



REACTIVOS BIOLABO  
www.biolabo.fr

FABRICANTE:  
BIOLABO SAS,  
Les Hautes Rives  
02160, Maizy, France

# HbA1c ENZYM

## Método Enzimático

Reactivo para la determinación cuantitativa de la HbA1c en sangre humana

REF 22050	R1 1 x 16 mL	R2 1 x 7 mL
	R3 1 x 10 mL	R4 1 x 40 mL

### SOPOIRTE TECNICO Y PEDIDOS

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



IVD USO IN VITRO

### SIGNIFICACION CLINICA (1) (2) (3) (4)

Reactivo para la determinación cuantitativa de la HbA1c en sangre humana. La determinación de la HbA1c se utiliza generalmente para la evaluación del control glicémico de la diabetes mellitus. Los valores de la HbA1c dan una indicación del control de los niveles de glucosa de las 4-8 semanas precedentes. Un valor elevado de la HbA1c indica un control glicémico más pobre. No utilizar para el diagnóstico de la diabetes mellitus.

Las limitaciones del método se conocen: están relacionadas a la modificación de la duración de vida de los glóbulos rojos, hemolisis fisiológica o un nivel insuficiente del total de hemoglobina, lo que puede invalidar el resultado del test.

### PRINCIPIO

La HbA1c ENZYM es un test enzimático en el cual muestras de sangre lisada están sometidas a una digestión global con la proteasa de *Bacillus sp.* Este proceso libera ácidos aminados incluyendo valinas glicadas que provienen de las cadenas beta de la hemoglobina. Las valinas glicadas sirven luego de sustratos para una enzima, la fructosil valina oxidasa (FVO) recombinante específica, producida por *E. coli*. Esta enzima escinde específicamente las partes N-terminales de valinas y producto del peróxido de hidrógeno. Este seguidamente se mide y luego es medido por una reacción catalizada por la peroxidasa (POD) de raifort y un cromógeno apropiado. La medida es directa (no es necesario medir de forma separada la Hemoglobina total).

La concentración de la HbA1c se expresa directamente en % HbA1c por utilización de una curva de calibración apropiada utilizando 2 calibradores con tasas diferentes de HbA1c %.

### REACTIVOS

Vial R1

TAMPON ENZIMAS 1

MES pH 7.0 5 mM  
Proteasas 4 KU/mL  
Triton-X-100 0.5%  
Redox agentes >10mM

Vial R2

TAMPON REDOX

MES pH 6.3 1 mM  
Redox agente <3 mM

Vial R3

TAMPON ENZIMAS 2

Tris pH 8.0 15 mM  
FVO enzima >10 U/mL  
POD 90 U/mL  
Cromogeno 0.8 mM

Vial R4

TAMPON DE LYSA

CHES, pH 8.7 100 mM  
Triton-X-100 1 %  
SDS 0.45 %  
Redox Agentes 0.5 mM

### PRECAUCIONES

- Los reactivos BIOLABO están destinados únicamente a profesionales, para uso in vitro.
  - Utilizar equipamientos de protección (bata, guantes, gafas).
  - No pipetear con la boca.
  - En caso de contacto con la piel o los ojos, enjuagar abundantemente y consultar al médico.
  - Los reactivos contienen azida sódica (concentración < 0,1%) que puede reaccionar con metales como el cobre o el plomo de las tuberías.
  - Enjuagar con abundante agua.
  - La ficha de datos de seguridad puede obtenerse por petición.
  - Eliminación de los desechos: respetar la legislación en vigor.
- Por medida de seguridad, tratar toda muestra como potencialmente infecciosa. Respetar la legislación en vigor.

### PREPARACION DE LOS REACTIVOS

Método con 3 reactivos: Los reactivos líquidos de los viales R1, R2, R3 y R4 están listos para el uso.

Método con 2 reactivos: Preparar un reactivo de trabajo mezclando 7 volúmenes del vial R1 con 3 volúmenes del vial R2 y dejar reposar a 2-8°C una noche antes de utilizar.

Mezclar suavemente por inversión antes de utilizar.

### ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

**Almacenar a 2-8°C, cerrar bien en el vial de origen y protegido de la luz.**

- Antes de abrir, los reactivos R1, R2, R3 y R4 son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja cuando se utiliza y almacena en las condiciones preconizadas.
- Después de reconstitución, el reactivo de trabajo (R1+R2) es estable por lo menos 1 mes libre de contaminación.
- Rechazar todo reactivo si hay turbidez o si la absorbancia a 520 nm > 0.100.
- No utilizar el reactivo de trabajo después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Los reactivos R2 y R3 son sensibles a la luz.

### TOMA Y PREPARACION DE LA MUESTRA (6)

Tomar una muestra fresca de sangre con EDTA utilizando una técnica aséptica. No se necesita una especial preparación del paciente. No se requiere aditivos especiales o conservantes otros que los anticoagulantes.

Preparado hemolizado (paciente(s), calibradores y controles):

- Dispense 250 µL de Buffer disuelto (vial R4) en tubos de ensayo de plástico o de vidrio bien identificado:
- Añadir 20 µL de muestra bien mezclada (calibradores, controles, paciente(s)).
- Mezclar bien.
- Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente hasta su completa disolución.
- Medir el HbA1c (%) (§ MODO DE EMPLEO)

Si el test no se puede llevar a cabo en el mismo día, el hemolizado debe ser almacenado hasta 7 días a 2-8° C.

Para un almacenamiento más largo, congelar la muestra a -70° C un máximo de 30 días.

### REACTIVOS Y MATERIAL COMPLEMENTARIOS

- Equipamiento de base del laboratorio de análisis médico
- REF 22052, HbA1c ENZYM Kit de calibración
- REF 22013, HbA1c Kit de control.



Fabricante Fecha de caducidad Uso in vitro Temperatura de conservación Referencia del producto Consultar instrucciones Numero de lote Protegido de la luz Suficiente para Diluir con

## INTERFERENCIAS (3) (5)

La prueba está formulada para el uso con sangre total humana en EDTA. La hemoglobina total en la muestra debe estar en el rango: 9-21 g/dL

HbF elevado (>10%) puede conllevar valores HbA1c inexactos.

La prueba no está afectada por las siguientes sustancias que pueden interferir en las concentraciones indicadas:

Acido ascórbico 12 mg/dL, bilirrubina total 15mg/dL, bilirrubina (conjugada) 13mg/dL, glucosa 4000mg/dL, triglicérido 4000mg/dL, ácido úrico 30 mg/dL, urea 80mg/dL.

La reacción enzimática utilizada en esta prueba (utilizando hemoglobina glicosilada estable como sustrato) no está afectada de forma adversa por la HbA1c acetilada, carbamida y lábil.

La hemoglobina variante S, C y E no interfiere de forma significativa con este método enzimático.

Young D.S ha publicado una lista de sustancias que interfieren con la dosificación.

## CALIBRACION

- El Kit de calibración de la HbA1c ENZIMA **REF** 22052 trazable sobre el procedimiento de medición de referencia del IFCC
- O cualquier otro calibrador trazable sobre método de referencia o material.

Utilizar como se indica en las instrucciones (§ **MANUAL PROCEDURE**) para generar una curva de referencia.

La frecuencia de calibración depende de las prestaciones del analizador y de las condiciones de conservación del reactivo.

Se recomienda calibrar una vez a la semana.

## CONTROL DE CALIDAD

- REF** 22013 Kit de control
- Cualquier otro suero de control titulado para este método.
- Programa externo de control de calidad.

Se recomienda controlar en los siguientes casos:

- Al menos un control por rutina.
- Al menos un control cada 24 horas.
- Cambio de vial del reactivo.
- Después de operación de mantenimiento sobre el analizador.

Cuando un valor de control se encuentra fuera de los límites de confianza recomendados, aplicar las siguientes acciones correctivas:

- Repetir el test utilizando el mismo control.
- Si el valor obtenido queda fuera de los límites, preparar un control recién reconstituido y repetir el test.
- Si el valor obtenido queda fuera de los límites, utilizar otro calibrador o un calibrador recién reconstituido y repetir el test.
- Si el valor obtenido queda fuera de los límites, calibrar nuevamente utilizando otro vial de reactivo y repetir el test.
- Si el valor obtenido queda fuera de los límites, contactar el servicio técnico BIOLABO o el distribuidor local.

## VALORES ESPERADOS (7) (8) (9)

	HbA1c NGSP (%)	HbA1c IFCC (mmol/mol Hb)
No-diabético:	< 6.0 %	42
Control glicémico de un paciente con diabetes:	< 7.0 %	53

La interpretación de las tasas de la HbA1c para monitorizar pacientes diabéticos se debe interpretar de forma individual. Dicho de otra forma, se debe vigilar el paciente contra si mismo.

Se necesita un lapso de 3-4 semanas antes de que la HbA1c pueda reflejar cambios en los niveles de glucosa en sangre.

Se recomienda que cada laboratorio defina sus propios valores de referencia para la población concernida.

## LINEALIDAD

La reacción es lineal entre 4.4% y 12%.

Muestras con valores superiores al 12% no deben diluirse y testar de nuevo. Sin embargo los valores se tienen que anotar como superiores al 12% (>12%).

## PRESTACIONES

Las características de prestación para los reactivos de la ENZIMA HbA1c han sido medidas sobre el Kenza 240TX.

Los estudios precisión (intra-serie et inter-serie) han sido establecidos hacienda un test de control de 2 muestras según el protocolo Valtech.

Intra-serie N = 20	Tasa media	Tasa elevada	Inter-serie N = 19	Tasa media	Tasa elevada
Mean %	6.6	8.9	Mean %	6.7	11
S.D. %	0.12	0.12	S.D. %	0.3	0.4
C.V. %	1.8	1.3	C.V. %	4.4	3.4

Límite de detección: aproximadamente 4.4%

Sensibilidad para 1% HbA1c: aproximadamente 0.004 Abs. a 700 nm.

**Especificidad:** Mono específico

Comparación con un procedimiento automatizado HPLC (Determinado sobre Hitachi 917 chemistry analyzer)

Los siguientes valores de HbA1c han sido obtenidos sobre sangre de pacientes (n = 44) en un rango de valores de 5 a 13% de laHbA1c:

$$y = 1.0212 x + 0.0135, r = 0.9874$$

## MODO DE EMPLEO (TECNICA MANUAL)

Poner los reactivos y muestras a temperatura ambiente, protegidos de la luz. Reconstituir los calibradores y controles como se indica en las instrucciones de uso.

**Preparación del hemolizado:** Lisar la sangre de los pacientes, los calibradores y controles con la ayuda del reactivo R4 (ver § TOMA Y PREPARACION)

**Calibración:** Utilizar el Kit de calibración **REF** 22052 (2 tasas diferentes) para generar una curva de calibración.

Pipeta en tubos de prueba bien identificados:	Estándares	Controles	Dosificaciones
<b>Reactivo R1</b>	112 µL	112 µL	112 µL
<b>Estándares (2 niveles diferentes)</b>	25 µL		
<b>Controles</b>		25µL	
<b>Muestra</b>			25 µL
Mezclar bien. Dejar reposar durante 2 minutos a 37°C. Leer la absorbancia A1 de los estándares diluidos, controles diluidos y muestras lisadas a 700 nm contra el agua			
<b>Reactivo R2</b>	48 µL	48 µL	48 µL
Mezclar bien. Dejar reposar durante 3 minutos a 37°C. Leer la absorbancia A1 de los estándares diluidos, controles diluidos y muestras lisadas a 700 nm contra el agua			
<b>Reactivo R3</b>	70 µL	70 µL	70 µL
Mezclar bien. Incubar durante exactamente 3 minutos a 37°C. Leer la absorbancia A2 de los estándares diluidos, controles diluidos y muestras lisadas a 700 nm contra el agua.			

**Nota:** Las aplicaciones con 2 reactivos (reactivo de trabajo de R1+R2) o 3 reactivos están disponibles por petición.

## CALCULO (7) (8) (9)

La concentración de la HbA1c se expresa directamente en % HbA1c utilizando una curva de calibración apropiada calculada a partir de los valores de la HbA1c de cada uno de los 2 calibradores.

$$Y (\text{HbA1c } \%) = f (\text{Abs A2-A1})$$

Los valores indicados se alinean con el sistema « Control de la diabetes y de sus complicaciones » (DCCT) y por consecuente anotadas según el formato NGSP. Ningún cálculo es necesario.

La conversión de las unidades NGSP (% HbA1c) en unidades IFCC (mmol/mol) se hace según la siguiente ecuación:

$$\text{NGSP} = [0.09148 \times \text{IFCC}] + 2.152$$

## REFERENCIAS

- Trivelli, L. A, Ranney, H. M. and Lai, H.T. *New Eng. Med.* 284, 353 (1971)
- Gonen B. and Rubenstein A. H., *Diabetologia*, 15, 1 (1978).
- Gabbay K.H., Hasty K., Breslow J. L., Ellison R.C., Bunn H. F., and Gallop P.M., *J.Clin. Endocrinol Metab.* 44, 859 (1977)
- Bates H. M., *Lab. Mang.*, vol 16 (Jan 1978)
- TIETZ N.W. *Text book of clinical chemistry*, 3<sup>rd</sup> Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p.798, 800.
- Clinical Guide to Laboratory Test*, 4th Ed., N.W. TIETZ (2006) p. 480-483
8. NGSP, <http://www.ngsp.org>
- Hoelzel W 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;50:166-7
- Sacks, D (ed). Global Harmonization of Hemoglobin A1c. *Clin Chem* 51(4): 681-683 (2005)