



HbA1c enzymatic

Finalidade

Método enzimático para a determinação de HbA1c em sangue total

Significado clínico

A diabetes mellitus é uma enfermidade crônica, que compreende um conjunto de distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono que cursam com uma manifestação comum: a hiperglicemia.

O Controle glicêmico periódico permite prevenir os transtornos agudos e reduzir o risco das complicações tardias da enfermidade (retinopatia, nefropatia, neuropatia e enfermidades cardiovasculares).

A relação entre o desenvolvimento e progressão das complicações microvasculares e o controle glicêmico está sendo debatida por muitos anos, em parte devido aos métodos inadequados para realizar um controle glicêmico retrospectivo.

Os métodos tradicionais de medição de glicose no sangue e na urina têm um valor limitado para este propósito, e só foi com o desenvolvimento de determinações para proteínas glicosiladas ou glicadas, que foi alcançado um conhecimento exato e objetivo do estado glicêmico a longo prazo.

As glicohemoglobinas, também chamadas hemoglobinas glicosiladas ou glicadas, foram descritas pela primeira vez em 1968 por Rahbar como «hemoglobinas diabéticas». Sua produção depende da concentração de glicose e ocorre através de um processo não enzimático pós-traducional chamado glicação, onde o açúcar é unido aos grupos amino das moléculas de hemoglobina (Hb). A glicação dos aminoácidos N-terminais das cadeias α e β , como assim também dos grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina na molécula de hemoglobina, resultam em uma variedade de hemoglobinas glicadas, incluindo HbA1c, que constitui a espécie glicosilada na valina N-terminal da cadeia β .

Os níveis de %HbA1c são proporcionais à concentração de glicose no sangue durante as últimas 6-8 semanas. Assim a determinação de %HbA1c provê um parâmetro integral para monitorar o curso do controle de glicose a longo prazo.

Fundamentos do método

HbA1c enzymatic é um método enzimático no qual as amostras de sangue total lisadas são submetidas a uma digestão proteica mediante uma protease. Este processo libera aminoácidos que incluem valinas glicadas das cadeias beta de hemoglobina. As valinas glicadas atuam como substratos da enzima fructosil valina oxidase (FVO). Esta enzima cliva especificamente valinas N-terminais e gera peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é quantificado em uma reação catalisada pela peroxidase (POD) em presença de um cromógeno. Não é necessária uma medida separada da hemoglobina total (Hb).

A concentração de HbA1c é expressa como %HbA1c.

Reagentes fornecidos

A₁ Reagente A₁: tampão de Goods 5 mM, pH 7,0, Triton X-100 0,5% e proteases 4 kU/mL.

A₂ Reagente A₂: tampão de Goods 1 mM, pH 6,3.

B. Reagente B: tampão Tris 15 mM, pH 8,0, FVO < 10 U/mL, POD 90 U/mL e cromógeno 0,8 mM.

Reagentes não fornecidos

- **HbA1c enzymatic Lysis Buffer** de Laborlab.

- **HbA1c enzymatic Control** de Laborlab.

- **HbA1c enzymatic Calibrator** de Laborlab.

- Água desmineralizada

Instruções de uso

Reagentes A₁, A₂ e B: prontos para uso em analisadores capazes de trabalhar com três reagentes. Para analisadores que trabalham com dois reagentes, pré-misturar os reagentes A₁ e A₂ em uma proporção 7:3 respectivamente. Misturar por inversão e deixar em repouso a 2-10°C pelo menos durante 12 horas antes de usar.

HbA1c enzymatic Lysis Buffer: pronto para uso.

Precauções

Os Reagentes Fornecidos são para uso diagnóstico "in vitro".

Os Reagentes A₁ e A₂ são foto-sensíveis. Conservar ao abrigo da luz.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análise clínica.

Todos os reagentes e as amostras devem-se descartar conforme à regulação local vigente.

Estabilidade e instruções de armazenamento

Os **Reagentes Fornecidos** são estáveis sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Não congelar.

Reagentes A₁, A₂ e B: uma vez abertos é recomendável conservar sob refrigeração (2-10°C) bem fechados. Não congelar.

Os **Reagentes A₁ e A₂ pré-misturados** são estáveis durante 4 semanas a 2-10°C.

HbA1c enzymatic Lysis Buffer: estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Evitar contaminações (não introduzir pipetas ou outros elementos no seu interior). Fechar o frasco após o seu uso.

Amostra

Sangue inteiro anticoagulado

a) Coleta: obter a amostra da maneira usual.

b) Aditivos: recomenda-se o uso de heparina ou EDTA como anticoagulante.

c) Substâncias interferentes conhecidas: não são observadas interferências por bilirrubina (conjugada e não conjugada) até 15 mg/dL, triglicérides até 2000 mg/dL, ácido ascórbico até 25 mg/dL, glicose até 4000 mg/dL, ácido úrico até 20 mg/dL nem uréia até 100 mg/dL. Deverão ser interpretados com precaução os valores de %HbA1c obtidos naquelas patologias ou situações que alteram a vida média dos eritrócitos, como anemias hemolíticas, anemias ferroprivas, transfusões, perda de sangue, etc.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas e enfermidades neste método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra é estável 3 dias a temperatura ambiente (15-25°C), ou 14 dias sob refrigeração (2-10°C).

Preparação da amostra

Permitir que o **HbA1c enzymatic Lysis Buffer** fique em temperatura ambiente antes de usar. Homogeneizar a amostra de sangue por inversão repetida até obter uma suspensão completa, evitando a formação de espuma.

Em um tubo de Kahn ou hemólise, colocar:

HbA1c enzymatic Lysis Buffer	250 uL
Amostra	20 uL

Misturar, agitando por inversão repetida ou utilizar vortex. Evitar a formação de espuma. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) pelo menos 10 minutos para assegurar a lise completa dos eritrócitos. A amostra hemolisada pode ser utilizada uma vez obtida uma solução vermelha escura e limpa, sem partículas em solução.

Os calibradores e controles devem ser tratados da mesma maneira que as amostras de pacientes.

Estabilidade de amostras hemolisadas: estáveis 4 horas a temperatura ambiente (< 25°C).

Material necessário (não fornecido)

- Analisador automático.

- Micropipetas e pipetas para medir os volumes indicados.

- Tubos de Kahn ou hemólise.

Condições de reação

Parâmetros gerais para analisadores automáticos capazes de trabalhar com 3 reagentes: **HbA1c enzymatic** é um método de ponto final e o primeiro ponto de leitura é imediatamente anterior ao acréscimo do reagente B.

Nome do test	HbA1c enzymatic
Tipo de reação	Ponto final
Comprimento. de onda 1ª	700 nm
Comprimento. de onda 2ª	800 nm
Temperatura	37°C
Volume de Reagente A ₁	112 uL
Volume de amostra	25 uL
Incubação	120 segundos
Volume de Reagente B	48 uL
Incubação	300 segundos
Incubação	70 uL
Incubação	180 segundos
Calibração	2 pontos
Calibradores	1e 2

Parâmetros gerais para analisadores automáticos capazes de trabalhar com 2 reagentes:

HbA1c enzymatic é um método de ponto final e o primeiro ponto de leitura é imediatamente anterior ao acréscimo do reagente B. Pré-misturar os Reagentes A1 e A2 como é descrito em PREPARAÇÃO DE REAGENTES.

Nome do test	HbA1c enzymatic
Tipo de reação	Ponto final
Comprimento. de onda 1ª	700 nm
Comprimento. de onda 2ª	800 nm
Temperatura	37°C
Volume de Reagente A ₁₋₂	160 uL
Volume de amostra	25 uL
Incubação	300 segundos
Volume de Reagente B	70 uL
Incubação	180 segundos
Calibração	2 pontos
Calibradores	1 e 2

Os volumes de amostra e reagentes podem-se variar proporcionalmente, sem que sejam alterados os fatores de cálculo.

Interpretação de resultados

Os valores de HbA1c (%) são expressos diretamente segundo o National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) e o Diabetes Control and Complications Trial (DCCT).

Os resultados segundo DCCT/NGSP (%) podem ser convertidos a IFCC (%) através da seguinte fórmula:

$$\text{IFCC (\%)} = [\text{NGSP (\%)} - 2,15] / 0,915$$

Método de controle de qualidade

HbA1c enzymatic Control de Laborlab.

Os controles requerem tratamento prévio com o reagente **HbA1c enzymatic Lysis Buffer** assim como os calibradores e amostras de pacientes.

Valores de referência

Pessoas com metabolismo sadio, segundo a DCCT/NGSP: 4,8-5,9% de HbA1c

Baseado nos estudos de DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) é considerado que níveis maiores a 7% de HbA1c estão associados a maior risco de complicações crônicas. É recomendável que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência dentro da sua população de pacientes.

Limitações Do Procedimento

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

Recomenda-se realizar uma calibração completa quando mudar de lote de reagente reagente e/ou de lote de **HbA1c enzymatic Lysis Buffer** ou quando o controle de qualidade assim o determina.

Este método foi desenvolvido para informar %HbA1c, pelo que não devem-se informar por separado os valores de HbA1c e Hb.

O kit HbA1c enzymatic deve ser usado sempre que o valor de hemoglobina do paciente esteja dentro da faixa 9-21 g/dL. Não utilizar este método para valores fora da faixa.

Para preservar a integridade dos reagentes deve evitar-se todo tipo de contaminação, empregando para a medição unicamente micropipetas perfeitamente limpas e secas.

Desempenho

a) **Reprodutibilidade:** fora avaliada a través do protocolo EP5-A da CLSI. Para isso foram processadas em analisador automático, 3 amostras com diferentes níveis de HbA1c e obtiveram-se os seguintes resultados:

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
5,39%	0,04%	0,72%
10,89%	0,06%	0,56%
12,11%	0,09%	0,71%

Precisão total

Nível	D.P.	C.V.
5,39%	0,07%	1,32%
10,89%	0,09%	0,82%
12,11%	0,19%	1,54%

b) **Limite de detecção:** 4% (%HbA1c).

Linearidade: **HbA1c enzymatic** possui uma faixa linear entre 4-14%. Amostras com valores superiores a 14% não devem ser diluídas e analisadas novamente. Os resultados devem ser informados como maiores a 14% (> 14%).

APRESENTAÇÃO

1 x 18 mL Reagente A1

1 x 8 mL Reagente A2

1 x 12 mL Reagente B

(Cód. 1770460)

REFERÊNCIAS

- Rahbar, S. - Clin. Chim. Acta 22:296 (1968).
- Bunn, H. et al - Science 200:21 (1978).
- Goldstein, D. et al - Diabetes Care 17:938 (1994).
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N. Engl. J. Med. 329:977 (1993).
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group - Lancet 352:837 (1998).
- Weykamp C.W. et al - Clin. Chem. 41:82 (1995).
- Sacks, D. - Clin. Chem. 49:1245 (2003).
- Martina, W. et al - Clin. Chem. 39:2259 (1993).
- Karl, J. et al - Klin. Lab. 39:991 (1993).
- American Diabetes Association - Diabetes Care [Supl] 24/1(2001).
- John, G. - Clin. Chem. Lab. Med. 41:1199 (2003).
- Jeppsson, J. et al - Clin. Chem. Lab. Med. 40:78 (2002).
- Jarausch, J. et al - Clin. Chem. 42:116 (Abstract 094) (1996).
- Junge, W. et al - Poster presentation 18th International Diabetes Federation Congress, Paris 2003.
- Tietz Textbook of Clinical Chemistry - Burtis, C.; Ashwood, E. (5th Ed.) WB Saunders, 2001.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 5th ed., 2000.
- Young D.S. - "Effects of Disease on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (ex-NCCLS) Protocols EP15-A, 1999 / EP17-A, 2004.

SÍMBOLOS



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após a reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo

Termo de garantia

Este kit como um todo tem garantia de troca, desde que esteja dentro do prazo de validade e seja comprovado pelo Departamento Técnico da Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. que não houve falhas técnicas na execução e manuseio deste kit, assim como em sua conservação.



Produtos para Laboratórios Ltda.
Estrada do Capão Bonito, 489
Guarulhos - SP - Brasil - CEP: 07263-010
CNPJ: 72.807.043/0001-94
Atendimento ao cliente:
+55 (11) 2480 0529/+55 (11) 2499 1277
sac@laborlab.com.br
www.laborlab.com.br