

Glicohemoglobina Inlab - Monoteste

Reagente em tubos para a determinação quantitativa de hemoglobina glicosilada no sangue total a 415 nm

INTRODUÇÃO

Do início ao fim da vida da célula vermelha, a hemoglobina glicosilada é formada continuamente pela adição da glicose ao N-terminal da cadeia beta da hemoglobina. Este processo, o qual não é enzimático, reflete a média de exposição da hemoglobina à glicose em período prolongado. Em um trabalho científico clássico, Trivelli e colaboradores¹ mostraram níveis de hemoglobina glicosilada de 2-3 vezes mais elevados em diabéticos em relação aos encontrados em indivíduos normais. Vários pesquisadores têm recomendado que a hemoglobina glicosilada serve como um indicador do controle da diabete uma vez que os seus níveis aproximam-se dos valores normais para diabéticos respondendo ao tratamento⁽²⁻⁴⁾.

A hemoglobina glicosilada tem sido definida operacionalmente como a hemoglobina "fração rápida" (Hb1a, A1b, A1c) cujas frações separam-se primeiro durante a cromatografia em coluna com resina de troca catiônica. A hemoglobina não glicosilada, que é a maioria da hemoglobina, tem sido designada como Hb AO. O kit GLICOHEMOGLOBINA INLAB utiliza uma resina de troca catiônica de ligação rápida para obter a separação acelerada da hemoglobina glicosilada (fração rápida) da hemoglobina não glicosilada (Hb AO).

PRINCÍPIO DO TESTE

Um hemolisado preparado a partir do sangue total é misturado continuamente durante 5 minutos com uma resina de troca catiônica de ligação rápida. Durante este tempo, a Hb AO liga-se à resina. Após o período de homogeneização, um filtro é usado para separar a resina do líquido sobrenadante, onde ficou a hemoglobina glicosilada. A porcentagem de hemoglobina glicosilada da amostra é determinada, calculando-se a proporção das absorvâncias das duas hemoglobinas (glicosilada e total) da amostra, dividida pela proporção obtida das hemoglobinas (glicosilada e total) do Padrão e o resultado multiplicado pela concentração do Padrão (%). A leitura das absorvâncias é obtida a 415 nm.

Os resultados são expressos em HbA1c mas podem ser convertidos em HbA1c usando um fator de conversão ou quando usar o valor de Padrão HbA1c.

MATERIAIS FORNECIDOS (para 50 testes)

- 50 tubos com resina de troca iônica (3 ml) 8 mg/ml de resina de troca catiônica, tamponada em pH 6,9. HOMOGENEIZAR BEM ANTES DE USAR;
- 01 frasco com Reagente Lisante (25 ml) 10 mM de cianeto de potássio, adicionado de surfactante;
- 01 frasco com Padrão liofilizado (1 ml) Preparado de hemoglobina glicosilada a partir de a partir de eritrócitos humanos.

A concentração do Padrão vem indicada no rótulo do frasco;
- Filtros separadores (50 unidades).

MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

- Micropipetas de 0,02 ml e 0,1 ml;
- Pipetas de 0,5 ml e 5,0 ml;
- Homogeneizador de hemograma, shaker ou vortex;
- **Controle liofilizado**;
- Tubos 13 x 100 mm;
- Cronômetro e estante para tubos;
- Espectrofotômetro ou colorímetro (415 nm).

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

1. Resina

Armazenar de 15-30°C. A resina é estável até a data de validade indicada no rótulo do frasco, desde que mantida nas condições indicadas.

DETERIORAÇÃO: O líquido sobrenadante acima da resina deve ser claro e incolor. A turbidez indica deterioração e o reagente não deve ser utilizado.

2. Reagente Lisante

Armazenar de 15-30°C. O reagente é estável até a data de validade indicada no rótulo, desde que mantido nas condições indicadas.

DETERIORAÇÃO: O Reagente Lisante deve ser claro e incolor. A turbidez indica deterioração e o reagente não deve ser utilizado.

3. Padrão de Glicohemoglobina

Armazenar de 15-30°C. O Padrão é estável até a data de validade indicada no rótulo, desde que mantido nas condições indicadas. **PROTEJA DA LUZ E CALOR.** Reconstituição: Adicionar 1,0 ml de água deionizada. Homogeneizar suavemente durante 10 minutos. Depois de reconstituído, o Padrão é estável por 14 dias, se mantido de 2-8°C ou pode ser dispensado em alíquotas de 0,1 ml e congelado por 90 dias.

PRECAUÇÕES

- Somente para uso diagnóstico in vitro.
- A resina causa irritação. Evite o contato com os olhos, a pele e o vestuário. Caso ocorra, lave a área afetada com bastante água.
- O Reagente Lisante contém cianeto. Não misturar com ácidos. Lave as mãos após o manuseio; descarte com grande quantidade de água.
- O Padrão de glicohemoglobina é um padrão secundário com valor estabelecido por um método de referência¹. Manusear com o mesmo cuidado tomado para as amostras de sangue humano.
- Os eritrócitos humanos usados neste produto deram resultados negativos para o antígeno da Hepatite B, Hepatite C e anticorpo HIV.

COLETA DA AMOSTRA

Coletar o sangue com EDTA preferencialmente,

mas heparina pode ser usado como anticoagulante.

Precauções:

Manusear as amostras como sendo potencialmente infectantes.

Conservação da amostra:

A glicohemoglobina no sangue total coletado com EDTA é estável durante uma semana a 2-8°C.

Substâncias interferentes:

Soros lipêmicos podem causar resultados falsamente elevados. A hemoglobina fetal (HbF) tem ligação com a resina similar à hemoglobina glicosilada e, se presente em quantidade elevada, contribui nos valores. As hemoglobinas glicosiladas HbS e HbC ligam-se mais intensamente e produzem falsamente baixos valores. Outras hemoglobinopatias (por exemplo, betatalassemia) e anemia hemolítica também produzem baixos resultados.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Todos os reagentes devem estar em temperatura ambiente antes de iniciar o procedimento do teste.

A. Preparo do Hemolisado

1. Identifique um tubo para cada Padrão, Controle e um para cada amostra. Dispense 0,5 ml do Reagente Lisante em cada um deles.
2. Coloque 0,1 ml do sangue, bem homogeneizado, dentro dos tubos apropriadamente identificados. Homogeneizar suavemente até a completa lise.
3. Deixe em repouso durante 5 minutos.

B. Separação da Hemoglobina Glicosilada

1. Identifique os tubos que contêm a resina para o Padrão, Controle, Amostra 1, etc.
2. Coloque 0,1 ml do hemolisado, preparado no Item A, dentro dos respectivos tubos com resina.
3. Introduza neles o Filtro Separador, deixando a borracha da extremidade do filtro aproximadamente 1 cm acima do nível do líquido.
4. Homogeneize todos os tubos continuamente, durante 5 minutos. Poderá ser feito em um homogeneizador de hemograma, num vortex, num shaker ou manualmente, por inversão. No caso do shaker, colocar os tubos deitados, fixando-os na plataforma.
5. Empurre o Filtro Separador para dentro do tubo até que a resina esteja firmemente compactada no fundo do tubo.
6. O sobrenadante agora contido no Filtro Separador poderá ser transferido para uma cubeta ou ser aspirado de dentro do próprio Filtro Separador, dependendo do equipamento utilizado para leitura.
7. Para proceder às leituras, ajuste o equipamento para absorvância zero, a 415 nm, utilizando água deionizada ou

destilada como Branco.

8. Leia e anote as absorvâncias do Padrão, Controle, Amostra 1, etc. Estas leituras são para hemoglobina glicosilada e deve ser feita no intervalo de 60 minutos.

C. Hemoglobina Total

1. Identifique tubos para Padrão, Controle, Amostra 1, etc. Dispense 5,0 ml de água deionizada ou destilada neles.
2. Coloque 0,02 ml do hemolisado, preparado no Item A, dentro dos respectivos tubos. Homogeneize.
3. Ajuste o equipamento em absorvância zero a 415 nm, usando água deionizada ou destilada como Branco.
4. Leia e anote os valores de absorvância para o Padrão, Controle, Amostra 1, etc. Estas leituras são para Hemoglobina Total e deve ser feita no intervalo de 60 minutos.

ESTABILIDADE DE AMBAS HEMOGLOBINAS APÓS O PROCEDIMENTO

Os produtos finais de reação para hemoglobina glicosilada e para a hemoglobina total apresentam-se completamente estáveis, porém, as leituras das reações devem ser efetuadas dentro de uma hora, evitando que a evaporação torne-se significativa.

CALIBRAÇÃO

Recomenda-se o uso do Padrão fornecido com o kit. O Padrão está na forma liofilizada, é estável e tem um valor estabelecido por um aceitável método de referência.

CONTROLE DE QUALIDADE

A confiança nos resultados dos testes deve ser monitorada rotineiramente usando um Controle apropriado, analisado do mesmo modo que o desconhecido. Sugere-se o uso de Controle para Hemoglobina Glicosilada.

RESULTADOS

Cálculo dos Resultados

Os resultados desconhecidos (amostras) devem ser determinados do seguinte modo: Para cada amostra, calcular a proporção (P) da absorvância da hemoglobina glicosilada (Hb glicosilada) pela absorvância da hemoglobina total (Hb total). Usar a seguinte equação para determinar a concentração:

$$\text{Amostra \%} = \frac{\text{Proporção de Amostra}}{\text{Proporção do Padrão}} \times \text{Concentração do Padrão}$$

onde,

$$\text{Proporção de Amostra} = \frac{\text{Hb Glicosilada da Amostra}}{\text{Hb Total da Amostra}}$$

$$\text{Proporção do Padrão} = \frac{\text{Hb Glicosilada do Padrão}}{\text{Hb Total do Padrão}}$$

EXEMPLO:

Um padrão contendo 10,0% de hemoglobina glicosilada e com as absorvâncias: 0,610 para a hemoglobina glicosilada e 0,635

para a hemoglobina total.

Uma amostra desconhecida e com as absorvâncias: 0,775 para a hemoglobina glicosilada e 0,710 para hemoglobina total.

$$P(\text{padrão}) = \frac{0,610}{0,635} = 0,961$$

$$P(\text{amostra}) = \frac{0,775}{0,710} = 1,09$$

$$\% \text{ Amostra} = \frac{1,09}{0,961} \times 10,0\% = 11,3\%$$

Os resultados podem ser também relatados como HbA1c. Quando comparado ao método de referência para HbA1c, este mostrou 98% de correlação com a equação de:

$$Y(\text{valor de A1c}) = 0,838 \times (\text{valor obtido da \% da amostra}) - 0,732$$

O valor obtido (% da amostra) pode ser convertido para HbA1c usando a fórmula acima. Para um cálculo direto o valor do Padrão de 10% pode ser mudado para 7.6% e o resultado obtido será o valor de HbA1c.

VALORES ESPERADOS

Os valores encontrados para HbA1 (a+b+c) e HbA1c:

	GLICOHEMOGLOBINA	
	HbA1	HbA1c
Normal	6,0 – 8,0%	4,0 – 6,2%
Diabéticos bem Controlados	7,5 – 8,9%	5,5 – 6,8%
Diabéticos com Controle no Limite	9,0 – 10,0%	6,8 – 7,6%
Diabéticos mal Controlados	Acima de 10%	Acima de 7,6%

Glicose Sanguínea Média (GSM)

Em um estudo realizado por Dr. D.M. Nathan⁵, o teste de Glicohemoglobina mostrou uma correlação linear com o resultado da Glicose Sanguínea Média de pacientes com níveis de glicose frequentemente monitorados. Esta relação é melhor descrita quando os valores da HbA1 esteja na faixa de 6.5 – 13% com a seguinte equação: **GSM (mg/dl) = 36.7 x % HbA1 – 185** O valor de GSM obtido através da fórmula acima são apenas estimativos.

Este intervalo representa 95% do intervalo de confiança para 200 pacientes supostamente com valores de glicose normal e sem histórico de diabetes. Um estudo com 31 indivíduos diabéticos mostrou valores de hemoglobina glicosilada de 8,4% a 16%. Para a população diabética, uma comparação com glicose plasmática em jejum com níveis de hemoglobina glicosilada, forneceu um coeficiente de correlação igual a 0,84.

LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Amostras de pacientes com hemoglobinopatias ou com diminuição do tempo de sobrevivência das células vermelhas podem mostrar resultados incorretos (Ver Item Coleta de Amostra) Amostras de sangue com hemoglobina total maior do que 18 g/dl

deverão ser diluídas a 1:2 com água destilada ou deionizada antes do teste.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Linearidade

O procedimento para a determinação da hemoglobina glicosilada mostra linearidade para os níveis de hemoglobina glicosilada no intervalo de 4,0% - 20,0%.

Precisão Entre Ensaios

Foi estabelecida a partir de sangues analisados com níveis normais e elevados de hemoglobina glicosilada, vinte vezes cada.

Nível	Média (%)	Desvio Padrão	% C.V.
Normal	7,8	0,21	2,7
Elevado	13,4	0,23	1,7

Precisão Intra Ensaios

Foi estabelecido a partir de sangues analisados com níveis de hemoglobina para dez corridas cada um, num período de cinco dias.

Nível	Média (%)	Desvio Padrão	% C.V.
Normal	7,6	0,31	4,1
Elevado	13,0	0,60	4,6

Especificidade

Um estudo comparativo da GLICOHEMOGLOBINA INLAB e outro método comercial amplamente utilizado mostrou uma correlação de 0,96.

Sensibilidade

O teste de GLICOHEMOGLOBINA INLAB tem uma sensibilidade de 0,02% de hemoglobina glicosilada por 0,001 unidade de absorção.

GARANTIA DA QUALIDADE

A Alamar Tecno Científica Ltda obedecendo ao que estabelece o código de Defesa do Consumidor e portanto para que o produto apresente o seu melhor desempenho estabelece que:

- O usuário leia e siga rigorosamente o procedimento técnico;
- Os materiais estejam armazenados em condições indicadas;
- Os acessórios necessários estejam de acordo com o solicitado.

Antes de ser liberado para venda cada lote é testado e aprovado, sendo uma amostra retida para referencia futura e controle de qualidade. Portanto havendo necessidade de alguma informação sobre o lote em questão, o Controle de qualidade está à disposição. E quaisquer problemas que venham ocorrer por falha da empresa, serão resolvidos sem ônus para o cliente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trivelli, L.A., Ranney, H.M. and Lai, H.T., New Eng. J. Med. 284, 353 (1971).
2. Goen, B., Rubenstein, A.H., Diabetologia 15, 1 (1978).
3. Gabby, K.H., Hasty, K. Breslow, J.L., Ellison, R.C., Bunn, H.F. and Gallop, P.M., J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 859 (1977).
4. Bates, H.M., Lab. Manag. Vol. 16 (Jan. 1978).
5. Nathan, D.M., et al., The Clinical Information Value of Glycosylated Hemoglobin Assay. The New England Journal of Medicine, 310, 341-346 (1984).



Alamar Tecno Científica Ltda.

Rua Emir Macedo Nogueira, 179 – J. Potinari – Diadema – S. Paulo

Sac: (11) 5564-9500

Nº Reg. MS 10252080069

Edição – Agosto/2014