

HbA1c WH Turbiquest

Instruções de Uso

Ref.: **395**

ANVISA 10009010385

Finalidade . Sistema imunoturbidimétrico para determinação quantitativa da Hemoglobina A1c (HbA1c) em amostras de sangue total e papa de hemácias.

Uso profissional.

[Somente para diagnóstico *in vitro*]

Princípio . Todas as hemoglobinas presentes na amostra se ligam à superfície das partículas de látex (Reagente 1). A adição de anticorpo monoclonal de camundongo anti-HbA1c humana (Reagente 2) promove a formação do complexo látex-HbA1c-anticorpo anti-HbA1c. A intensidade da aglutinação, medida em absorbância, é proporcional à quantidade de HbA1c presente na amostra. O valor de HbA1c é obtido por meio de curva de calibração construída com cinco níveis de concentração.

Características do sistema . O produto HbA1c é um método imunoturbidimétrico facilmente aplicável a analisadores automáticos bioquímicos capazes de medir absorbâncias entre 600 e 660 a uma temperatura de 37 °C. A medição é realizada diretamente, sem a necessidade da determinação da hemoglobina total utilizando somente um canal do analisador automático. Além disso, os resultados são obtidos através de curva de calibração, dispensando a realização de cálculos adicionais. Todas estas características agregam maior praticidade e segurança para o usuário, além de propiciar maior agilidade e rapidez ao processo analítico.

O método é certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), com rastreabilidade ao método de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) utilizado no estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT).³

Metodologia . Imunoturbidimetria.

Reagentes

1. [R1] - Reagente 1 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Pronto para uso.

Contém tampão ≤ 30 mmol/L partículas de látex e conservante $\leq 0,03\%$.

2. [R2] - Reagente 2 - Armazenar entre 2 - 8 °C. Pronto para uso.

Contém tampão ≤ 30 mmol/L, anticorpo monoclonal de camundongo anti-HbA1c humana $\leq 0,3$ mg/mL, estabilizante $\leq 10\%$ e conservante $\leq 0,03\%$.

Os reagentes são estáveis por 28 dias após abertos, desde que mantidos sob a temperatura de 2 a 8 °C, bem vedados e protegidos da luz, quando não houver contaminação química ou microbiana.¹

Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo.¹

Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.¹

Precauções e cuidados especiais

HbA1c WH Turbiquest - Ref. 395 é destinada somente para uso diagnóstico *in vitro*.

Não deve ser utilizado lotes diferentes do HbA1c WH Turbiquest - Ref. 395.

O reagente 1 não deve passar por congelamento ou secagem porque pode gerar aglutinação não específica.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Caso haja contato acidental com os olhos, boca, ou pele deve-se primeiramente lavar o local com água em abundância e, caso seja necessário contatar um médico.

Material necessário e não fornecido

1. Analisador capaz de medir com exatidão a absorbância entre 600 e 660 nm.
2. Calibrador HbA1c WH - Ref. 396.
3. Micropipetas.
4. Agitador de amostras.

Sugere-se o uso do controle Glicotrol - Ref. 303 da Labtest.

Amostra

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para colheita, preparação e armazenamento da amostra. Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

Utilizar amostras de sangue total colhido em EDTA ou Fluoreto de sódio¹. O analito é estável por 14 dias entre 2 e 8 °C¹. Não usar amostras com sinais de contaminação e não congelar a amostra.¹

Como nenhum teste conhecido pode assegurar que amostras de sangue não transmitem infecções, todas elas devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las deve-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.

Interferências

As concentrações de bilirrubina livre até 20 mg/dL, bilirrubina conjugada até 20 mg/dL; ácido ascórbico até 100 mg/dL e lipídios até 1140 FTU não produzem interferências significativas.

Procedimento

Recomenda-se a leitura das observações 1 e 2.

Realizar leitura em comprimentos de onda entre 600 e 660 nm a 37 °C. Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos.

Preparo da amostra . Preparar um hemolisado para cada amostra, conforme indicado abaixo:

Sangue total

1. Em um tubo pipetar 500 µL de água destilada ou deionizada e 10 µL da amostra de sangue total homogeneizada;
2. Agitar fortemente por 10 segundos e esperar 5 minutos, ou até que a hemólise completa seja evidente;
3. Primeira Reação: Adicionar 150 µL de R-1 látex em 6 µL da amostra hemolisada ou do Calibrador HbA1c WH - Ref. 396, homogeneizar e incubar a 37 °C por 5 minutos;
4. Segunda Reação: Adicionar 50 µL do R-2 ao tubo. Em seguida, homogeneizar e incubar por 5 minutos a 37 °C;
5. Medir a absorvância (turbidez) de cada amostra de teste e seus respectivos calibradores.

Papa de hemácias

1. Centrifugar o sangue total por 5 minutos a 2.000 rpm
2. Em um tubo pipetar 1000 µL de água destilada ou deionizada e 10 µL de papa de hemácias;
3. Agitar fortemente por 10 segundos e esperar 5 minutos, ou até que a hemólise completa seja evidente;
4. Primeira Reação: Adicionar 150 µL de R-1 látex em 6 µL da amostra hemolisada ou do Calibrador HbA1c WH - Ref. 396, homogeneizar e incubar a 37 °C por 5 minutos;
5. Segunda Reação: Adicionar 50 µL do R-2 ao tubo. Em seguida, homogeneizar e incubar por 5 minutos a 37 °C;

6. Medir a absorvância (turbidez) de cada amostra de teste e seus respectivos calibradores.

Parâmetros para Analisadores Automáticos

Parâmetros	Aplicação Birreagente
Tipo de Reação	Ponto final
λ de Onda primário	600 a 660 nm
λ de Onda secundário	800 nm
Volume de Amostra**	6 µL
Volume de Reagente 1**	150 µL
Incubações	A 37 °C por 5 minutos
Volume de Reagente 2**	50 µL
Calibração	5 pontos (Calibra HbA1c Turbiquet - Ref. 396)
Modelo da Calibração*	Não linear (Spline, Exponencial)
Absorvância 1	Entre 60 e 90 segundos após adição de Reagente 2
Absorvância 2	300 segundos após a adição do Reagente 2

*A definição de modelo de calibração deve ser adequada a cada modelo de equipamento. Em caso de dúvidas, entre em contato com o Serviço de Apoio ao Cliente Labtest.

**Os volumes da amostra e dos reagentes podem ser modificados proporcionalmente sem prejuízo para o desempenho do teste e o procedimento de cálculos se mantém inalterado. Em caso de redução dos volumes é fundamental que se observe o volume mínimo necessário para a leitura fotométrica.

Calibração . O método é certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), com rastreabilidade ao método de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) utilizado no estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT).²

Calibração de 5 pontos . Utilizar o produto Calibra HbA1c - Ref. 396, conforme recomendado a seguir:

Ponto 0: utilizar o Calibra 0 HbA1c WH - Ref. 396.0.

Ponto 1: utilizar o Calibra 1: HbA1c WH - Ref. 396.1.

Ponto 2: utilizar o Calibra 2: HbA1c WH - Ref. 396.2.

Ponto 3: utilizar o Calibra 3 HbA1c WH - Ref. 396.3.

Ponto 4: utilizar o Calibra 4 HbA1c WH - Ref. 396.4.

Intervalo de calibração

Quando o controle interno da qualidade indicar.

Quando utilizar um novo lote de reagentes.

Intervalo operacional . O intervalo operacional de medição é de 2,5 % a ~16,5 %. Resultado superior a 16,5 % pode ser reportado como maior que 16,5 % ou diluir a amostra em 1:3 utilizando como diluente outra amostra com concentração de HbA1c menor que 6 % ou o Calibra 1 HbA1c - Ref. 396.1 (4,5 %) (50 mL do hemolisado da amostra com concentração elevada e 100 mL do hemolisado da amostra diluente).

Determinar a concentração da HbA1c na mistura e calcular a concentração de HbA1c da amostra elevada conforme a seguinte equação:

Exemplo

HbA1c (%) = [HbA1c(%) na mistura X n] - [HbA1c(%) na amostra/ calibrador diluente X (n - 1)]

n = fator de diluição da amostra

HbA1c (%) = [8,3 X 3] - [4,6 X (3 - 1)] = 24,9 - 9,2 = 15,7%

Controle interno da qualidade . O laboratório deve manter um programa de controle interno da qualidade que defina claramente os regulamentos aplicáveis, objetivos, procedimentos, critérios para especificações da qualidade e limites de tolerância, ações corretivas e registro das atividades. Ao mesmo tempo deve-se manter um sistema definido para monitorar a variabilidade analítica que ocorre em todo o sistema de medição.

Materiais de controle devem ser utilizados para monitorar a imprecisão da medição e desvios da calibração. Sugere-se que as especificações para o coeficiente de variação e o erro total sejam baseadas nos componentes da variação biológica (VB)³ ou nas especificações propostas pelo NGSP.⁴

Valores esperados . Para indivíduos não diabéticos: 4,6 % a 6,2 % (NGSP).⁴

Para indivíduos diabéticos em controle glicêmico:

Crianças (1 mês a 6 anos)	< 8,0 %
Adolescentes	< 7,5 %
Adultos	< 7,0 %
Idosos	< 8,0 %

Os valores para indivíduos diabéticos foram determinados a partir dos resultados de estudos clínicos prospectivos e randomizados e se correlacionam com risco significativamente menor de desenvolvimento de complicações do Diabetes Mellitus.^{2,5}

Características do desempenho⁹

Comparação de métodos . O método proposto foi comparado com o método HPLC, utilizado amostras de sangue total colhidas em EDTA, sendo obtidos os seguintes resultados:

	Método Comparativo	Método Labtest
Número de amostras	80	80
Equação da regressão	Método Labtest (%) = 1,0080X Comparativo - 0,0247	
Coefficiente de correlação	0,993	

Utilizando a equação de regressão, o erro sistemático (bias) estimado é igual a 0,4% e 0,7% para amostras contendo 5,38% e 13,38 % de HbA1c. O estudo comparativo realizado atende a especificação mínima de $\leq 2,2\%$ para erro sistemático, conforme VB.³

Estudos de precisão . Os estudos de precisão foram realizados utilizando três amostras com concentrações iguais a 5,38 %, 9,33 % e 13,38%:

Repetitividade - imprecisão intraensaio

	N	MÉDIA (%)	DP	CV (%)
Amostra 1	20	5,38	0,01	0,24
Amostra 2	20	9,33	0,03	0,29
Amostra 3	20	13,38	0,10	0,72

Reprodutibilidade - imprecisão total

	N	MÉDIA (%)	DP	CV (%)
Amostra 1	20	5,38	0,02	0,30
Amostra 2	20	9,35	0,035	0,38
Amostra 3	20	13,39	0,119	0,89

A imprecisão encontrada atende a especificação mínima para imprecisão total baseada nos componentes da VB⁵ que é $\leq 1,4\%$.

Sensibilidade metodológica ou analítica . Limite de detecção: 2,5 %. Foi obtido a partir do cálculo do coeficiente de variação (CV) de 10 medições de uma amostra com concentração de HbA1c igual a 2,5 %, cujo resultado foi menor que 1,4 %.

Significado clínico . A hemoglobina humana do adulto é habitualmente constituída de HbA (97 %), HbA2 (2,5%) e HbF (0,5 %). A análise cromatográfica da HbA identifica uma gama de hemoglobinas que migram mais rapidamente do que a HbA0: HbA1a, HbA1b e HbA1c, que foram inicialmente denominadas hemoglobinas rápidas.⁶ Posteriormente, observou-se que estas hemoglobinas rápidas estão ligadas a alguns açúcares, sendo coletivamente chamadas hemoglobinas glicadas ou HbA1. A HbA1c é a principal fração e corresponde a 80 % da HbA1. A HbA1c é formada pela ligação não enzimática da glicose com a porção N-terminal valina (glicação) em cada cadeia beta da HbA, formando uma base de Schiff instável (pré-HbA1c, HbA1c lábil ou instável) que sofre um rearranjo irreversível (rearranjo de Amadori), formando uma cetamina estável.⁵

A formação de hemoglobina glicada é contínua e irreversível, e seu nível sanguíneo depende da sobrevivência da hemácia (cerca de 120 dias) e da concentração de glicose no sangue, já que a hemácia é livremente permeável à glicose. A HbA1c corresponde a cerca de 4 % a 6 % da HbA total em indivíduos não diabéticos, podendo chegar a 20% em indivíduos diabéticos mal controlados.⁶ A quantidade de HbA1c é diretamente proporcional à concentração média de glicose no sangue durante as oito a 12 semanas precedentes e fornece um critério adicional para a avaliação do controle glicêmico.^{2,6,7}

A dosagem de HbA1c é utilizada para o diagnóstico de diabetes, assim como a taxa de glicose plasmática, desde que o método de HbA1c seja certificado *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e rastreável pelo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT)⁸. Além disso, pode ser adotado no controle glicêmico de médio e longo prazo, definição de alvos específicos de tratamento, limites de decisão e complicações crônicas do diabetes.^{3,6}

Conforme o Posicionamento Oficial - 2017/2018 do Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada⁵, a determinação da HbA1c deve ser realizada pelo menos duas vezes ao ano para todos os pacientes diabéticos e quatro vezes por ano (a cada três

meses) para pacientes que se submetem a alteração do esquema terapêutico ou que não estejam atingindo os objetivos recomendados com o tratamento vigente.⁵

Os níveis de HbA1c não retornam aos valores esperados imediatamente após a redução e estabilização da concentração sanguínea de glicose. O tempo necessário é de aproximadamente oito a 10 semanas.⁷

Pacientes com doença hemolítica ou outras condições que reduzem a sobrevida das hemácias (estados hemorrágicos) podem apresentar resultados falsamente diminuídos de HbA1c.⁵

Anemia por deficiência de ferro, vitamina B12 ou ácido fólico pode levar a resultados falsamente aumentados de HbA1c por aumentar a sobrevida das hemácias.^{5,7}

A determinação da HbA1c não tem valor nos pacientes que apresentam hemoglobinopatias homocigóticas devido à ausência de HbA. Nestas situações sugere-se realizar a determinação da frutossamina para avaliação do controle glicêmico.^{7,8}

A dosagem de HbA1c pode ser utilizada para diagnosticar diabetes mellitus de acordo com a Associação Americana de Diabetes.^{7,9}

Observações

1. O laboratório clínico tem como objetivo fornecer resultados exatos e precisos. A utilização de água de qualidade inadequada é uma causa potencial de erros analíticos. A água utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação. Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxague final da vidraria, a água deve ter resistividade ≥ 1 megaohm.cm ou condutividade ≤ 1 microsiemens/cm e concentração de silicatos $< 0,1$ mg/L.

Quando a coluna deionizadora está com sua capacidade saturada ocorre liberação de vários íons, silicatos e substâncias com grande poder de oxidação ou redução que deterioram os reagentes em poucos dias ou mesmo horas, alterando os resultados de modo imprevisível. Assim, é fundamental estabelecer um programa de controle da qualidade da água.

2. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar: Young DS. *Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests*, 3ª edição, Washington: AACC Press, 1990.

Referências

1. Labtest: Dados de Arquivo.
2. DCCT Research Group. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). N Eng J Med 1993; 329: 977-986.
3. Westgard QC – Minimum Specifications From Biological Variation Database. Disponível em: <<https://www.westgard.com/minimum-biodatabase1.htm>> (acesso em 03/2023).

4. Summary of NGSP Certification Categories. Disponível em: <http://www.ngsp.org/news.asp> (acesso em 05/2022).

5. Posicionamento Oficial 2017/2018 - SBD, SBPC, SBEM e FENAD - Atualização sobre Hemoglobina Glicada (A1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. Disponível em: <<http://www.sbp.org.br/publicacao-legislacao/publicacoes-tecnicas/bibliotecasbp.org.br>> (acesso em 05/2022).

6. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Philadelphia: Saunders Company 1994; 980-986.

7. Randie R.L. and Sacks D.B.; HbA1c: how do we measure it and what does it mean?; Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity; 2009;16: 113-118.

8. Weykamp C.; HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects; Clinical Chemistry, 2013.

9. American Diabetes Association. Diabetes care 2019, 42 (S1-S2) American Diabetes Association. Diabetes care 2019, 42 (S1-S2).

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
HbA1c WH Turbiquest	395-1/40	R1 1 X 30 mL
		R2 1 X 10 mL

Para informações sobre outras apresentações comerciais consulte o site www.labtest.com.br ou entre em contato com o SAC.

Informações ao consumidor

[Termos e Condições de Garantia]

A Labtest Diagnóstica garante o desempenho deste produto, dentro das especificações, até a data de expiração indicada nos rótulos, desde que os cuidados de utilização e armazenamento indicados nos rótulos e nestas instruções sejam seguidos corretamente.

Labtest Diagnóstica S.A.

CNPJ: 16.516.296/0001-38
Av. Paulo Ferreira da Costa, 600 - Vista Alegre - CEP: 33240-152
Lagoa Santa, Minas Gerais - Brasil - www.labtest.com.br

Serviço de Apoio ao Cliente | 0800 031 3411 (Ligação Gratuita)
e-mail: sac@labtest.com.br

Edição: Novembro, 2022
Revisão: Maio, 2023
Ref.: 270723(04)

Copyright by Labtest Diagnóstica S.A.
Reprodução sob prévia autorização

Símbolos utilizados com produtos diagnósticos in vitro

Símbolos usados con productos diagnósticos in vitro

Symbols used with IVD devices

	Conteúdo suficiente para < n > testes Contenido suficiente para < n > tests Contains sufficient for < n > tests		Risco biológico Riesgo biológico Biological risk
	Data limite de utilização (aaaa-mm-dd ou mm/aaaa) Estable hasta (aaaa-mm-dd o mm/aaaa) Use by (yyyy-mm-dd or mm/yyyy)		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Tóxico Tóxico Poison
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Instalar até Instalar hasta Install before		Fabricado em Elaborado en Manufactured on
	Produto de uso único Producto de un solo uso Single use product		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Período após abertura Período post-abertura Period after-opening
	Tóxico para os organismos aquáticos Tóxico para los organismos acuáticos Toxic for aquatic organisms		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Gases/líquidos comburentes Gases/líquidos oxidantes Oxidizing gases/liquids		Reagente Reactivo Reagent
	Atenção Atención Attention		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Material Calibrador/Padrão Material Calibrador/Estándar Calibrator/Standard Material		Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Controle negativo Control negativo Negative control
	Reagente Reactivo Reagent		Controle positivo Control positivo Positive control
	Reagente contendo micropartículas Reactivo con micropartículas Reagent with microparticles		

Ref.: 190523 |