



## Bases bioquímicas de los métodos para hemoglobina glicosilada

 7 min.



Existen diferentes métodos para determinar hemoglobina glicosilada, en esta nota la Lic. Irene Aranda de BG ANALIZADORES S.A. describe cada uno de ellos, su utilización y eficiencia destacando un método enzimático llamado DIAZYME que posee mayor precisión y exactitud, además es más simple, más rápido y tiene gran correlación con los métodos de referencia



Lic. Irene Aranda  
BG ANALIZADORES S.A.



E-mail:  
irenearanda@bganalizadores.com.ar



Los valores de Hb Glicosilada son utilizados para evaluar por largos períodos la glucosa en el control de la diabetes, especialmente en diabéticos insulino-dependientes, pues los niveles de glucosa en sangre y en orina poseen una variación diaria significativa.

La hemoglobina está compuesta por varias fracciones. La Hb1 es la fracción de hemoglobina glicosilada total o general, la Hb0 la no glicosilada y la HbA1c es la glicosilada particular. Existen varias técnicas utilizadas para medir la fracción de la hemoglobina y los diferentes métodos

analíticos detectan diversas fracciones de está.

En una electroforesis ó en resinas de intercambio iónico, la hemoglobina glicosilada (Hb1) migra más rápido que la hemoglobina no glicosilada (Hb0), permitiendo así separar las dos fracciones de la hemoglobina.

### Cromatografía de columna

Se ha ubicado como una prueba "obsoleta" ya que presenta problemas de calibración, baja reproducibilidad y en medición de la HbA1c. Además es dependiente del pH y la temperatura a la cual se realiza la prueba. Al principio se utilizaba este método por ser una prueba de fácil acceso, pero hoy en día solo la utilizan laboratorios clínicos de bajo volumen de muestras.

### Cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC

Utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.

Consiste en hacer pasar a la hemoglobina glicosilada por la columna cromatográfica (de vidrio) a través de la fase estacionaria, mediante el bombeo de líquido a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. Su objetivo es aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de

las partículas de la fase fija va disminuyendo hasta llegar al tamaño de un micrón, generando por ende la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.

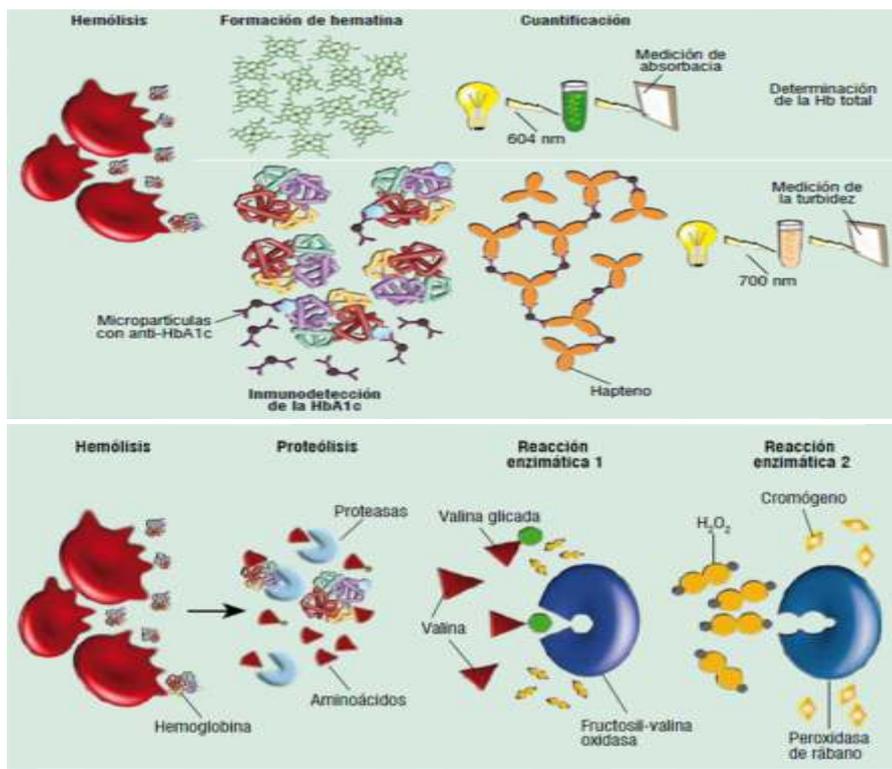
Si bien es un método de referencia, es técnicamente complejo, consume más tiempo y es de mayor costo, por lo que no se usa como rutina en la práctica clínica.

### Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos utilizan anticuerpos contra una secuencia de aminoácidos que varían de 3 a 8 de la fracción N-terminal de la hemoglobina glicosilada. Tienen como ventaja el que son específicos contra la HbA1c y pueden ser incorporados a los autoanalizadores de química clínica ya sea por métodos de inmunoturbidimetría, como se esquematiza.

En la determinación por esta técnica se cuantifican tanto la hemoglobina total como la HbA1c. Para la cuantificación de la hemoglobina total se hemoliza la muestra y la solución se somete a un búfer alcalino de un detergente no iónico, convirtiendo la hemoglobina en hematina y estabilizando la molécula. La hematina torna la solución de un color verde, que es cuantificado a una longitud de onda de 604 nanómetros (nm). Para la cuantificación de la HbA1c igualmente se debe hemolizar la muestra y se procede con dos pasos elementales:

- 1) la solución es incubada con micropartículas cubiertas con anticuerpos específicos dirigidos contra la HbA1c; en esta reacción se une un solo anticuerpo a cada sitio de glicosilación presente en la hemoglobina.
- 2) Una vez terminado este paso, se intro-



duce en la solución un hapteno aglutinante que posee varios sitios inmunoreactivos que unirá las micropartículas con anticuerpos que han quedado libres. En este paso se pueden unir varios anticuerpos a una sola molécula de haptenos y darse el fenómeno de aglutinación. La determinación requiere de la cuantificación de la turbidez de la suspensión a una longitud de onda de 700 nm. En este sentido a mayor aglutinación, mayor cantidad de anticuerpos libres y menor concentración de HbA1c disponible para unir las micropartículas a los anticuerpos, lo anterior como consecuencia de que la HbA1c compite con el hapteno por la unión del anticuerpo.

Otro método es el de inmunoanálisis enzimático en donde se utiliza una proteasa para digerir la hemoglobina y producir fructosil-aminoácido que por la acción de una oxidasa produce peróxido de hidrógeno.

El principio de la prueba se puede resumir en cuatro pasos básicos:

1) Hemólisis: se emplea una solución que

## OPTI® CCA-TS OPTI® CCA

Analizadores de gases en sangre portátiles



### OPTI® CCA-TS

- Autocalibración.
- Mínimo mantenimiento.
- Aspiración automática de la muestra.
- Pantalla sensible al tacto.
- Cassette de un solo uso.
- Mayor perfil de medición.
- tHb y Sat O<sub>2</sub> medidas.



## OPTIMedical



### OPTI® CCA

- Autocalibración.
- Mínimo mantenimiento.
- Aspiración automática de la muestra.
- Cassette de un solo uso.
- Amplio perfil de medición.
- tHb y Sat O<sub>2</sub> medidas.

## OPTI® R

Analizador de gases en sangre de mesada



### OPTI® R

- Autocalibración.
- Mínimo mantenimiento.
- Aspiración automática de la muestra.
- Cassette reutilizable.
- Amplio perfil de medición.
- tHb y Sat O<sub>2</sub> medidas.
- Auto QC.

Ideal para laboratorios, quirófanos, UTI, perfusionistas.



Aráoz 86 | C1414DPB | C.A.B.A. | Argentina | Tel: 54-11 4856-2024/5734/2876 | Fax: 54-11 4856-5652  
bga@bganalizadores.com.ar | www.bganalizadores.com.ar



BG ANALIZADORES S.A.

**BG Analizadores**

permite la lisis de los eritrocitos y la reducción con agentes oxidantes de moléculas interferentes

2) Proteólisis: se somete la muestra a una digestión proteolítica donde las proteínas presentes en la solución, incluida la hemoglobina, liberan aminoácidos y péptidos;

3) Reacción enzimática 1: la valina de la hemoglobina que está glicosilada, es el sustrato de la enzima específica fructosil-valina-oxidasa. En esta reacción se produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )

4) Reacción enzimática 2: empleando la enzima peroxidasa de rábano se promueve la producción a partir del  $H_2O_2$  de un cromógeno. La señal emitida por el cromógeno es cuantificada y es proporcional a la concentración de aminoácidos de valina glicosilados presentes en la muestra. La determinación del porcentaje de HbA1c con esta técnica es directa y requiere de una curva estándar. Esta técnica no requiere la determinación de la concentración de la Hb total.

DIAZYME, una Empresa de EE.UU ha desarrollado este último método enzimático ofreciéndolo en dos presentaciones:

1-Kit completo para su adaptación a autoanalizadores de química clínica.

2-A través de un novedoso instrumento, el SMART 700, un analizador libre de mantenimiento, fácil de usar, con una velocidad de menos de 8 minutos por test y certificado por la NGSP.

Es un instrumento portable, con un peso de apenas 3.4 Kgs, se puede conectar a una pc y transmitir datos a una interface, imprime resultados y guarda hasta 250 determinaciones.

El kit para la determinación de la HbA1c posee todos los elementos necesarios para la ejecución de la prueba, trae una tarjeta con la curva de calibración específica para cada lote, se ofrecen además controles normales y patológicos.

Este método posee mayor precisión y exactitud que la columna de intercambio iónico, es más simple, más rápido y tiene gran correlación con los métodos de referencia.



#### ESPECIFICACIONES DEL TEST:

Ensayo enzimático

Valores expresados por IFCC/NGSP

Precisión: CV < 4% (a 5% HbA1c)

Linealidad<sup>4</sup> – 12% (NGSP/DCCT)

#### ESPECIFICACIONES DEL INSTRUMENTO:

Medidas:

24 x 14.5 x 14 cm

9.4 x 5.7 x 5.5 in

Peso: 3.4 kgs

100 – 240V (50 -60 Hz)

IVD CE

Computadora/Host Interface (RS 232 or USB)

Impresora opcional disponible



  
**BG Analizadores**