

Método

Imunoturbidimetria.

Finalidade

Reagentes para determinação específica da fração HbA1c da hemoglobina glicada no sangue total.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

Princípio

Depois de se preparar um hemolisado, a concentração de hemoglobina A1c (HbA1c) é quantificada mediante um procedimento turbidimétrico com látex. As diferentes hemoglobinas presentes no hemolisado são absorvidas sobre a superfície das partículas de látex de forma atípica e em proporção equivalente à sua concentração na amostra. A adição de um anticorpo anti-HbA1c humana provoca uma aglutinação proporcional à concentração de hemoglobina A1c que pode ser quantificada por turbidimetria.

Significado Clínico

A Hemoglobina A1c é o produto da condensação irreversível da glicose com o resíduo N-terminal da cadeia β da hemoglobina A.

A concentração de HbA1c no sangue é diretamente proporcional à concentração média de glicose durante um período de tempo de 6-8 semanas, equivalente à vida média dos eritrócitos.

A concentração de hemoglobina glicada (HbA1c) no sangue é diretamente proporcional à concentração média estimada de glicose (CMGe) durante o período de 6 a 8 semanas, equivalente à vida média das hemácias.

Destes modo, a CMG estimada pode ser calculada como segue:

$$eAG \text{ (mg/dL)} = 28,7 \times \text{HbA1C - NGSP-DCCT (\%)} - 46,7$$

$$eAG \text{ (mmol/L)} = 1,59 \times \text{HbA1C - NGSP-DCCT (\%)} - 2,59$$

$$eAG \text{ (mg/dL)} = 2,64 \times \text{HbA1C - IFCC (mmol/mol)} + 15,0$$

$$eAG \text{ (mmol/L)} = 0,146 \times \text{HbA1C - IFCC (mmol/mol)} + 0,843$$

Os níveis de HbA1c são um complemento valioso para as determinações de glicose no sangue na avaliação do controle glicêmico com vista ao acompanhamento dos pacientes diabéticos, proporcionando uma informação mais confiável do que a concentração de glicose. Existem vários estudos que indicam que as complicações relacionadas com a diabetes podem ser reduzidas através de um controle rigoroso dos níveis de glicose no sangue. A concentração de HbA1c também pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico da diabetes. O diagnóstico clínico não deve ser realizado tendo em conta o resultado de apenas um ensaio, mas deve integrar os dados clínicos e laboratoriais.

Reagentes

Reagente nº 1 - Látex: Suspensão de partículas de látex, azida de sódio 0,95 g/L, pH 8,0.

Reagente nº 2 - Anticorpo anti-HbA1c: Anticorpo anti-HbA1c humana, conservantes, pH 6,0.

Reagente nº 3 - Calibradores: Sangue humano. A concentração de HbA1C está indicada no rótulo do frasco Conjunto de calibradores disponível em 4 níveis.

Estabilidade

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa no rótulo do produto e na embalagem externa quando conservados na temperatura recomendada, bem vedados e se evitado a contaminação durante o uso.

Condições de Armazenamento

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8 °C.

Cuidados Especiais e Precauções

- As amostras a serem analisadas devem ser tratadas como material potencialmente infectante.
- Utilizar os EPI's de acordo com as Boas Práticas de Laboratório Clínico.
- O Látex (1) e o Anticorpo anti-HbA1c (2) contêm azida sódica que é tóxica e irritante para pele e mucosa.
- As informações de Descarte, Segurança e Primeiros Socorros estão descritas na Ficha Individual de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) deste produto, disponível em www.bioanalitica.com.br ou pelo telefone 0800 006 8111.
- Reagentes de lotes diferentes não devem ser misturados. Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes, a fim de evitar contaminação cruzada.
- Não utilizar os reagentes quando apresentarem absorbância do branco superior a 0,700 a 670 nm
- Evitar deixar os reagentes fora das condições de armazenamento especificadas, quando os mesmos não estiverem em uso.
- O tempo de reação, pipetagens e temperatura de trabalho são muito importantes para obtenção de resultados corretos.
- Usar pipetas de vidro e ponteiras descartáveis específicas para cada amostra, controle, padrão/calibrador e reagente.

- O nível de água do banho-maria deve ser superior ao dos tubos de ensaio que contém as reações.

Materiais Necessários e Não Fornecidos

- Analísis automático, semiautomático ou espectrofotômetro;
- Pipetas de vidro e/ou automáticas;
- Ponteiras, estantes;
- Tubos de ensaio;
- Cronômetro.

Amostra

Sangue total (EDTA). O analito é estável durante 7 dias a 2 - 8 °C, quando livres de contaminação.

Para descarte dos reagentes e materiais biológicos deve-se seguir as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

A lipemia (triglicérides 4 g/L) e a bilirrubina (10 mg/dL) não interferem. Outros medicamentos e substâncias podem interferir.

Nos imunoensaios, a presença de Hb-acetilada, Hb-carbamilada, HbA1C lável, HbE e HbD não afeta os resultados. Outras variantes de hemoglobina como HbS, HbF ou HbC podem interferir. Nos doentes com anemia hemolítica, anemia por carência de ferro ou quando tiver sido efetuada uma transfusão, a idade média dos eritrócitos é alterada. Por este motivo, os resultados de HbA1c destes doentes devem ser interpretados com cuidado.

Preparação dos Reagentes

Calibradores de HbA1C 4 níveis de matriz humana. Reconstituir os calibradores liofilizados com 0,5 mL de água destilada. Estável durante 30 dias a 2 - 8 °C.

Os reagentes 1 e 2 estão prontos para uso.

Calibração

Curva de Calibração

Calcular a diferença de absorbâncias ($\Delta_{\text{Calibrador}} - \Delta_{\text{Branco}}$) de cada ponto da curva de calibração e representar os valores encontrados face às concentrações de HbA1c. A concentração de HbA1c na amostra é calculada por interpolação da sua diferença de absorbâncias ($\Delta_{\text{Amostra}} - \Delta_{\text{Branco}}$) na curva de calibração.

Recomenda-se a execução do branco todos os dias e que se calibre pelo menos cada 30 dias, depois de uma substituição de lote de reagente ou quando os procedimentos de controle de qualidade o exigirem.

Procedimento Técnico

Equipamentos Automáticos

Para determinação em equipamento automático, verificar no site www.bioanalitica.com.br.

Preparação do Hemolisado

Os calibradores devem ser tratados da mesma forma que as amostras dos doentes.

Sangue total	50 μ L
Água destilada	5,0 mL

Agitar. Deixar incubar à temperatura ambiente durante 5 minutos. O Hemolisado é estável durante 72 horas a 2 - 8 °C.

Ensaio

- Pré-aquecer os reagentes e o instrumento a 37 °C.
- Pipetar em tubos de ensaio:

	Macro	Micro
Reagente 1 Látex	950 μ L	450 μ L
Branco (água destilada) Calibrador/Amostra	15 μ L	7 μ L

- Misturar e inserir a cuveta no instrumento. Acionar o cronômetro marcando 2 minutos.

- Pipetar nos tubos de ensaio:

Reagente 2 Anticorpo anti-HbA1c	200 μ L	100 μ L
---------------------------------	-------------	-------------

- Misturar e ler a absorbância a 670 nm decorridos 10 segundos (A1) e de 5 minutos (A2).

- Calcular a diferença de absorbâncias $\Delta A = A2 - A1$.

Cálculo

Os valores de concentração obtidos são rastreáveis pelo método de referência descrito pela IFCC. Os valores rastreáveis pelo método de referência descrito pelo US National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) são obtidos mediante a fórmula seguinte.

$$\text{HbA1C -NGSP-DCCT (\%)} = 0,0915 \times \text{HbA1C -IFCC (mmol/mol)} + 2,15$$

Exemplo

Se HbA1C-Método IFCC = 24 mmol/mol

$$\text{HbA1C-Método NGSP em \%} = (24 \text{ mmol/mol} \times 0,0915) + 2,15$$

$$\text{HbA1C-Método NGSP em \%} = 4,35 \% \approx 4,4 \%$$

Nota

Para se evitarem eventuais interferências com outros tipos de ensaios, recomenda-se que as medições de HbA1C sejam efetuadas em séries independentes das restantes técnicas.

Características do Desempenho
Comparação de Métodos

Os resultados obtidos com estes reagentes não mostram diferenças sistemáticas significativas quando comparados com os de um processo de referência.

Sensibilidade

O limite de detecção mínimo do método é 6 mmol/mol.

Linearidade

Intervalo de medição (valor aproximado dependendo do valor do calibrador de concentração mais elevado) 6 - 140 mmol/mol. Para valores superiores, diluir a amostra 1/2 com água destilada e repetir a medição.

Repetitividade

Concentração média	CV	n
37 mmol/mol	1,8 %	15
78 mmol/mol	1,6 %	15

Reprodutibilidade

Concentração média	CV	n
37 mmol/mol	3,1 %	15
78 mmol/mol	3,0 %	15

Valores de Referência

Estes valores de referência devem ser usados apenas como orientação. Sugere-se que cada laboratório estabeleça seus próprios valores para população atendida. Os resultados dos testes devem ser analisados por um profissional responsável.

Os valores seguintes foram estabelecidos pelo Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) e foram aceitos em vários países para a população não diabética e para a avaliação do grau de controle da glicose no sangue em doentes diabéticos.

IFCC (mmol/mol)	NGSP-DCCT (%)	Valores de Referência / Grau de Controle
20 – 48	4,0 – 6,5	Não diabético
42 – 53	6,0 – 7,0	Meta
53 – 64	7,0 – 8,0	Bom controle
> 64	> 8,0	Necessita atuação

Controle Interno da Qualidade

O laboratório clínico deve possuir um programa interno de controle da qualidade, para assegurar que todos os procedimentos, normas, limites e tolerância para variações sejam claramente definidos. Ressaltamos que todos os sistemas de medição apresentam uma variabilidade analítica, que deve ser monitorada pelos laboratórios. Portanto, é recomendável a utilização de controles, que permitem avaliar a precisão e a exatidão das dosagens. Sugere-se utilizar soluções estabilizadas da linha de controles e calibradores da Bioanalítica.

Observações

• A limpeza e secagem adequadas do material usado são fatores fundamentais para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.

• A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de agentes contaminantes. A limpeza da vidraria deve ser feita com detergente neutro. O enxágue deve ser exaustivo sendo os últimos com água destilada ou deionizada.

• A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes e usar nas medições, a água deve ser do Tipo II, com resistividade > 1 megaohms/ cm ou condutividade < 1 microsiemens /cm e concentração de silicatos < 0,1 mg/L. Para o enxágue inicial da vidraria, a água pode ser do Tipo III, com resistividade > 0,1 megahoms ou condutividade < 10 microsiemens.

No enxágue final, utilizar água do Tipo II. Coluna deionizadora com sua capacidade saturada libera água alcalina, vários íons e também substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando de maneira imprevisível os resultados. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

Referências Bibliográficas

1. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
2. 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.
3. Hoezel W et al. IFCC reference systems 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.
4. Bry L, Chen P, Sacks D. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 41:153-163.
5. Little R.R., Rohlfing C; Hanson S, Connolly S, Higgings T, Weykamp C, D'Costa M, Luzzi V, Owen W, Roberts WL. Effects of Hemoglobin (Hb) E and HbD traits on measurements of Glycated Hb (HbA1C) by 23 methods. *Clin Chem* 2008, 54: 1277-1282.
6. Nathan DM, et al. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008; 31: 1473-1478.
7. Nathan DM, et al. International Expert Committee report on the role of the HbA1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes care* 2009; 32: 1327-1334.
- 8 - Bioanalítica: Dados internos de arquivo do P&D.

Termos e Condições de Garantia

A Bioanalítica Diagnóstica garante o desempenho e a qualidade deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que utilizados, armazenados e transportados nas condições adequadas.

Apresentações

Ref.	Apresentação	Látex	Anticorpo anti-HbA1c	Calibradores
BA247-50	HbA1c	1 x 50 mL	1 x 10 mL	
BA247-50	HbA1c / CALIBRADOR	1 x 50 mL	1 x 10 mL	1: 1 x 0,5 mL 2: 1 x 0,5 mL 3: 1 x 0,5 mL 4: 1 x 0,5 mL
BA055-2	CALIBRADOR HbA1c			1: 1 x 0,5 mL 2: 1 x 0,5 mL 3: 1 x 0,5 mL 4: 1 x 0,5 mL

Bioanalítica Diagnóstica Ltda

Rua Álvares da Silva, 12 - União

CEP: 31160-360 – Belo Horizonte MG - Brasil

Tel. +55 31 3657-0051

www.bioanalitica.com.br

E-mail: bioanalitica@bioanalitica.com.br

CNPJ: 20.264.948/0001-61 – Indústria Brasileira

SAC: 0800 006 8111

E-mail: sac@bioanalitica.com.br

Revisão: Novembro / 2019