

Kit para determinação da hemoglobina glicada em amostras de sangue total (HbA1C).

Somente para uso diagnóstico *in vitro*

Metodologia e princípio do teste

A determinação quantitativa da hemoglobina glicada é realizada a partir do hemolisado da amostra, onde é eliminada a fração lável. O hemolisado é transferido para a microcoluna de resina de troca catiônica, onde ocorrem interação entre as cargas de resina e as cargas das moléculas de hemoglobina; sendo as cargas das moléculas HbA1C menores, estas não se ligam à resina, passando especificamente para o eluato, onde é realizada a determinação quantitativa da HbA1C através da medida espectrofotométrica da absorbância em 415 nm.

Composição dos reagentes e apresentação

R1 Hemolisante: Bifaltato de potássio 50 mmol/L, detergente, pH 5,0 (1 x 7 mL) **R2 Tampão:** Tampão fosfato 48 mol/L, pH 6,5, azida sódica 0,95 g/dL (1 x 60 mL). **R3 Reagente de cor:** Tampão fosfato 72 mmol/L, pH 6,4, azida sódica 0,95 g/L (2 x 225 mL).

Microcolunas: Contém resina de troca catiônica equilibrada (25 unidades)

* Conjunto para 25 testes.

Materiais necessários não fornecidos

- Água destilada ou deionizada
- Banho-maria
- Cronômetro
- Espectrofômetro
- Pipetas manuais ou automáticas
- Ponteiras descartáveis
- Vidraria

Precauções e cuidados especiais

- Somente para uso diagnóstico "in vitro".
- Não misturar ou trocar lotes de reagentes diferentes.
- Evitar contaminação microbiana dos reagentes e não utilizar reagentes que tenham sinais de contaminação ou precipitação.

- Caso haja contato com quaisquer reagentes lavar a área afetada com água em profusão. Em caso de ingestão de reagentes procurar auxílio médico imediato munidos desta instrução de uso.
- Utilizar equipamentos de proteção individual segundo normas de biossegurança.
- A água (destilada ou deionizada) utilizada na limpeza do material ou nos procedimentos deve ser recente e isenta de agentes contaminantes.
- Certificar-se das condições adequadas de funcionamento dos equipamentos de análise.
- O descarte do material utilizado deve ser feito segundo os critérios de biossegurança.
- Lavar as mãos após trabalhar com material potencialmente infeccioso.

Armazenamento, transporte e validade

Armazenar os reagentes entre 2-8°C em sua embalagem original. Os produtos poderão ser transportados, por até 48 horas, entre 2-30°C. A data de validade se encontra no rótulo do produto.

Amostra biológica

Sangue total colhido com heparina ou EDTA

Sob refrigeração, a hemoglobina glicada no sangue total é estável durante 7 dias. Caso não seja possível a determinação no mesmo dia da coleta da amostra, aconselha-se guardar o sangue total ao invés do eluato.

Todo o material biológico deve ser processado como sendo potencialmente contaminante. Usar luvas descartáveis durante a manipulação do material biológico. As amostras devem ser descartadas, após o uso, em recipientes específicos para este fim.

Interferentes pré-analíticos

A presença de hemoglobinas variantes S e C podem alterar, de forma não muito significativa, os resultados. A presença das hemoglobinas E, F, Hb-carbamilada e Hb-acetilada, podem interferir nos resultados. A interferência da fração HbA1c - lável e

minimizada pelo reagente hemolisante. Nos pacientes com anemia hemofílica, anemia por deficiente de ferro, ou transfundidos, a idade média dos eritrócitos são alteradas. Interpretar estes resultados com cautela.

Preparo do Hemolisado

Permitir que reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente;

Passo 1 Pipetar em tubo de ensaio como descrito abaixo:

Sangue total	50 µL
Hemolisante	200 µL

Passo 2 Agitar e deixar à temperatura ambiente durante 10-15 minutos.

Preparo da Microcoluna

A armazenagem prolongada das microcolunas pode ocasionar uma excessiva compactação da resina, o que diminui o fluxo. Para evitar esta interferência, colocar a microcoluna em posição invertida por aproximadamente 10 minutos. Após este período, retorná-la à posição original e aguardar a sedimentação da resina antes de abaixar o disco superior.

Caso o procedimento acima não resolva, deixar a microcoluna por 30 minutos a 37° C (Banho maria ou estufa). Repeti o processo acima, caso o problema persista, entre em contato com o SAC.

Passo 1 Destampar a parte superior da microcoluna de troca catiônica e quebrar a o bico inferior.

Passo 2 Pressionar, com o auxílio da extremidade de uma pipeta, o disco superior até o nível da resina, evitando comprimí-la. Deixar gotejar até que o líquido alcance o nível do disco. **Descartar o eluato**

Separação e leitura da HbA1C

Passo 1 - Hemolisado Aplicar, cuidadosamente sobre o disco da microcoluna, 50 µL do hemolisado. **Descartar o eluato**

Passo 2 - Tampão Após absorção de todo hemolisado, adicionar 200µL do tampão, procurando arrastar os possíveis resíduos do hemolisado. Quando este atinjir o disco da microcoluna, adicionar mais 2 mL. **Descartar o eluato**

Passo 3 – Reagente de Cor Colocar a microcoluna sobre um tubo de ensaio e adicionar 4 mL do Reagente de Cor. **Recolher o eluato.**

Passo 4 – Leitura HbA1C

Agitar bem e ler a absorbância da fração HbA1c a 415 nm, zerando o fotômetro com água destilada.

Passo 4 – Leitura HB Total

Pipetar em tubo de ensaio como descrito abaixo:

Hemolisado	50 µL
Reagente de cor	12 mL

Agitar bem e ler a absorbância da Hb Total a 415 nm contra água destilada. A cor é estável por 60 minutos.

Cálculos

$$\text{Hemoglobina Glicada} = \frac{(\text{Abs. HbA1C})}{3 \times \text{Abs. HB Total}} \times 100$$

Os resultados encontrados por este método são equivalentes aos métodos certificados pela U S National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) e podem ser transformados em equivalentes ao do método normalizado pela International Federation of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.

$$\text{HbA1C - IFCC (mmol/mol)} = 10,93 \times \text{HbA1C\%} - 23,5$$

Temperatura de trabalho: 21-26 °C.

Se a temperatura de trabalho for superior ou inferior, multiplicar o valor obtido pelo correspondente, segundo a tabela abaixo:

Temperatura de ensaio	Fator de correção
18-20°C	1,15
27-30 °C	0,90

Valores de referência

Os valores de referência abaixo foram estabelecidos pelo Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) e foram aceitas em vários países para população não diabética e para

avaliação do grau de controle da glicose no sangue nos pacientes diabéticos.

NGSP-DCCT (%)	IFCC (mmol/mol)	Valores de referência / Grau de controle
4,0 – 6,5	20-48	Não diabético
6,0 – 7,0	42-53	Diabético com bom controle
7,0 – 8,0	53-64	Diabético com controle regular
> 8	> 64	Diabético com controle ruim

Estes valores são dados apenas a título orientativo. É recomendável que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência.

Controle de qualidade

O laboratório deve ter como prática de rotina o uso de amostras controle comerciais. Preferencialmente deve participar de programas de controle externo de qualidade, a exemplo daqueles oferecidos pela SBAC e SBPC.

Características de desempenho do produto⁷

Sensibilidade analítica: A sensibilidade do método é de 4% (20 mmol/mol).

Limite de Linearidade: Os resultados são lineares até 17% (162 mmol/mol).

Estudos comparativos: Este produto não apresentou variação sistêmica significativa quando comparado com produtos de mesma metodologia.

Repetitividade e Reprodutibilidade:

Repetitividade	Concentração média	n	CV%
	7,2% = 55 mmol/mol	25	5,4
Reprodutibilidade	9,9% = 85 mmol/mol	25	6,3
	Concentração média	n	CV%
	7,2% = 55 mmol/mol	25	7,3
	9,9% = 85 mmol/mol	25	5,9

Termo de garantia

A MBiolog Diagnósticos Ltda garante o desempenho deste produto até a data de expiração indicada no rótulo, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções de uso forem seguidas corretamente.

Meio ambiente

As caixas e bulas podem ser encaminhados para coleta seletiva e reciclados, desde que não contenha contaminações químicas e/ou biológicas. Preserve o meio ambiente.

Referências

1. Bissé E, Abraham EC. New less temperature-sensitive microchromatographic method for the separation and quantitation of glycosylated hemoglobins using a non-cyanide buffer system. *J Chromatogr* 1985; 344: 81-91.
2. 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: 166-174.
3. Hanas R, et al. 2010 Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 775-776.
4. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
5. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed. AAC Press, 2000.

SAC – SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE

(31) 3507 0707

sac@mbiolog.com.br

REV.: 02 – 26/10/2010

Fabricado por: MBiolog Diagnósticos Ltda

Rua Gama, 337 – Vila Paris – Contagem – MG
CEP: 32.372-120 - CNPJ: 03.590.360/0001 – 89

Resp. Técnico: Fabrício G de Brito CRF-MG 9587

Empresa Certificada: BPFC - ISO 9001

ANVISA: 8004758

A.F