

FRUTOSAMINA

Instruções de Uso

Ref.: 97

ANVISA 10009010049

Finalidade . Sistema para determinação da frutossamina por método cinético de tempo fixo em amostras de soro.

Uso profissional.

[Somente para uso diagnóstico in vitro.]

Princípio . A glicose se liga aos grupamentos amino das proteínas formando uma base de Schiff (aldimina), que após um rearranjo molecular, transforma-se em uma cetoamina estável denominada genericamente frutossamina¹.

Em pH alcalino a frutossamina é convertida à forma enólica, que reduz o azul de nitrotetrazólio a um "formazan púrpura". A medida da diferença de absorvância, após incubação aos 10 e 15 minutos, é proporcional à concentração de frutossamina na amostra². A calibração do sistema é realizada com calibrador de matriz bovina, calibrado com polilisina glicada. Os resultados são expressos em micromoles/litro ($\mu\text{mol/L}$).

Características do sistema . A determinação da frutossamina, formada pela ligação da glicose com as proteínas plasmáticas, baseia-se na sua capacidade redutora em meio alcalino. Outros agentes redutores podem habitualmente estar presentes nas amostras de soro causando interferência no ensaio. No sistema Frutossamina, a Labtest incorporou ao Reagente 1 uricase e um agente clarificador à base de detergentes, com o objetivo de minimizar as interferências de ácido úrico e lipemia.

A calibração do ensaio com calibrador de albumina glicada in vitro, calibrado com polilisina glicada contendo glicose marcada com ¹⁴C, faz com que pequenas variações das condições do teste não produzam interferências importantes³. Os benefícios deste sistema são resultados mais consistentes, com maior reprodutibilidade e exatidão.

O sistema utiliza um Reagente de Trabalho estável por 30 dias, quando armazenado entre 2 e 8 °C, permitindo também preparar o volume de Reagente de Trabalho necessário à uma única medição da concentração da frutossamina.

O método é facilmente aplicável à analisadores automáticos capazes de medir, em modo cinético, diferenças de absorvâncias em 530 nm⁵.

Metodologia . Redução do NBT.

Reagentes

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

Contém tampão 83 mmol/L pH 7,3; azul de nitrotetrazólio (NBT) 967 $\mu\text{mol/L}$; uricase ≥ 5000 U/L; azida sódica 14,6 mmol/L; surfactantes e estabilizadores.

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

Após o manuseio armazenar bem vedado. Contém tampão 625 mmol/L pH 10,4 e azida sódica 14,6 mmol/L.

3. [CAL] - Calibrador - Concentração no rótulo do frasco. Armazenar entre 2 - 8 °C.

Reagente liofilizado. Contém albumina bovina glicada; tampão 50 mmol/L, pH 7,4 e azida sódica 14,6 mmol/L.

Estabilidade . Os reagentes não abertos, quando armazenados nas condições indicadas, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Durante o manuseio, os reagentes estão sujeitos a contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

Precauções e cuidados especiais

O controle da temperatura e do tempo de incubação durante a realização do ensaio deve ser rigoroso. A diferença de 1°C na temperatura introduz erro de 5%, enquanto que 1 minuto de diferença durante a medida do ΔA produz erro de 20%.

Os cuidados habituais de segurança devem ser aplicados na manipulação dos reagentes, os quais não devem ser pipetados com a boca.

Os reagentes contêm azida sódica que é tóxica. Deve-se tomar cuidado para evitar a ingestão e no caso de contato com os olhos, deve-se lavar imediatamente com grande quantidade de água e procurar auxílio médico. A azida pode formar compostos altamente explosivos com tubulações de chumbo e cobre. Portanto, utilizar grandes volumes de água para descartar os reagentes.

Material necessário e não fornecido

1. Banho-maria mantido à temperatura constante (37 °C).
2. Fotômetro capaz de medir com exatidão absorvância entre 510 e 550 nm.
3. Pipetas para medir amostras e reagentes.
4. Cronômetro.

Amostra

Usar soro ou plasma (Heparina ou EDTA) sem hemólise. O analito é estável 7 dias entre 2 - 8 °C e 3 meses a 20 °C negativos.

Deve ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra.

Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.

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, devem-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

Concentrações de hemoglobina acima de 100 mg/dL produzem interferência negativa significativa.

Concentrações de bilirrubina até 8,0 mg/dL e glicose até 1000 mg/dL não produzem interferências significativas. Concentrações de ácido ascórbico acima de 3,0 mg/dL produzem interferência negativa significativa.

Concentrações de triglicérides até 1000 mg/dL e de ácido úrico até 14,0 mg/dL não interferem significativamente.

Para avaliar a concentração aproximada da hemoglobina em uma amostra hemolisada pode-se proceder do seguinte modo: diluir 0,05 mL da amostra em 2,0 mL de NaCl 150 mmol/L (0,85%) e medir a absorbância em 405 ou 415 nm acertando o zero com água deionizada ou destilada.

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{405} \times 601$$

$$\text{Hemoglobina (mg/dL)} \cong \text{Absorbância}_{415} \times 467$$

Preparo dos reagentes

Reagente de Trabalho . O conjunto de um frasco de Reagente 1 e um frasco de Reagente 2 permite preparar o Reagente de Trabalho.

Transferir o conteúdo de um frasco do Reagente 2 para um frasco do Reagente 1 e homogeneizar por inversão. Identificar o frasco do Reagente de Trabalho para evitar confusão com outros frascos do Reagente 1 e anotar a data de expiração.

O Reagente de Trabalho pode ser utilizado por 30 dias se armazenado entre 2 - 8 °C, quando não houver contaminação química ou microbiana (ver item Calibração).

O Reagente de Trabalho é uma solução alcalina (pH=10,3) e, como tal, é instável quando exposto à atmosfera ambiente. Portanto este reagente pode ter seu desempenho comprometido, de modo imprevisível, se mantido aberto, seja no analisador automático, seja na bancada. Para preservar o desempenho, o reagente de trabalho somente deve permanecer aberto o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado. Armazenar bem vedado.

Opcionalmente pode-se preparar menor volume do Reagente de Trabalho utilizando a proporção de 3 (três) volumes do Reagente 1 e 2 (dois) volumes do Reagente 2. Exemplo: para preparar 10 mL de Reagente de Trabalho deve-se misturar 6 mL do Reagente 1 e 4mL do Reagente 2.

O Reagente de Trabalho contém tampão fosfato 50 mmol/L, tampão carbonato 250 mmol/L, azul de nitrotetrazólio 580 µmol/L, uricase ≥3000 U/L, detergentes e estabilizadores em pH 10,3.

Calibrador . Dissolver o conteúdo do frasco de Calibrador (Nº 3) com 2,0 mL de água destilada ou deionizada. Esperar 30 minutos. Misturar por inversão. Homogeneizar antes de utilizar. Estável 60 dias entre 2 - 8 °C e 6 meses a 10 °C negativos.

Procedimento

Este procedimento não se aplica aos analisadores semiautomáticos que utilizam unicamente cubeta de fluxo. Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semiautomáticos.

Vide **observações 1, 2 e 3**.

Rotular 2 cubetas do fotômetro como “Teste” e “Calibrador” e proceder como a seguir:

	Teste	Calibrador
Reagente de Trabalho	1,0 mL	1,0 mL

Incubar a 37 °C durante 2 minutos.

Amostra	0,050 mL	-----
Calibrador	-----	0,050 mL

Misturar bem e incubar a 37 °C. Após exatamente 10 minutos (cronometrados) determinar as absorbâncias (A_1) do teste e do calibrador em 530 nm (510 - 550), acertando o zero com água destilada ou deionizada. Continuar a incubação a 37°C por mais exatamente 5 minutos (cronometrados) e determinar as absorbâncias (A_2) do teste e do calibrador em 530 nm (510 - 550), acertando o zero com água destilada.

O procedimento sugerido para a medição é adequado para fotômetros cujo volume mínimo de solução para leitura é igual ou menor que 1,0 mL. Deve ser feita uma verificação da necessidade de ajuste do volume para o fotômetro utilizado. Os volumes de amostra e reagente 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. Volumes da amostra menores que 0,01mL são críticos em aplicações manuais e devem ser usados com cautela porque aumentam a imprecisão da medição.

Cálculos . Ver linearidade.

Calcular as diferenças de absorbâncias para o Teste e o Calibrador:
 $\Delta A = A_2 - A_1$

Frutosamina (µmol/L) = (ΔA Teste / ΔA Calibrador) x Conc. Calibrador

Exemplo

Absorbância do Teste

$$A_1 = 0,299 \quad A_2 = 0,382 \quad \Delta A \text{ Teste} = 0,382 - 0,299 = 0,083$$

Absorbância do Calibrador

$$A_1 = 0,394 \quad A_2 = 0,505 \quad \Delta A \text{ Calibrador} = 0,505 - 0,394 = 0,111$$

Concentração do Calibrador em uso = 359 $\mu\text{mol/L}$

$$\text{Frutosamina } (\mu\text{mol/L}) = (0,083 / 0,111) \times 359 = 268 \mu\text{mol/L}$$

Devido a grande reprodutibilidade que pode ser obtida com a metodologia, pode-se utilizar o método do fator.

$$\text{Fator de Calibração} = \text{Conc. Calibrador} / \Delta A \text{ Calibrador}$$

$$\text{Frutosamina } (\mu\text{mol/L}) = \Delta A \text{ Teste} \times \text{Fator}$$

Exemplo

Concentração do Calibrador em uso = 359 $\mu\text{mol/L}$

$$\text{Fator} = 359 / 0,111 = 3234$$

$$\text{Frutosamina } (\mu\text{mol/L}) = 0,083 \times 3234 = 268 \mu\text{mol/L}$$

Calibração

A concentração do calibrador é rastreável a um padrão protéico calibrado com amostra de polilisina glicada com glicose marcada com ^{14}C .

Calibrações manuais

Calibração de 2 pontos.

Calibrador incluso (Ref.: 97.3).

Intervalo de calibrações

Deve-se calibrar o sistema semanalmente e nas seguintes situações:

Quando o controle interno da qualidade indicar;

Quando utilizar novo lote de reagentes;

Quando utilizar novo Reagente de Trabalho.

Sistemas automáticos

Calibração de 2 pontos;

Branco de reagentes: água deionizada ou NaCl 150 mmol/L;

Calibrador incluso (Ref.: 97.3).

Intervalo de calibrações

Deve-se calibrar o sistema semanalmente e nas seguintes situações:

Quando o controle interno da qualidade indicar;

Quando utilizar novo lote de reagentes;

Quando utilizar novo Reagente de Trabalho.

Linearidade - intervalo operacional

O resultado da medição é linear entre 20 $\mu\text{mol/L}$ e 800 $\mu\text{mol/L}$. Para valores maiores que 800 $\mu\text{mol/L}$, diluir a amostra com NaCl 150 mmol/L (0,85%), realizar nova medição e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

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. Materiais de controle devem ser utilizados para avaliar a imprecisão 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)^{7,8,9}.

Intervalo de referência . Estes valores devem ser usados apenas como orientação. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça, na população atendida, sua própria faixa de valores de referência.

Para indivíduos não diabéticos (todas as idades): 205 a 285 $\mu\text{mol/L}$ ³.

Características do desempenho¹⁰

Exatidão . Em duas amostras com concentrações de frutoseminalina iguais a 175 e 253 $\mu\text{mol/L}$ foi adicionado quantidade conhecida do analito obtendo-se recuperação média de 102%. O erro sistemático proporcional médio obtido foi igual a 3,5 $\mu\text{mol/L}$ ou 2,0%.

Especificidade . O método proposto foi comparado com um método similar utilizando 40 amostras com valores situados entre 33 e 775 $\mu\text{mol/L}$. A comparação resultou na equação da regressão $y = 1,029x - 1,346$ e um coeficiente de correlação (r) igual a 0,998. É evidente uma correlação extremamente positiva entre os dois métodos, observando-se um erro sistemático de 2,19%, 2,43% e 2,53%, nos níveis de decisão iguais a 184 $\mu\text{mol/L}$, 272 $\mu\text{mol/L}$ e 347 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente.

Como as amostras foram selecionadas aleatoriamente em pacientes de ambulatório e pacientes hospitalizados, pode-se inferir que o método tem uma especificidade metodológica adequada.

Repetitividade - Imprecisão intraensaio

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	302	2,51	0,83
Amostra 2	20	388	3,24	0,84

Reprodutibilidade - Imprecisão Total

	N	Média	DP	CV (%)
Amostra 1	20	302	7,58	2,50
Amostra 2	20	388	8,21	2,12

Sensibilidade metodológica . Uma amostra de NaCl 150 mmol/L (0,85%) foi utilizada para calcular o limite de detecção do ensaio tendo sido encontrado um valor igual a 5,0 μ mol/L, equivalente à média de 20 ensaios mais dois desvios padrão. Verificou-se que o limite de detecção fotométrica (cubeta com 1,0 cm de espessura de solução) é de 3,2 μ mol/L, correspondendo a uma absorvância igual a 0,001.

Efeitos da diluição da matriz . Uma amostra com valor igual a 658 μ mol/L foi utilizada para avaliar a resposta do sistema às diluições da matriz com NaCl 150 mmol/L (0,85%). Usando diversos fatores de diluição foi encontrada recuperação média de 101%.

Significado clínico . Frutosamina é o nome genérico dado a todas as proteínas glicadas, das quais a maior parcela é devida à albumina, que se constitui na maior massa protéica plasmática depois da hemoglobina.

Assim como a formação da hemoglobina glicada é decorrente de uma modificação não enzimática, dependente dos valores de glicemia, o mesmo ocorre com a glicosilação de outras proteínas plasmáticas².

A meia vida das proteínas varia entre 1 a 3 semanas, ao contrário da hemoglobina cuja meia vida é de 120 dias. Portanto, é de se esperar que, enquanto o valor da hemoglobina glicada reflete o controle de glicemia nos 2 meses anteriores ao teste, a proteína glicada espelha as concentrações de glicose plasmática nos 20 dias anteriores. Assim, a frutosamina está elevada em todos os casos de diabetes sob controle metabólico inadequado.

Quando se observa perda do controle glicêmico, a resposta da frutosamina, com elevação de valores, ocorre praticamente concomitante a hiperglicemia, retornando entretanto aos valores de referência, 3 semanas após a resposta ao tratamento.

O teste não sofre interferências de medicamentos, alimentação, glicemia do momento e não se observa diferença significativa entre homens e mulheres.

Valores diminuídos têm sido observados em pacientes com perdas elevadas de albumina ou em doenças que aumentam o catabolismo protéico.

O teste não deve ser usado para rastrear tolerância prejudicada à glicose, devido à sua pequena sensibilidade em relação ao teste oral de tolerância à glicose.

Observações

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

2. 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 deionizada ou destilada utilizada no laboratório deve ter a qualidade adequada a cada aplicação.

Assim, para preparar reagentes, usar nas medições e para uso no enxágue final da vidraria, 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 produção de água alcalina com 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.

3. Para uma revisão das fontes fisiopatológicas e medicamentosas de interferência nos resultados e na metodologia sugere-se consultar: www.fxol.org/

Referências

1. Baker JR, Metcalf PA, Johnson RN, Newman D, Rietz P. Clin Chem 1985;31:1550-1554.
2. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Clin Chim Acta 1983; 127:87-95.
3. Kruse-Jarres JD, Jarausch J, Lehmann P, Vogt BW, Rietz P. Lab Med 1989; 13:245-253.
4. Lim YS, Staley MJ. Clin Chem 1986;32:403-404.
5. Lloyd D, Marples J. Clin Chem 1984;30:1686-1688.
6. Schleicher ED, Vogt BW. Clin Chem 1990; 36:136-139.
7. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR, Groth T. Clin Chem 1981;27:493-501.
8. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Base de Datos de Variación Biológica. Disponível em: <<http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170>> (acesso em 04/2006).
9. Basques JC. Especificações da Qualidade Analítica. Labtest Diagnóstica 2005.
10. Labtest: Dados de Arquivo.

Apresentação

Produto	Referência	Conteúdo
Frutosamina	97-6/15	RI 1 6 X 9 mL
		RI 2 6 X 6 mL
		CAL 1 X 2 mL
Frutosamina Labmax 560/400	97-4/15	RI 1 4 X 9 mL
		RI 2 4 X 6 mL
		CAL 1 X 2 mL

Estão disponíveis aplicações para sistemas automáticos e semiautomáticos.

O número de testes em aplicações automáticas depende dos parâmetros de programação.

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 34 11 (Ligação Gratuita)

e-mail: sac@labtest.com.br

Edição: Maio, 1995

Revisão: Julho, 2017

Ref.: 080422(02)

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)		Marca CE Marcado CE CE Mark
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Tóxico Tóxico Poison
	Material Calibrador Material Calibrador Calibrator Material		Reagente Reactivo Reagent
	Limite de temperatura (conservar a) Temperatura limite (conservar a) Temperature limitation (store at)		Fabricado por Elaborado por Manufactured by
	Representante Autorizado na Comunidade Europeia Representante autorizado en la Comunidad Europea Authorized Representative in the European Community		Número do lote Denominación de lote Batch code
	Consultar instruções de uso Consultar instrucciones de uso Consult instructions for use		Controle Control Control
	Número do catálogo Número de catálogo Catalog Number		Controle negativo Control negativo Negative control
	Adições ou alterações significativas Cambios o suplementos significativos Significant additions or changes		Controle positivo Control positivo Positive control
	Produto diagnóstico in vitro Dispositivo de diagnóstico in vitro In vitro diagnostic device		Controle Control Control
	Liofilizado Liofilizado Lyophilized		Corrosivo Corrosivo Corrosive
	Período após abertura Período post-abertura Period after-opening		Uso veterinário Uso veterinario Veterinary use
	Instalar até Instalar hasta Install before		

Ref.: 140214 |