

FINALIDADE

Sistema para determinação da hemoglobina glicosilada no sangue total.

Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO

Hemoglobina glicosilada (HbA1) é a porção de hemoglobina que elui primeiramente em cromatografia de coluna. A porção restante, representando a maior parte da hemoglobina, é chamada HbA0.

Mistura-se sangue total à solução hemolisante contendo íons borato e assim, paralelamente, à hemólise total elimina-se a fração lábil pré-A1c. Em seguida, transfere-se uma parte do hemolisado para o tubo com resina catiônica e, através de movimentos basculantes lentos a HbA0 liga-se à resina. Em solução, resta HbA1 ou hemoglobina glicosilada (cromatografia *batch contact*). A percentagem de HbA1 em relação à hemoglobina total é calculada, posteriormente, por espectrofotometria.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

Hemoglobina glicosilada **Doles** permite quantificar de forma rápida e simples a HbA1. A resina catiônica é pré-ensugada em tubos, na quantidade exata, apresentando-se pronta para uso.

Dentro das condições habituais do laboratório, o uso de padrão paralelo com a determinação de um fator diminui as interferências próprias do processo cromatográfico.

METODOLOGIA

Cromatografia de troca iônica.

REAGENTES E APRESENTAÇÃO

Reagentes

Hemolisante: solução tampão de fosfato, contendo 3,85 mmol de Cianeto de Potássio por litro e 13 mg/mL de ácido bórico.

Cada frasco contém, aproximadamente, 3,5mg de Cianeto de Potássio.

Resina: cada tubo contém 3,0mL de solução tampão, tendo em suspensão 8mg/mL de resina catiônica.

Solução padrão (liofilizada): solução de hemoglobina humana com teor conhecido de HbA1. **O valor de HbA1 está impresso no rótulo.** Testes para HbsAg, HVC e HIV foram negativos.

Manusear com os cuidados inerentes à manipulação de sangue.

Apresentação

Hemolisante	1 x 18 mL
Resina	26 x 3,0mL
Solução padrão (liofilizada)	1 x 160mg
Separadores	26 unidades

NÚMERO DE TESTES

26 testes

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro capaz de medir a absorvância em 405nm (405 - 420nm).
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipetas semiautomáticas de 20µL, 100 µL e 500µL.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada ou destilada.
- Cronômetro.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Hemolisante: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Resina: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Solução padrão: armazenar à temperatura de 2-8°C. Estável, na forma liofilizada, até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. **Após sua reconstituição permanece estável por 7 dias à temperatura de 2-8°C.**

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para uso **diagnóstico *in vitro***. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas.

Cada frasco de hemolisante contém, aproximadamente, 3,5mg de Cianeto de Potássio. Não pipetar a solução com a boca.

A resina contém azida sódica (irritante).

O padrão é uma solução de hemoglobina humana. Manusear com os cuidados inerentes à manipulação de sangue.

Em caso de contaminação acidental, lavar a parte afetada em água corrente.

O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Risco
Biológico



Venenoso



Irritante

AMOSTRA

Sangue total colhido com EDTA (anticoagulante universal ou anticoagulante glicose Doles). A amostra permanece estável por uma semana à temperatura de 2-8°C.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Reconstituição do padrão:

Reconstituir o produto liofilizado com 500µL de água destilada ou deionizada. Após a reconstituição, deixar repousar por **30 minutos**, com ocasionais homogeneizações, até dissolução completa. A solução permanece estável por 5 dias à temperatura de 2-8°C. Após a reconstituição, o padrão é tratado de maneira idêntica à amostra, tal como descrito nos parágrafos A, B e C.

A- Preparo do hemolisado:

- 1-Homogeneizar a amostra.
- 2-Com o auxílio de uma pipeta semiautomática dispensar 500µL do hemolisante em um tubo de ensaio.
- 3-Acrescentar 100µL de amostra (**utilizar pipeta semiautomática**).
- 4-Misturar, agitar e deixar repousar por 5 minutos à temperatura ambiente (20 - 25°C).

B-Separação da hemoglobina glicosilada (HbA1):

- 1.A resina deve estar homogeneamente suspensa no tampão. **Inverter pelo menos 10 vezes o tubo antes de adicionar o hemolisado.**

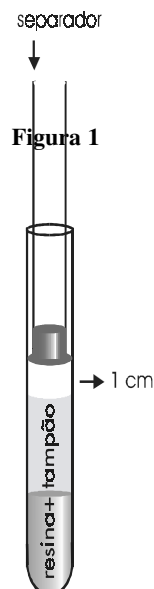
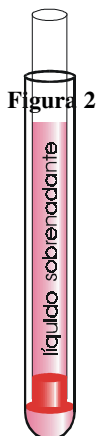


Figura 1



2. Acrescentar 100µL do hemolisado ao tubo contendo resina (**utilizar pipeta semiautomática**).
3. Inserir o separador no tubo, posicionando-o 1 cm acima da resina (fig.1).
4. Misturar, durante 6 minutos, o conteúdo do tubo em um homogeneizador hematológico. Na ausência desse equipamento, homogeneizar por inversão durante 08 minutos contínuos.
5. **Após a homogeneização deixar em repouso por 3 minutos.**
6. Empurrar o separador contra a resina até o ponto em que compactada contra o fundo do tubo passe a oferecer resistência. A solução de **HbA1** penetrará na cânula plástica (fig.2). **Não pressionar excessivamente o separador, pois pode ocorrer ruptura do mesmo e contaminação do líquido sobrenadante com a resina.**
7. Transferir a solução para a cubeta de leitura. Se a solução de HbA1 ficar imobilizada na cânula, leves pancadas no fundo do tubo serão suficientes para liberar o líquido.



LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido conforme instruções de uso. Qualquer alteração poderá levar a resultados errôneos.
- O volume de tampão liberado (item 6, separação HbA₁) é de ± 2mL. Se o volume necessário para leitura for superior, adicione 1 ou 2mL de água destilada (volumes finais de 3 ou 4mL). A 2mL da solução de hemoglobina total, acrescente a mesma quantidade de água utilizada na etapa anterior. Proceda de maneira idêntica com o padrão. As absorvâncias encontradas serão menores e inversamente proporcionais às diluições. O resultado final não sofrerá alterações.
- A contaminação da solução de HbA1 com a resina irá fornecer uma fração de HbA1 maior que a de HbT.
- Pacientes portadores de insuficiência renal crônica apresentam níveis baixos de hemoglobina glicosilada.
- A anemia hemolítica e a anemia megaloblástica provocam valores falsamente baixos devido à sobrevida diminuída dos eritrócitos.
- Hemoglobina fetal (HbF) não interfere no processo cromatográfico.
- A presença de hemoglobinas S e C glicosiladas produz resultados falsamente diminuídos ao se fixarem às resinas.

C- Cálculo da hemoglobina total (HbT):

1- Pipetar 5mL de água destilada ou deionizada em um tubo e a seguir, 20µL do hemolisado. A medida do volume deve ser precisa. Homogeneizar.

COLORIMETRIA

Ler as absorvâncias de HbT e HbA₁ em espectrofotômetro, 405nm (405-420nm) e acertar o zero do aparelho com água destilada ou deionizada. A cor final permanece estável por 3 horas, à temperatura ambiente (20-30°C).

LINEARIDADE

- **A reação é linear entre 4 e 20% .**
- **O kit de Hemoglobina Glicosilada Doles possui padrão no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar o ensaio com o padrão que acompanha o kit e calcular seu fator de calibração (F) de acordo com o exemplo abaixo.**

CÁLCULOS

$$\text{Fator (F)} = \frac{\text{absorvância HbT (padrão)}}{\text{absorvância HbA1}} \times \% \text{ HbA1 (padrão)}$$

Obs.: A percentagem de HbA1 padrão está impressa no rótulo do frasco do padrão.

O fator deverá ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.

Exemplo:

Leituras do padrão:

$$\text{HbT} = 0,517$$

$$\text{HbA}_1 = 0,374$$

$$\% \text{HbA}_1 \text{ padrão} = 5,9\%$$

$$\text{Fator (F)} = \frac{0,517}{0,374} \times 5,9 = 8,2$$

$$\% \text{HbA1 (amostra)} = \frac{\text{absorvância HbA}_1}{\text{absorvância HbT}} \times F$$

Exemplo:

Leitura da amostra:

$$\text{HbT} = 0,530$$

$$\text{HbA1} = 0,513$$

$$\% \text{HbA1(amostra)} = \frac{0,513}{0,530} \times 8,2 = 7,9$$

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada na limpeza do material, preparo dos reagentes e dosagem deve ser de boa qualidade.
3. Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, amins e agentes oxidantes que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.
5. O uso de amostra controle de referência deve ser uma prática rotineira do laboratório. Recomenda-se utilizar uma amostra controle com valor na faixa de normalidade e outra amostra controle de valor elevado.

VALORES DE REFERÊNCIA

O valor de referência foi estabelecido com intervalo de confiança de 95% para a população estudada de indivíduos com glicemia normal e sem histórico familiar de diabetes.

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Como orientação, sugerimos os seguintes valores:

Não diabéticos ou diabéticos bem controlados: 4.5 - 8.3%.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A hemoglobina glicosilada é produto de uma glicosilação permanente da hemoglobina, que se inicia nas hemácias jovens e continua até o fim de sua vida média, em torno de 120 dias. A intensidade da glicosilação é proporcional ao nível de glicose sanguínea. A determinação da hemoglobina glicosilada reflete indiretamente os níveis de glicose durante o período de glicosilação e é indicada para monitorar a terapêutica do paciente diabético. Os níveis de hemoglobina glicosilada apresentam-se próximos à faixa superior de normalidade nos pacientes cuja diabetes apresenta-se sob controle com valores de glicemia estáveis e com valores médios inferiores a 160mg/dL.

Pacientes com níveis de glicemia estáveis são monitorados com hemoglobina glicosilada, em média, a cada 3 meses na diabetes tipo I e 5 meses na diabetes tipo II.



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas com 02 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração de HbA1 (%)	7,7	12,8
Desvio padrão	0,24	0,21
Coefficiente de variação (%)	3,1	1,6

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens, em cada amostra, durante 20 dias consecutivos obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2
Concentração de HbA1 (%)	8,0	14,8
Desvio padrão	0,32	0,45
Coefficiente de variação (%)	4,0	3,0

Especificidade: durante os estudos de comparação com um produto de mesma metodologia foram realizados 36 testes em amostras cujo teor de Hemoglobina Glicosilada situava-se no intervalo de 5,9% e 14,1%. A comparação entre os produtos, deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 0,0712 + 0,992x$. O coeficiente de correlação é de 0,98.

Sensibilidade: o produto possui sensibilidade de 0,02% de glicohemoglobina para 0,001 unidade de absorvância.

Substâncias interferentes: amostras de pacientes com hiperlipidemia não devem ser utilizadas, pois a turbidez irá interferir na leitura, produzindo resultados falsamente elevados.

Modificações químicas do grupo N-terminal da cadeia beta, como as produzidas por salicilatos, carbamatos e galactose, formam produtos que podem interferir nos resultados.

A hemoglobina fetal não se liga à resina e elui juntamente com a hemoglobina A1 e se presente em níveis aumentados contribui para resultados falsamente elevados

As hemoglobina S e C produzem resultados falsamente diminuídos.

Hemoglobinopatias como a betalassemia e a anemia hemolítica, devido a diminuição do tempo de sobrevivência dos eritrócitos, também produzem resultados baixos.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Trivelli, L.A.; Ranney, H.M.; Lai, H.T.: New Engl. H. Med., 284, 373-375, 1971.
- Gabbay, K.H. et al.: J. Clin. Endocrinol Metab., 44:859-864, 1977
- Phyllis, K.R.; Delmiro, A.V.; Daniel, L.S.: Amer. J. Clin. Endocrinol Metab., 44:859-864, 1977
- Phyllis, K.R.; Delmiro, A.V.; Daniel, L.S.: Amer. J. Clin. Path. 75:45-49, 1981
- Kaplan L.A.; Pesce J.A.; Química Clínica, 129-134, 1990.
- Tibúrcio, H.M.: Controle Interno da Qualidade Analítica, 1ªed. março/1995.
- Doles: dados de arquivo.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor.**

Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

1. O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico.
2. As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
3. Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.
CNPJ: 01.085.513/0001-05
Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro
Caixa Postal 1051
CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil
e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº: 10231810088

Revisão: 26 (07/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

