

HbA1c

Finalidade

Método de inibição imunoturbidimétrica para a determinação quantitativa de HbA1c

Significado clínico

A diabetes mellitus é uma enfermidade crônica, que compreende um conjunto de desordens 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 foi 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 tem 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, 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 é um método de inibição imuno-turbidimétrica para determinar a quantidade de hemoglobina A1c (HbA1c) como uma proporção da hemoglobina total em sangue total humano (% ou mmol/mol HbA1c). Para isto é necessário liberar a hemoglobina contida nos glóbulos vermelhos, mediante a hemólise da amostra. O sangue do paciente é posta em contato com o **HbA1c Lysis Buffer** que contém um detergente (brometo de tetradeciltrimetil amônia - TTAB) que lisa os glóbulos vermelhos especificamente. A partir do hemolisado obtido, é determinado mediante duas reações independentes, o nível de HbA1c e Hb da amostra.

HbA1c

Durante a primeira fase da reação, a HbA1c da amostra reage com o anticorpo específico anti-HbA1c (Reagente A1), formando complexos antígeno-anticorpo solúveis. Dado que a molécula de HbA1c possui um só epitopo por β -globina para a fixação de anticorpos específicos, não podem ser formadas redes de imunocomplexos.

Com a adição de polihapteno (Reagente A2), que possui numerosos epitopos por molécula, se produz a reação destas moléculas com o excesso de anticorpo específico da primeira reação, dando lugar a imunocomplexos insolúveis que podem ser medidos turbidimetricamente a 340 nm. Desta maneira, quanto maior é o conteúdo de HbA1c na amostra menor é a formação de imunocomplexos insolúveis e menor o sinal turbidimétrico obtido.

Hb

A hemoglobina liberada ao hemolisar a amostra, é convertida em um derivado que pode ser medido espectrofotometricamente (Reagente B).

Este método é capaz de detectar todas as variantes de hemoglobina glicadas na porção N-terminal da cadeia β cuja região reconhecida pelo anticorpo é idêntica a da HbA1c. Desta maneira permite controlar o estado metabólico do diabético com hemoglobinopatias e uremia.

Reagentes fornecidos

A1. Reagente A1: anticorpos mono-específicos anti-HbA1c em tampão pH 6,2.

A2. Reagente A2: polihapteno-HbA1c em tampão pH 6,2.

B. Reagente B: tampão fosfato pH 7,4.

Reagentes não fornecidos

- **HbA1c Calibrator** da Laborlab.

- **HbA1c Lysis Buffer**, da Laborlab.

- Água desmineralizada.

- Solução fisiológica.

Instruções de uso

Reagentes A₁, A₂ e B: prontos para uso.

HbA1c Lysis Buffer: pronto para uso.

HbA1c Calibrator: vide reconstituição nas instruções de uso correspondente. O Calibrator não requer tratamento prévio com o **HbA1c Lysis Buffer**.

Precauções

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

O detergente TTAB é irritante. R36/38: irrita os olhos e a pele. S24/25: evite-se o contato com os olhos e a pele. S26: caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com abundante água e acudir ao médico. S28: caso de contato com a pele, lavar imediatamente com abundante água. S37/39: usar luvas apropriadas e proteção para os olhos e a cara.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas 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 e em uso, são estáveis 1 mês sob refrigeração (2-10°C). É recomendável conservar os reagentes em geladeira bem fechados quando não são usados, para evitar recalibrações freqüentes.. Não congelar.

HbA1c Lysis Buffer: estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada no rótulo. Evitar contaminações (não introduzir pipetas ou qualquer outro elemento no seu interior) e fechar o frasco após o seu uso.

Amostra

Sangue total anticoagulado

a) Coleta: obter a amostra da maneira usual.

b) Aditivos: é recomendável utilizar heparina ou EDTA como anticoagulante.

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: a amostra é estável por até 3 dias a temperatura ambiente (15-25°C), até 7 dias sob refrigeração (2-10°C) ou até 6 meses congelada (-20°C). Só pode ser descongelada uma vez.

Interferências

Não são observadas interferências por bilirrubina (conjugada e não conjugada) até 40 mg/dL, triglicérides até 13 g/L, ácido ascórbico até 50 mg/dL nem fator reumatóide até 500 U/mL. Deverão se interpretar com precaução os valores de HbA1c obtidos naquelas patologias ou situações que alteram a vida média dos eritrócitos, como anemias hemolíticas, anemias ferropênicas, transfusões, perda de sangue, etc.

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

Preparação da amostra

Permitir que o **HbA1c Lysis Buffer** fique a temperatura ambiente antes de usar. Homogeneizar a amostra de sangue por inversão repetida, evitando a formação de espuma. Em um tubo de Kahn ou hemólise, colocar:

HbA1c Lysis Buffer	1000 uL
Amostra	10 uL

Misturar, agitando por inversão repetida ou bem utilizar vortex. Evitar a formação de espuma. Depois da mudança de cor vermelho para o marrom esverdeado (1-2 minutos), a amostra hemolisada poderá ser utilizada.

Estabilidade de amostras hemolisadas: são estáveis por até 4 horas a temperatura ambiente (15-25°C), até 24 horas sob refrigeração (2-10°C) ou até 6 meses congelada (-20°C). Só podem-se descongelar uma vez.

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:

Nome do test	HbA1c
Tipo de reação	ponto final
Comprimento de onda primária	340 nm
Temperatura	37°C
Volume de amostra	10 ul
Volume de Reagente A ₁	250 ul
Volume de Reagente A ₂	50 ul
Incubação de Reagente A ₁	300"
Incubação de Reagente A ₂	300"
Calibração	5 pontos
Calibradores	Diluições do Calibrator: 10, 20, 40, 60 e 100%*

*As diluições de HbA1c Calibrator são realizadas com HbA1c Lysis Buffer.

Nome do test	Hb
Tipo de reação	ponto final
Comprimento de onda primária	570 nm
Comprimento de onda secundária	660 nm
Temperatura	37°C
Volume de amostra	20 ul
Volume de Reagente B	230 ul
Incubação de Reagente B	300"
Calibração	2 pontos
Calibradores	C0* e HbA1c Calibrator

*Como C0 (calibrador zero) pode ser utilizada solução fisiológica ou **HbA1c Lysis Buffer**.

Os volumes de amostra e reagentes podem ser variados proporcionalmente, sem que sejam alterados os fatores de cálculo.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

1) Expressão de resultados segundo IFCC:

$$\text{HbA1c (mmol/mol)} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} \times 1000$$

2) Expressão de resultados segundo DCCT/NGSP:

$$\text{HbA1c (\%)} = 91,5 \times \frac{\text{HbA1c}}{\text{Hb}} + 2,15$$

É recomendável o uso de um decimal na expressão de resultados NGSP (%) e sem decimais nos resultados IFCC (mmol/mol).

Método de controle de qualidade

HbA1c Control da Laborlab.

Os controles não requerem tratamento prévio com o **HbA1c Lysis Buffer**.

Valores de referência

Pessoas com metabolismo normal:

1- HbA1c (mmol/mol): 29-42 (segundo IFCC)

2- HbA1c (%): 4,8-5,9 (segundo DCCT/NGSP)

Baseado nos estudos de DCCT e UKPDS, é considerado que níveis maiores a 7% (DCCT/NGSP) ou 53 mmol/mol (IFCC) de HbA1c estão associados a maior risco de complicações crônicas. Em geral, é recomendável que cada laboratório estabeleça os seus próprios intervalos de referência, dentro da sua população de pacientes.

Limitações Do Procedimento

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA.

Os componentes do kit HbA1c são lote-específicos, portanto não podem ser intercambiados com outros lotes.

É recomendável realizar uma recalibração completa (HbA1c e Hb) quando é mudado o lote de reagente ou quando o controle de qualidade assim o determina.

Este método foi desenvolvido para informar HbA1c (mmol/mol) ou HbA1c (%), de modo que não devem ser informados por separado os valores de HbA1c e Hb.

Para preservar a integridade dos reagentes deve ser evitada todo tipo de contaminação, utilizando para a medição unicamente micropipetas perfeitamente limpas e secas.

Desempenho

a) Imprecisão: fora avaliada através do protocolo EP5-A da CLSI. Para isso foram processadas em Konelab 60i, 3 amostras com diferentes níveis de HbA1c (%), obtendo-se os seguintes resultados:

Precisão intra-ensaio

Hb

Nível	D.P.	C.V.
15,1 g/dL	0,093 g/dL	0,6 %
13,2 g/dL	0,061 g/dL	0,5 %
17,7 g/dL	0,152 g/dL	0,9 %

HbA1c

0,58 g/dL	0,006 g/dL	1,1 %
0,68 g/dL	0,006 g/dL	0,9 %
1,23 g/dL	0,016 g/dL	1,3 %

%HbA1c

5,7 %	0,049 %	0,9 %
6,9 %	0,054 %	0,8 %
8,5 %	0,087 %	1,0 %

Precisão total

Hb

Nível	D.P.	C.V.
15,1 g/dL	0,132 g/dL	0,9 %
13,2 g/dL	0,081 g/dL	0,6 %
17,7 g/dL	0,203 g/dL	1,2 %

HbA1c

0,58 g/dL	0,013 g/dL	2,2 %
0,68 g/dL	0,013 g/dL	1,9 %
1,23 g/dL	0,036 g/dL	2,9 %

%HbA1c

5,7 %	0,076 %	1,3 %
6,9 %	0,092 %	1,3 %
8,5 %	0,195 %	2,3 %

b) Faixa de medição de HbA1c: podem ser obtidos valores de HbA1c entre 0,3 g/dL e a concentração do HbA1c Calibrator (2,6 g/dL) que corresponde a uma faixa dinâmica aproximada de 23 a 200 mmol/mol de HbA1c segundo a IFCC e de 4,3 a 20,5% segundo a DCCT/NGSP, considerando um nível de Hb normal (13 g/dL).

Se a concentração de HbA1c é menor a 0,3 g/dL, é recomendável hemolisar a amostra original 1 + 50 com o **HbA1c Lysis Buffer** e repetir as determinações de HbA1c e Hb, não requerendo correção dos resultados obtidos.

Se a concentração de HbA1c é maior à concentração do calibrador mais alta, é recomendável diluir o hemolisado 1 + 1 ou hemolisar a amostra original 1 + 200 com o **HbA1c Lysis Buffer** e repetir as determinações de HbA1c e Hb, não requerendo correção dos resultados obtidos.

d) Faixa de medição de Hb: 6 a 30 g/dL.

APRESENTAÇÃO

1 x 25 mL Reactivo A₁

1 x 5 mL Reactivo A₂

1 x 25 mL Reactivo B

(Cód. 1770580)

Laborlab fornece separadamente:

HbA1c Lysis Buffer:

- 1 x 250 mL (Cód. 1770610)

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).

- Sacks, D. et al - Clin Chem 48: 436 (2002).

- Weykamp CW 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 [Suppl] 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. (5ª Edition) WB Saunders, 2001.

- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACCPress, 5 th ed., 2000.

- Hanas, R. - Clin Chem Lab Med 48 (6) 775-776 (2010).

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