

# GLYCOHEMOGLOBIN HbA<sub>1</sub> TEST

## NOME

Hemoglobina Glicada.

## MÉTODO

Separação rápida por resina de troca iônica.

## FINALIDADE

Reagentes para determinação da fração glicada da hemoglobina (Hb A<sub>1</sub>) presente no sangue total humano com EDTA. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

## FUNDAMENTO

A glicohemoglobina é formada irreversível e progressivamente nos eritrócitos durante o ciclo de vida de 120 dias das células normais. Desde que a concentração da glicohemoglobina nos eritrócitos reflete a média do nível sanguíneo da glicose nas últimas 4 a 6 semanas e é estável para a vida dos eritrócitos, a medição da glicohemoglobina fornece um teste valioso para a asserção do controle de um período longo de pacientes diabéticos.

O sangue em contato com o reagente de lise, contendo um solubilizante (detergente) de proteína e alta concentração de íons borato, sofre hemólise total, ocorrendo ainda a eliminação da fração lábil (bases de Schiff). A preparação hemolisada é então misturada por 5 minutos com uma resina de troca catiônica de ligação fraca. Durante este tempo, a hemoglobina HbA<sub>0</sub> acopla-se à resina enquanto que a hemoglobina glicada HbA<sub>1</sub> permanece no sobrenadante. Após o período de 5 minutos é realizada uma centrifugação para separar a resina do sobrenadante, o qual contém a HbA<sub>1</sub>. A concentração de hemoglobina glicada é determinada pela medida de absorvância da fração hemoglobina glicada e da fração hemoglobina total em 415 nm ou Hg 405 nm e comparando-se a relação de absorvância entre as duas hemoglobinas com a obtida do padrão processado da mesma forma que a amostra.

## SIGNIFICADO CLÍNICO

A formação da hemoglobina glicada ocorre de forma irreversível e progressiva no eritrócito e é proporcional aos níveis glicêmicos encontrados no sangue, sendo que valores anormais levam de 4 a 6 semanas para normalizarem-se. Por esta propriedade, a determinação da hemoglobina glicada para avaliação da glicemia nos diabéticos é de grande utilidade porque avalia o real quadro glicêmico das últimas 4 ou 6 semanas. Os níveis se encontram elevados na anemia ferropriva e diminuídos nas anemias hemolíticas.

## IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO

Manter RGT e LYSE entre 2 e 25°C.

### RGT – Resina de Troca Iônica

Já envasada nos tubos plásticos

Resina de troca catiônica ácida fraca	30 mmol/L
Tampão imidazol (pH 7,5 ± 0,1)	150 mmol/L
Borato	0,1 g/L
Thimerosal	

### LYSE – Hemolisante (pH 7 ± 0,1)

Detergente	0,2%
Borato	1000 mmol/L
Azida sódica	0,065%

### STD – Padrão

Hemoglobina humana liofilizada. Ver Precauções.  
Ver concentração exata no frasco do reagente.

## PREPARO DOS REAGENTES

RGT e LYSE são prontos para uso. O LYSE deve ser bem homogeneizado antes do uso.

O STD deve ser reconstituído com 1,0 mL de água deionizada. Deixar solubilizar por 30 minutos, com homogeneização ocasional. Utilizar o reagente recém-preparado ou congelar em alíquotas.

## ESTABILIDADE

Os reagentes são estáveis até a data de validade impressa nos rótulos, se armazenados conforme indicações.

Depois de reconstituído, o STD é estável por 30 dias, se congelado (-20°C). Descongelar apenas uma vez. Homogeneizar bem antes do uso. Manusear como material potencialmente infectante.

## TRANSPORTE

O transporte do kit deve ser feito pela rota mais direta evitando-se as chegadas nos finais de semana e feriados no local de destino. O kit não é afetado pelo transporte desde que seja entregue ao destinatário no período máximo de 07 dias e em uma temperatura de até 37°C.

## TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA:

O fabricante garante a qualidade do produto, se este for armazenado como descrito acima e em sua embalagem original.

## PRECAUÇÕES

1- O STD contém derivados de fluido humano e foi testado para a presença de HBSAg e anticorpos HCV e HIV apresentando resultados negativos. Apesar de terem sido utilizados testes validados com alto grau de confiabilidade, nenhum deles pode assegurar que produtos que contenham derivados de fluidos humanos sejam incapazes de provocar doenças. Portanto, os cuidados habituais de biossegurança devem ser aplicados na manipulação desse produto.

2- Usar roupas de proteção e luvas descartáveis de acordo com as Boas Práticas de Laboratório.

3- Todo material contaminado com amostras dos pacientes ou controles do kit devem ser inativados por autoclavagem (60 min. a 121°C) ou por imersão em solução de hipoclorito de sódio a 5% por no mínimo 60 minutos;

4- Para o descarte seguro dos reagentes e materiais biológicos, sugerimos utilizar as regulamentações normativas locais, estaduais ou federais para a preservação ambiental.

5- Como os resultados não são influenciados pela variação de temperatura, rodar o padrão em intervalos adequados, pelo menos uma vez por kit utilizado.

6- Diabéticos sem controle (metabolismo desequilibrado) podem ter níveis extremamente elevados da forma lábil de aldimina. Para total eliminação desta fração, aumentar para 15 minutos o tempo de incubação na etapa A.

7- Homogeneizar bem o RGT para assegurar a reprodutibilidade do teste.

8- Se não houver disponibilidade de homogeneizador hematológico, o RGT deve ser homogeneizado manualmente ou pelo uso de um homogeneizador tipo vortex. Agitar o RGT várias vezes por 10 – 15 segundos durante a etapa B do procedimento.

9- O diagnóstico final não deve se basear no resultado de um único teste e sim na correlação dos resultados dos testes com achados clínicos.

10- LYSE contém azida sódica. RGT contém timerosal. Não aspirar. Evitar contato com a pele e mucosas.

11- LYSE Provoca irritação cutânea e ocular. Pode afetar a fertilidade ou o feto.

12- Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

13- Lavar cuidadosamente após manuseio.

14- Se entrar em contato com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contato, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico.

15- Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

16- Em caso de exposição ou suspeita de exposição: consulte um médico.

17- Armazenar em local fechado à chave.

18- Eliminar o conteúdo/recipiente em conformidade com a legislação local/regional/nacional/internacional.

19- Os riscos residuais do kit, de acordo com critérios pré-determinados, são aceitáveis em comparação aos benefícios proporcionados pelo uso. A análise de risco foi realizada de acordo com a ISO 14971, relacionada à data final e levando em consideração a atual informação de registro.

## AMOSTRA BIOLÓGICA

**Coleta da amostra:** Deve-se obter a amostra através de punção venosa.

**Anticoagulante:** Utilizar EDTA como anticoagulante.

**Estabilidade:** 1 semana entre 2 e 8°C. Homogeneizar bem antes do uso.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

Ponteiras;  
Pipetas;  
Tubos;  
Espectrofotômetro.

## MÉTODO DE ANÁLISE:

### A. PREPARO DO HEMOLISADO

1. Pipetar em tubo de ensaio, à parte, 250 µL do LYSE.
2. Pipetar no mesmo tubo 50 µL de amostra bem homogeneizada.
3. Repetir o mesmo procedimento para o padrão STD.
4. Deixar em repouso por 5 minutos. (Ver item 6 de "Precauções").

### B. SEPARAÇÃO DA HbA<sub>1</sub>

1. Adicionar 100 µL do hemolisado - (A2) ao tubo contendo a resina. Não descartar o hemolisado, porque ele será usado para a determinação da hemoglobina total (C).
2. Tampar o tubo.
3. Homogeneizar o tubo 15 segundos a cada minuto durante 5 minutos. Se possível colocar em um homogeneizador para hematologia. Ver item 8 de "Precauções".
4. Destampar o tubo e centrifugar por 2 minutos a 2000 - 3000 rpm.
5. Cuidadosamente, transferir 1 mL do sobrenadante para a cubeta de leitura utilizando uma pipeta automática. Se ocorrer a ressuspensão da resina centrifugar novamente. A presença de resina na cubeta de leitura provocará resultados inadequados.
6. Ler a absorvância contra água a 415 nm ou Hg 405 nm dentro de 10 minutos. Esta leitura é a A1: absorvância da hemoglobina glicada.

## NOTA:

Esta técnica permite obter um volume de sobrenadante de 1,5 - 1,7 mL. Para aparelhos que requeiram volume maior, pode-se fazer diluição do sobrenadante de acordo com o volume de reação necessário para o aparelho utilizado:

1,0 mL do sobrenadante + 1,0 mL de H<sub>2</sub>O. Homogeneizar e ler a absorvância contra a água em 415 nm. Multiplicar o valor da leitura por 2 para efetuar os cálculos.

## C. OBTENÇÃO DA HEMOGLOBINA TOTAL

1. Pipetar em um tubo de ensaio, à parte, 20 µL do hemolisado (A2).
2. Adicionar 5 mL de água destilada e homogeneizar.
3. Ler a absorvância contra água a 415 nm ou Hg 405 nm dentro de 10 minutos. Esta leitura é a AT: absorvância da hemoglobina total.

## D. CÁLCULO

### 1. Cálculo do fator "F" a partir do padrão:

Processar o padrão conforme os procedimentos A, B e C e calcular o fator utilizando a seguinte fórmula:

$$F = (A_{TP} \times \% HbA_{1P}) / A_{1P}$$

% HbA<sub>1P</sub> = Porcentagem da hemoglobina glicada do padrão

A<sub>1P</sub> = Absorvância da hemoglobina glicada do padrão (procedimento B)

A<sub>TP</sub> = Absorvância da hemoglobina total do padrão. (procedimento C)

### 2. Cálculo da concentração da amostra:

$$\% HbA_1 = (A_1/AT) \times F$$

%HbA<sub>1</sub> = Concentração da hemoglobina glicada da amostra

A<sub>1</sub> = Absorvância da hemoglobina glicada

A<sub>T</sub> = Absorvância da hemoglobina total

F = Fator

### Exemplo:

#### 1- Cálculo do Fator:

A<sub>TP</sub> = 0,56

%HbA<sub>1P</sub> = 8,4

A<sub>1P</sub> = 0,584

$$F = (A_{TP} \times \% HbA_{1P}) / A_{1P}$$

$$F = (0,56 \times 8,4) / 0,584$$

$$F = 8,05$$

## 2- Cálculo da Concentração da Amostra:

$A_1 = 0,485$

$A_T = 0,507$

$\%HbA_1 = (A_1/A_T) \times F$

$\%HbA_1 = (0,485/0,507) \times 8,05$

$\%HbA_1 = 7,7 \%$

## VALORES DE REFERÊNCIA:

**4,5% a 7,0%:** Pessoas com metabolismo saudável ou diabetes controlada.

**7,0% a 8,5%:** Tratamento inadequado ou diabetes subclínica com valor normal de glicose mas com teste de tolerância alterado.

**> 8,5%:** Diabéticos sem controle.

## COMPARAÇÃO DE MÉTODOS:

O teste da Hemoglobina Glicada foi comparado com um método de referência HPLC e com um método de microcoluna comercialmente disponíveis. Para esta comparação amostras de sangue humano não tratado foram utilizadas. Uma boa concordância foi encontrada entre todos os métodos.

## REPETIBILIDADE E REPRODUTIBILIDADE

Concentração %HbA <sub>1</sub>	Repetibilidade		Reprodutibilidade	
	DP (% HbA <sub>1</sub> )	% CV	DP (% HbA <sub>1</sub> )	% CV
7,50	0,12	1,59	0,85	11,3
7,39	0,12	1,63	0,86	11,6
7,92	0,31	3,94	0,95	11,9
11,2	0,18	1,58	1,40	12,5
7,61	0,18	2,41	0,53	6,96
10,5	0,16	1,56	0,59	5,60

## INTERFERENTES

Substâncias interferentes foram adicionadas a uma amostra conhecida. Nenhuma interferência foi detectada até as seguintes concentrações:

Ácido Ascórbico	até 20 mg/dL
Bilirrubina	alta interferência
Glicose	até 500 mg/dL
Intralípidos	alta interferência

## LINEARIDADE

O teste mostra uma excelente linearidade entre 4,5 e 24% de HbA<sub>1</sub>.

## APRESENTAÇÃO DO KIT:

Cat. N°	Reagente	Volume	N° Teste
10657-20	RGT	20 x 2,5 mL	20
	LYSE	1 x 10,0 mL	
	STD	1 x 1,0 mL	
10657-100	RGT	100 x 2,5 mL	100
	LYSE	3 x 10,0 mL	
	STD	1 x 1,0 mL	

## DEPARTAMENTO DE SERVIÇOS ASSOCIADOS

Para esclarecimentos de dúvidas do consumidor quanto ao produto:

Telefone: **31 3067-6400** e-mail: [invitroms@invitro.com.br](mailto:invitroms@invitro.com.br)

N.º DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO, DATA DE VALIDADE VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

## BIBLIOGRAFIA:

1. Gorka G., Labor-Medizin, 1, 30-31 (1985).
2. James T. M. et al., Clin. Biochem. 14, 25-27 (1981).
3. Nuttall, F. Q., Diabetes Care 21, 1475-1480 (1998).

**Fabricante:** In Vitro Diagnóstica Ltda. Rua Cromita, 278, Distrito Industrial, Itabira/MG. CEP: 35903-053.

**Regularizado por:** In Vitro Diagnóstica Ltda. Rua Cromita, 278, Distrito Industrial, Itabira/MG. CEP: 35903-053. CNPJ: 42.837.716/0001-98.

Telefone: 31 3067-6400 e-mail: [invitroms@invitro.com.br](mailto:invitroms@invitro.com.br)

Resp. Téc.: Patrícia C. C. Vilela – CRF 4463

ANVISA: 10303460348 Classe de Risco: II

## SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NOS RÓTULOS DO PRODUTO



O conteúdo é suficiente para <n> testes



Data limite de utilização



Limite de temperatura (conservar a)



Número do Catálogo



Consultar Instrução de Uso



Número do lote



Produto Diagnóstico In Vitro



Data de Fabricação