|  |
| --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | 2025-1S |
| **ASIGNATURA** | BIBOQUIMICA CLÍNICA | **SEMESTRE:** | TERCERO | **PARALELO:** | A |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | **ROSA ELISA CRUZ TENEMPAGUAY** |
| **FECHA** |  Martes 22 de abril de 2025 |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | 4 | **HORA:** | 07h0010h00 | **DURACIÓN:** | 3h |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES** | **GRUPO 1** | **GRUPO 2** |
|  |  |
| **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | Laboratorio E201  |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | Diagnóstico de laboratorio en trastornos del metabolismo de Carbohidratos |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** | Determinación de Hemoglobina glucosilada en pacientes con diabetes |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE.** |
| Analiza los trastornos del metabolismo de carbohidratos, a través de la ejecución de procedimientos, métodos y técnicas bioquímicas manuales y automatizadas, para efectuar un adecuado diagnóstico de laboratorio |
| **OBJETIVO GENERAL** | Determinar la concentración de Hemoglobina glicosilada en sangre total en muestras de pacientes con diabetes |
| **Objetivos específicos** | * Obtener sangre total para determinar HbA1C de sujetos que han sido diagnosticado con diabetes, registrar el tiempo de evolución de la enfermedad, así como medicación que utiliza y tratamiento farmacológico.
* Analizar las técnicas de análisis utilizadas para determinar HbA1C
* Explicar los resultados obtenidos y la fisiología o fisiopatología detectada comparándolos con los intervalos de referencia.
 |
| **FUNDAMENTO TEÓRICO:** |
| **HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (HbA1c)**Cuando la glucosa sanguínea entra a los eritrocitos, produce glucosilación del grupo amino de residuos lisina y los amino terminales de la hemoglobina. La fracción de hemoglobina glucosilada, que por lo normal se ubica alrededor de 5%, es proporcional a la concentración de glucosa en la sangre. Dado que la vida media de un eritrocito es de unos 60 días, la concentración de HbA1c refleja la concentración media de glucosa en sangre durante las seis a ocho semanas precedentes, de modo que la medición de HbA1c proporciona valiosa información para el manejo de la diabetes mellitus 2 (1,2)En un conocido estudio, Trivelli demuestran como la concentración de la Hemoglobina A1c en sujetos diabéticos se presenta elevada hasta valores 2-3 veces superiores a los valores encontrados en individuos normales. Varios investigadores han recomendado que la hemoglobina A1c sirva como un indicador del control metabólico de los diabéticos. La hemoglobina A1c se ha definido como “fracción rápida" de las hemoglobinas (HbA1a, A1B, A1C), que se eluye en el primer paso de la técnica cromatografía en columna de resina de intercambio iónico. La falta de hemoglobina glucosilada, que constituye la mayor parte de la hemoglobina ha sido designada HbA (1,2).Sin embargo, hasta la publicación del Cuidado de la Diabetes y sus Complicaciones (DCCT) en 1993, la idea de que un mejor control glucémico ayudaba a una mejor prognosis de la enfermedad, era sólo una teoría. La DCCT comparo pacientes que había recibido una terapia intensiva con pacientes que recibieron tratamiento convencional para la diabetes de tipo 1. La medición de HbA1c fue el parámetro principal de este estudio. Se demostró que los pacientes sometidos a terapia intensiva mantuvieron una baja concentración de glucosa en sangre y niveles significativamente bajos de HbA1c. Estos pacientes posteriormente manifestaron una morbilidad y mortalidad significativamente menor que los pacientes sometidos a cuidados más convencionales. El riesgo de la retinopatía, nefropatía y neuropatía se redujo en aproximadamente un 40-75%. Por lo tanto, los niveles de HbA1c fueron establecidos como un indicador fundamental en el control glucémico de pacientes con diabetes tipo 1 (1,2)**MÉTODO DE ANALISIS: METODO RAPIDO DE SEPARACIÓN POR RESINA DE INTERCAMBIO IÓNICO**El presente procedimiento utiliza una resina de intercambio iónico para la separación rápida de la hemoglobina glucosilada A1c del resto de hemoglobinas. Después de preparar el hemolizado de la sangre total la muestra se mezcla durante 5 minutos, las hemoglobinas son retenidas por la resina de intercambio iónico. Durante este tiempo, la HbA0 se une a la resina. La HbA0 contiene todas las hemoglobinas excepto la A1c, que permanece en solución. Después del período de mezcla, un filtro separa el sobrenadante que contiene la A1c de la resina. La estimación del porcentaje de la Hb A1c se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm (3).**INTERFERENCIAS** Niveles elevados de HbF puede dar resultados inferiores de HA1c, la uremia no interfiere con la determinación de HbA1c es una técnica de inmunoensayo. Las variantes de hemoglobina HbS y HbA2 no se detectan por Inmunoensayo, lo que lleva a una posible determinación incorrecta. Así mismo, intermedios lábiles (base de Schiff), no se detectan y no interferir con la determinación de HbA1c en técnicas de inmunoensayo (3).**VALORES DE REFERENCIA:** Según la asociación americana de diabetes ADA; la diabetes se diagnostica con una HA1c mayor o igual al 6,5 % (4).**Normal**: menos de 5,7 %**Prediabetes**: 5,7- 6,4 %**Diabetes**: 6,5 % o más |

|  |
| --- |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** |
| **Equipos** | **Materiales** | **Reactivos** |
| * Fotómetro o colorímetro para mediciones a 415 nm, con unidad termostatizada ajustable a 37ºC
* Centrifuga
* Estufa
* Agitador hematológico
* Agitador vortex
 | * Micropipetas automáticas 10-100µL, 100-1000µL
* Porta micropipetas
* Temporizador
* Gradilla
* Tubos de ensayo de limpios grandes y pequeños y secos
* Puntas amarillas y azules
* Una hoja de papel periódico
* Sangre total con EDTA un tubo lila por cada grupo
 | * Kit - HbA1c
 |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** |
| **PREPARACIÓN DE REACTIVOS*** Reconstituir el Estándar agregando 1mL de agua destilada, dejar reposar por 30 minutos y homogenizar ocasionalmente.
* Dejar atemperar reactivos y muestras hasta que alcancen la temperatura ambiente.

**ETAPA 1 HEMÓLISIS** * Pipetear 500 µL de reactivo lisante en los tubos de plástico para hemolisis codificados Estándar, y Muestras.
* Dispensar 100 µL de sangre (estándar o muestra) en el tubo plástico para hemolisis correspondiente. Mezclar suavemente.
* Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente
* Si se conoce que el paciente diabético esta descompensado la incubación será por 15 minutos.

**ETAPA 2 DETERMINACIÓN DE HbA1c*** Dispensar 100 µL de la etapa 1 en tubo pre envasado de resina de intercambio iónico, según corresponda a estándar o muestras
* Colocar el separador de resina en los tubos pre envasados de resina de intercambio iónico de modo que el anillo de goma este aproximadamente 1 cm por encima del nivel del líquido.
* Poner los tubos en el agitador hematológico y mezclar continuamente durante 5 minutos.
* Empujar el Filtro separador a lo largo de los tubos hasta que la resina quede firmemente empacada. Verter el sobrenadante a un tubo de ensayo limpio y seco perfectamente codificado para la medición de absorbancia.
* Ajustar el cero el espectrofotómetro con agua destilada y longitud de onda 405nm.
* Leer y registrar los valores de las absorbancias Los resultados obtenidos corresponden a la hemoglobina glucosilada del estándar y muestras

**ETAPA 3 DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA TOTAL*** Dispensar 5 mL de agua destilada en los tubos de ensayo: Estándar, y muestras.
* Pipetear 20 µL del hemolizado en los tubos codificados para estándar y muestras de hemoglobina total y mezclar cuidadosamente.
* Ajustar el cero del instrumento a 405 nm con agua destilada.
* Leer y registrar los valores de las absorbancias. Los resultados obtenidos corresponden a la hemoglobina total.

 |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** |
| (Se refiere a lo ejecutado en la práctica) |
| **OBSERVACIONES** |
|  |
| **CONCLUSIONES** |
|  |
| **RECOMENDACIONES** |
|  |
| **BIBLIOGRAFÍA** |
| 1. Murray R. Bioquímica de Harper Ilustrada. 28va Edición, Manual Moderno. México. 2011
2. Henry J. El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Madrid, Marbán. 2005
3. Linear Chemicals. Glycated HbA1c, Determinación cromatográfica en tubo con resina de intercambio iónico de Hemoglobina A1c en sangre. EEUU. 2019 [citado 19 octubre 2024]. Disponible en: <http://www.linear.es/ficheros/archivos/3155105C.pdf>
4. Asociación Americana de Diabetes. Entendiendo la Hemoglobina Glucosilada A1c [Internet]. Diagnóstico. 2023. Disponible en: <https://diabetes.org/diagnostico>
 |
|  |  |  |
| **Mgs. Ximena Robalino** | **Mgs. Rosa Elisa Cruz** | **Mgs. Franklin Ramos** |
| **DIRECTORA DE CARRERA** | **DOCENTE** | **RESPONSABLE DEL LABORATORIO** |