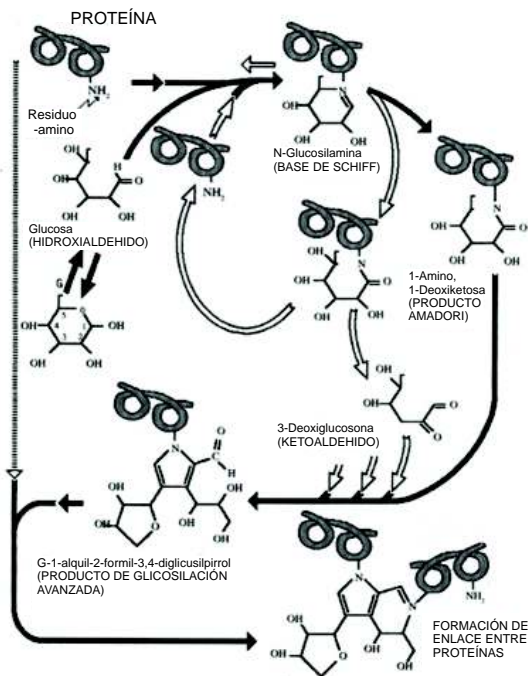


Resultados reportados del DCCT (1993)

- Retinopatía del 34% al 76%
- Microalbuminuria en 35%
- Albuminuria Clínica en 56%
- Neuropatía Clínica en 60%

La hemoglobina glicosilada (HBA1C) se forma de modo no enzimático mediante una reacción de dos pasos: la primera, es rápida y produce una aldimina lábil o base de Schiff; a continuación, la aldimina experimenta lentamente una reorganización de Amadori y se convierte en una cetoamina mas estable, dando lugar a la hemoglobina glicosilada. La mayoría de pruebas de HBA1C miden la cetoamina estable y no el producto más lábil, que es más propenso a estar influenciado por la dieta ingerida recientemente.(Fig. 1).

Figura 1: Glicosilación de proteínas a consecuencia de la hiperglucemia crónica.



Fuente: Boletín Escuela de Medicina Pontificia.Univ.Católica de Chile (1998;27:52-55)

La vida media de los glóbulos rojos es de unos 120 días aproximadamente, por tanto, los ensayos de HBA1C se correlacionan con el control de la glucemia durante los dos o tres meses anteriores. Por el contrario, el tiempo de renovación de las proteínas séricas, principalmente de la albúmina, es bastante más corto (15-20 días), así su glicosilación refleja un control de la glucemia durante un menor período de tiempo.

Generalmente, los sujetos no diabéticos tienen niveles de HBA1C comprendidos entre el 4-6%. Según datos del DCCT, la correlación entre las HBA1C y los niveles promedio

de glucosa en sangre es la siguiente:

Hemoglobina A1C (%)	Glucosa en sangre (mg/dL)
6	120
7	150
8	180
9	210
10	240
11	270
12	300
13	330
14	360

El Estudio DCCT estableció las metas específicas para el tratamiento de la diabetes utilizando la Hemoglobina Glicosilada como índice de la media de glucosa sanguínea.

En el mismo sentido, la Asociación Americana de Diabetes (ADA) considera como meta principal mantener los niveles de HBA1C en rangos inferiores a 7%, mientras que concentraciones superiores a 8% implican reevaluar el régimen terapéutico (Clinical Chemistry 48, No3, 2002; 452-453).

Con anterioridad, un estudio prospectivo de Diabetes en el Reino Unido (UKPDS) demostró que en un grupo de pacientes tratados exhaustivamente (reducción de HBA1C de un 7,9% a 7%), las complicaciones microvasculares disminuyeron un 25% (UKPDS Group. Lancet 1998; 352:837-53).

Se dispone de numerosos métodos para la determinación de HBA1C:

- Inmunoturbidimetria (inmunológica)
- Cromatografía de Intercambio catiónico
- Concentración isoeléctrica
- Electroforesis
- Colorimetría (ácido tiobarbitúrico)
- HPLC (Cromatografía líquida de alta performance), técnica de referencia para NGSP (Nacional Glycohemoglobin Standadization Program)

Estos ensayos varían en fiabilidad, interferencia mediante compuestos carbamilados y acetilados, y en exactitud por presencia de uremia, salicilatos, hemoglobinopatías, uso crónico de alcohol, deficiencia en hierro, hiperbilirrubinemia, intoxicación por plomo y esplenectomía. Pueden verse afectados también por un almacenamiento prolongado de la muestra. Cualquier situación que suponga una disminución en la supervivencia de los glóbulos rojos, como una hemólisis o una pérdida aguda de sangre, disminuye los niveles de HBA1C.

El NGSP se inició en 1996, con el objetivo de estandarizar las pruebas de HBA1C frente a la Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), método utilizado en DCCT. Para obtener un "certificado de trazabilidad con el método de

referencia del DCCT” se realiza una evaluación de la precisión y una comparación de muestras con estimación del error sistemático. El Collage of American Pathologists (CAP) tiene también un programa de ensayo de aptitud que utiliza sangre total y muestras liofilizadas.

Las recomendaciones preanalíticas publicadas por CAP para el ensayo de HBA1C son:

- muestras obtenidas por punción venosa o capilar,
- utilizar EDTA como anticoagulante de elección
- almacenar no más de una semana a 4°C o 1 año a -

70°C

- procesar muestras de sangre entera.

Existen recomendaciones respecto a la etapa analítica que incluyen utilizar ensayos cuyo Coeficiente de Variación Interensayo (CVi) sea inferior a 5% (idealmente 3%); deberán incluirse al menos dos niveles control con diferentes concentraciones en rangos bajos y altos. Todos los resultados obtenidos que estén por debajo del límite inferior del intervalo de referencia, así como los que superen una concentración de 15% de HBA1C, deberán ser reensayados.

El método utilizado en nuestro laboratorio para medir las concentraciones de HBA1C en muestras de sangre total, utiliza los principios de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la separación y determinación del porcentaje relativo de hemoglobinas normales y anormales.

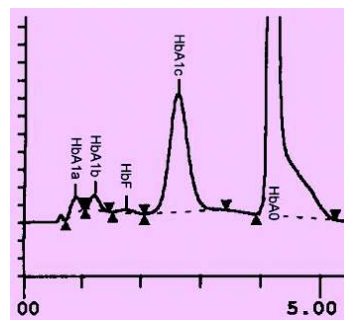
El sistema VARIANT II (BIO-RAD) consta de dos módulos, la estación cromatográfica (VCS) y la estación de muestreo (VSS); está provisto, además, de un ordenador personal en el que se instala el software para la administración de datos clínicos.

Dos bombas de pistón doble situadas en la VCS, suministran una solución tampón al cartucho analítico y al detector. Los tubos de muestra primarios se mezclan en la estación de muestreo, luego se extrae una muestra que se diluye y se introduce en la vía de flujo analítico mediante inyección automática. Entre las distintas inyecciones de muestra, la aguja de muestras se enjuaga con una solución de lavado para reducir el arrastre de la muestra por contacto. La

solución tampón conduce la muestra por el cartucho analítico, donde la divide en sus componentes individuales. A continuación, los componentes separados pasan por el detector de longitud de onda doble, donde se mide la absorbancia de los componentes de la muestra a 415 nm. El ruido de fondo se reduce con la utilización de una longitud de onda secundaria a 690 nm. Los datos de absorbancia se transmiten del detector al software que los muestra en forma de cromatograma en tiempo real (gráfico de tiempo vs. absorbancia).

Los datos procesados se incorporan en un informe impreso que contiene los siguientes elementos:

- I. resumen completo de los componentes detectados en la muestra (identificación del pico, tiempo de retención, porcentaje relativo, área)
- II. cromatograma de la muestra
- III. fecha y hora del análisis
- IV. número de vial e identificación de la muestra



Leverton Ortiz Cáceres (Hospital La Serena, Chile)

Los picos resueltos por esta metodología por orden decreciente en tiempo de retención son: HbAo, HBA1c, HbF, HbA1b, HbA1a.

Los criterios utilizados para la aceptación de una corrida analítica son:

- a) Conteo de Area Total entre 1.000.000 y 4.000.000
- b) Presencia de HBA1C y HBAo (Ao)
- c) Adecuada construcción de la Línea-Base

Soluciones Integrales para Estudios Moleculares en el Laboratorio Clínico

SACACE

- | | | |
|---------------|-------------------|-----------------|
| • CMV | • Gripe Aviar | • Shigella |
| • HSV | • RSV | • Campylobacter |
| • EBV | • Influenza A y B | • Listeria |
| • HH-6 | • Chlamydia | • Mycobacteria |
| • HPV | • Ureaplasma | • Clostridium |
| • Rotavirus | • Mycoplasma | • Neisseria |
| • Enterovirus | • Helicobacter | • Borrelia |
| • Adenovirus | • Brucella | • Yersinia |
| • SARS | • Salmonella | • Toxoplasma |

BIOCIENTIFICA presenta a SACACE, compañía italiana de biotecnología, líder en estudios moleculares para enfermedades infecciosas por PCR y Real Time PCR.

Los kits de SACACE le aseguran

- Facilidad de uso
- Reproducibilidad intra e interlaboratorio

Asesoramiento y capacitación por personal especializado.
Instalación llave en mano de laboratorios para estudios moleculares.

DISTRIBUIDOR EXCLUSIVO

ELABORADOR

Biocientifica
Calidad en Reactivos. Excepción en Biotecnología
Iturrí 232 / C1427ADD / Buenos Aires, Argentina
Tel.: (+54 11) 4857.5005 / Fax: (+54 11) 4857.1004
ventas@biocientifica.com.ar
www.biocientifica.com.ar

Sacace
BIOTECHNOLOGIES
Sacace S.R.L. Caserta, Italia
18 San Carlo, str. Caserta #1100.
Tel.: +39 0823.355731 / 357742
info@sacace.com / www.sacace.com

- d) Sin picos desconocidos antes de Ao
- e) El pico de LA1C (calibrador de menor concentración) menor al 4.8%
- f) Tiempo de retención de A1C (Aprox. 0.91), tiempo de retención de Ao (Aprox. 1.83)
- g) A1C dentro de la linealidad establecida
- h) HB F (hemoglobina fetal) si está presente, menor al 30%

El sistema utiliza una calibración de 2 puntos.

Cuenta con la ventaja de que no interfiere ningún otro tipo de hemoglobina (F,S,C,D,E) ni los procesos de carbamiliación.

El Laboratorio Stamboulían participa anualmente del "Nacional Glycohemoglobin Standardization Program" (NGSP), el cual consiste en una evaluación de la precisión y el Bias del laboratorio, según los requisitos de dicho organismo.

Nuestro laboratorio ha sido certificado en diciembre del 2007, de acuerdo al criterio de aceptación establecido para Laboratorios Nivel II, el cual establece que la diferencia entre los métodos de referencia y el método en estudio, no debe ser mayor a +/- 1,0% de HBA1C; así mismo, el porcentaje de imprecisión no debe superar el 4%.



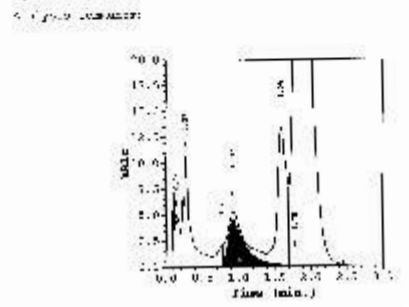
La incorporación de esta tecnología apunta no solo a trabajar bajo estrictos estándares de calidad internacional, sino también a dotar al cuerpo médico de una herramienta confiable para el seguimiento y terapéutica del paciente diabético.

Bio-Rad CDM System **PATIENT REPORT**
Bio-Rad Variant II Training # 10031 **V2_A1c**

Subject Data		Analysis Data	
Sample ID:	T020001	Analysis Released:	04/02/2008 09:40:00
Date:		Analyst Name:	MS
Shift:		Run Name:	17
Lab:		Lab ID:	0206
Site:		Work Number:	5
LOG:		Report File Path:	C:\Program Files\Bio-Rad\CDM\
Comments:		Lab Name:	

Test Name	Calibrator	Area	Retention Time (min)	Peak Area
A1c	5.4	1.7	1.14	84831
A1c	5.4	3.7	0.27	35262
A1c	5.4	1.4	0.79	35002
A1c	5.4	0.35	0.35	82341
A1c	5.4	0.4	1.35	14320
A1c	5.4	0.4	1.75	718946
Total Area:				250319

A1c Concentration = 5.4 %



Línea de Productos

www.rsrltd.com

Autoinmunidad Adrenal
21-OH RIA kit (50 or 100 tubes)

Diabetes . Autoinmunidad
GADAb ELISA Kit (96 wells)
IA-2Ab ELISA Kit (96 wells)
2 Screen ICA ELISA Kit (96 wells)
GADAb RIA Kit (50 or 100 tubes)
IA-2Ab RIA Kit (50 or 100 tubes)
IAA RIA Kit (50 or 100 tubes)

Autoinmunidad Neuromuscular
AChRAb RIA Kit (25, 50 or 100 tubes)
LEMS RIA Kit (12 or 25 tube kits)

Autoinmunidad Tiroidea

TRAb Coated Tube RIA Kit (60 or 100 tubes)
TRAb RIA Kit (50 or 100 tubes)
TRAb ELISA Kit (96 wells)
TgAb Coated Tube RIA Kit (50 or 100 tubes)
TgAb Direct RIA Kit (50 or 100 tubes)
TgAb ELISA Kit (96 wells)
TPOAb Coated Tube RIA Kit (50 or 100 tubes)
TPOAb Direct RIA Kit (50 or 100 tubes)
TPOAb ELISA Kit (96 wells)

Cancer Tiroideo

Tg IRMA Kit (50 or 100 tubes)
Tg ELISA Kit (96 wells)

La forma más segura de controlar el tratamiento anticoagulante oral

Algunas indicaciones médicas como la cirugía de implantación de una válvula cardíaca mecánica, la fibrilación auricular o las enfermedades tromboembólicas requieren un tratamiento anticoagulante prolongado con antagonistas de la Vitamina K. Sin embargo, la prescripción de un tratamiento anticoagulante oral a veces genera dudas, al temer que los pacientes lo incumplan o sean incapaces de seguirlo correctamente.

Mantener al paciente dentro de unos márgenes terapéuticos óptimos es el objetivo principal de todo tratamiento anticoagulante oral. La fiebre, el alcohol, algunos medicamentos, como los analgésicos o los antibióticos, e incluso una dieta rica en Vitamina K, pueden interferir en el tratamiento de anticoagulación oral. Por tanto, es necesario un estrecho control de la coagulación, porque cada paciente reacciona de manera diferente al tratamiento anticoagulante oral.

La determinación del INR con **CoaguChek® XS Plus** le permitirá medir el valor de INR en tan sólo un minuto, con una pequeña gota de sangre de la yema del dedo para así poder ajustar inmediatamente el tratamiento de su paciente de forma cómoda y segura.



CoaguChek® XS Plus le ofrece...

...Mayor seguridad



Elementos de seguridad:

- Control integrado de un solo canal en la tira reactiva (OS2C) para garantizar la validez de la medición.
- Código de barras incluido en la tira reactiva para identificación del lote de la misma.
- Posibilidad de configurar bloqueos automáticos en función de los resultados de control de calidad con frecuencia definida por el usuario.

Reactivo de PT de última generación:

- Nueva tecnología de medición electroquímica.
- Reactivo a base de factor tisular recombinante humano (ISI=1,0).
- Conforme con las recomendaciones de la OMS.

Funciones integradas de gestión de datos:

- Descarga, sincronización y carga de todos los datos revelantes.
- Capacidad para almacenar hasta 500 resultados de pacientes.
- Identificación de datos de usuarios y pacientes.

Resultados de calidad comparables a los obtenidos en el laboratorio:

- Los resultados concuerdan con los del laboratorio¹.
- Disponibles controles de calidad de 1 nivel.