

Ricardo Marques Brugger

**CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS ACIMA DA LINEARIDADE PARA HbA1c
POR HPLC COM PERFIS HETEROZIGÓTICOS PARA HEMOGLOBINAS
VARIANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Pós-Graduação - "LATO SENSU "
em Hematologia Laboratorial e
Imunohematologia de Banco de Sangue

Orientadores: Dr. Paulo César Naum;
Dr. Flávio Augusto Naum

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
2018

CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS ACIMA DA LINEARIDADE PARA HbA1c POR HPLC COM PERFIS HETEROZIGÓTICOS PARA HEMOGLOBINAS VARIANTES

Autor: BRUGGER, Ricardo Marques

Resumo: A hemoglobina glicada (Hba1c), é um parâmetro importante no controle glicêmico de pacientes com diabetes mellitus. Estudos clínicos evidenciam que a melhora no controle glicêmico está fortemente associada com a diminuição no desenvolvimento e/ou progressão das complicações em diabetes mellitus tipos 1 e 2.

A medida exata e precisa da hemoglobina glicada é uma questão importante para os laboratórios clínicos, podendo afetar diretamente no tratamento e controle de pacientes quando obtidos resultados errôneos⁷.

Nesta revisão, serão abordados critérios de liberação dos resultados que estiverem acima da linearidade na metodologia por (HPLC), diferenciando pacientes com diabetes mellitus, daqueles com elevação para A1c devido o perfil heterozigoto para hemoglobinas variantes⁴. O método para hemoglobina glicada (Hba1c) podem ser diferentemente afetado por esta interferência⁸.

O laboratório deve estar seguro para estes fatores, a fim de se evitar conduta inadequada na interpretação clínica e liberação dos resultados⁶.

Abstract: Glycated hemoglobin (Hba1c) is an important parameter in the glycemic control of patients with diabetes mellitus. Clinical studies evidence that the improvement in glycemic control is strongly associated with a decrease in the development and / or progression of complications in type 1 and type 2 diabetes mellitus.

Accurate and precise measurement of glycated hemoglobin is an important issue for clinical laboratories, and may directly affect the treatment and control of patients when erroneous results are obtained⁷.

In this review, criteria for releasing results that are above linearity in the methodology by (HPLC) will be addressed, distinguishing patients with diabetes mellitus from those with elevation to A1c due to the heterozygote profile for variant hemoglobins⁴. The method for glycated hemoglobin (Hba1c) may be differentially affected by this interference⁸.

The laboratory should be safe for these factors, in order to avoid inappropriate behavior in clinical interpretation and release of the results⁶.

Palavras-chaves: Hemoglobina glicada, Diabetes mellitus, Hemoglobinas variantes, Cromatografia líquida de alta performance (HPLC), Perfil heterozigoto, Imunoturbidimetria.

1.0 INTRODUÇÃO

A hemoglobina glicada (HbA1c) corresponde a 80% da fração glicada de HbA1 e reflete o nível médio de glicose no sangue correspondente a cerca de 120 dias precedentes à sua dosagem¹. É utilizada para monitorar os níveis de glicose sanguínea a longo prazo em pacientes diagnosticados ou em investigação para diabetes mellitus².

A Imunoturbidimetria consiste na avaliação através da interação com anticorpos anti-HbA1c, formando assim complexos solúveis de antígeno-anti-HbA1c. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) é uma técnica baseada na separação das diferentes frações de hemoglobinas por troca iônica³.

O método por HPLC para detecção e quantificação da HbA1c é considerado preciso e referência entre os principais estudos da área, mas uma das dificuldades é com relação à sua dosagem em pacientes portadores de hemoglobinas variantes, nos quais resultados de A1C falsamente elevados ou diminuídos podem ser observados. Em contrapartida, a análise adequada dos cromatogramas permite a identificação dessas hemoglobinas e resultados mais criteriosos e enriquecidos do que na Imunoturbidimetria.

2.0 OBJETIVO

Padronizar os critérios de liberação para resultados obtidos acima da linearidade na metodologia de HPLC, diferenciando pacientes diagnosticados com diabetes mellitus daqueles com elevação para A1c devido ao perfil heterozigoto para hemoglobinas variantes.

3.0 MATERIAL E MÉTODO

Foram selecionadas 49 amostras com resultados superiores a 16% para HbA1C por HPLC. As concentrações obtidas foram comparadas com as metodologias de Imunoturbidimetria (TINA-QUANT), Eletroforese de Hemoglobina (ELFHB-HPLC) e glicemia em jejum.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No decorrer da validação foram observados 19 casos com valores obtidos por HPLC dentro da linearidade estabelecida pelo método (19,0%) reproduzindo nas diversas metodologias (Figura 1). Nos 14 resultados entre 19%-23%, em 12 foi observada compatibilidade entre as metodologias (Figura 2). Em contrapartida, em 2 resultados observa-se a reprodução do índice de P2 (ELFHB) correlacionando com A1C por HPLC, mas discordantes da concentração consideravelmente inferior obtida por imunoturbidimetria, sendo um indicativo da presença de hemoglobina variante com tempo de retenção próximo de A1C (Figura 3). Foram obtidos 16 resultados com faixa de concentração entre 39%-48%, nos quais ficou evidente a presença de hemoglobina variante interferindo na metodologia HPLC, reproduzidos na ELFHB e com resultados consideravelmente inferiores na imunoturbidimetria (Figura 4).

(Figura 1)

Bio-Rad CDM System
Bio-Rad Variant V-II TURBO NS. 14619 = VAR. 13

PATIENT REPOF
V2TURBO_A1c_2

Patient Data

Sample ID: 050123931201
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 13/05/2017 00:54:46
Injection Number: 1644
Run Number: 25
Rack ID:
Tube Number: 3
Report Generated: 05/05/2018 07:43:19
Operator ID: MARIANA

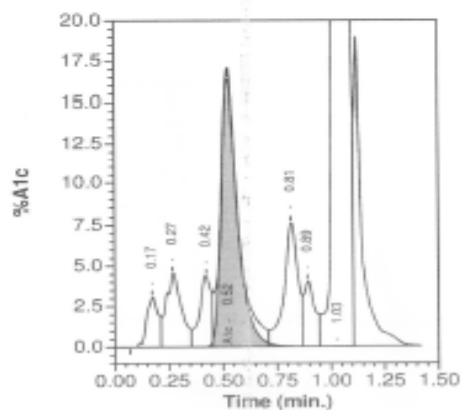
Comments:

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	1.8	0.172	26679
F	---	3.6	0.268	51835
LA1c	---	2.7	0.421	38909
A1c	16.4*	---	0.524	201522
F3	---	5.4	0.815	78496
P4	---	2.2	0.892	32687
Ao	---	70.5	1.030	1025594

*Values outside of expected ranges

Total Area: 1,455,721

HbA1c (NGSP) = 16.4* %



Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

Patient Data

Sample ID: 050123931201
 Patient ID:
 Name:
 Physician:
 Sex:
 DOB:
 Comments:

Analysis Data

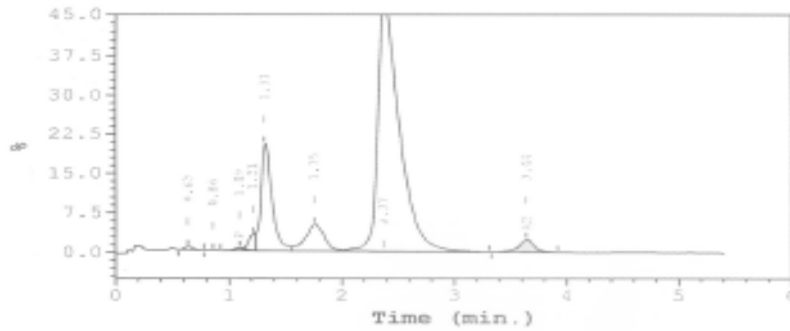
Analysis Performed: 13/05/2017 09:01:24
 Injection Number: 2173
 Run Number: 73
 Rack ID: 0002
 Tube Number: 2
 Report Generated: 14/05/2017 08:03:27
 Operator ID: MARIA

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.4	0.63	8555
P1	---	0.0	0.86	740
F	0.5	---	1.09	10502
Unknown	---	1.6	1.21	35712
P2	---	15.4	1.31	351545
P3	---	6.7	1.75	152016
Ao	---	72.8	2.37	1658743
A2	2.4	---	3.64	60648

Total Area: 2,278,461

F Concentration = 0.5 %
 A2 Concentration = 2.4 %

Analysis comments:



Monit. Dados

14/05/17 11:43

80brnd N 02974-3 MARIA TEREZA
 14/05/17 ND-W3(CS) A1-W3(CS) RWD3(CS)
 10:10:00 16.708 2.500 16.7
 LAB

Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

(Figura 2)

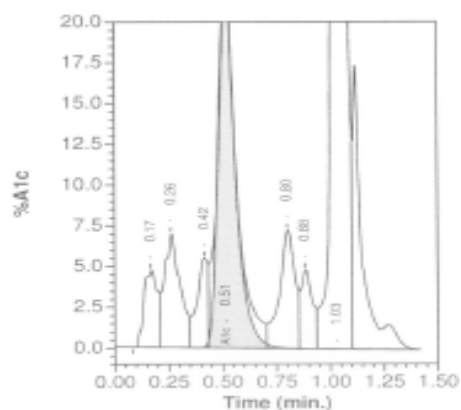
Bio-Rad CDM System PATIENT REPOF
Bio-Rad Variant V-II TURBO NS. 14633 = VAR.14 V2TURBO_A1c_2

Patient Data		Analysis Data	
Sample ID:	050122409601	Analysis Performed:	12/05/2017 23:40:22
Patient ID:	2687	Injection Number:	9660
Name:	████████████████████	Run Number:	180
Physician:	████████████████████	Rack ID:	████████████████████
Sex:	M	Tube Number:	4
DOB:	████████████████████	Report Generated:	13/05/2017 08:42:07
Comments:	████████████████████	Operator ID:	MARIANA

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	3.0	0.168	27827
F	---	5.1	0.261	47336
LA1c	---	3.2	0.417	29565
A1c	22.8*	---	0.514	169403
P3	---	5.2	0.800	48429
P4	---	2.6	0.882	24159
Aa	---	62.6	1.027	580197

Values outside of expected ranges Total Area: 926,916

HbA1c (NGSP) = 22.8* %



Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

Patient Data

Sample ID: 050122409601
 Patient ID:
 Name:
 Physician:
 Sex:
 DOB:
 Comments:

Analysis Data

Analysis Performed: 13/05/2017 09:08:02
 Injection Number: 2174
 Run Number: 73
 Rack ID: 0002
 Tube Number: 3
 Report Generated: 13/05/2017 09:25:06
 Operator ID: MARIA

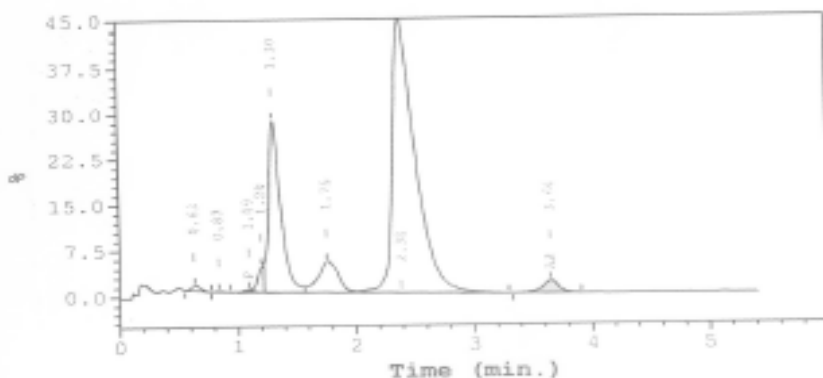
Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.5	0.63	10858
P1	---	0.0	0.83	1063
F	0.3	---	1.09	6071
Unknown	---	1.9	1.20	41165
P2	---	21.9	1.30	479225
P3	---	6.6	1.75	144576
Ao	---	66.6	2.38	1456565
A2	2.0*	---	3.64	47956

Total Area: 2,187,479

F Concentration = 0.3 %
 A2 Concentration = 2.0* %

*Values outside of expected ranges

Analysis comments:



A2 - p/ Anomalia?

Trans 05/13/2017 14:12 Group Operator MAINTENANER
 Data List Hermes Pardini Aul Print Time 05/13/2017 17:00
 S.No.EDON 0020 -01 S.DD 050122409603
 GLUC 4641

Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

(Figura 3)

Bio-Rad CDM System
Bio-Rad Variant V-II TURBO NS.14162 - VAR 21

PATIENT REPOF
V2TURBO_A1c_2

Patient Data

Sample ID: 912730406342
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 26/05/2017 11:33:15
Injection Number: 10703
Run Number: 223
Rack ID:
Tube Number: 9
Report Generated: 04/05/2018 17:23:03
Operator ID: SANDRA

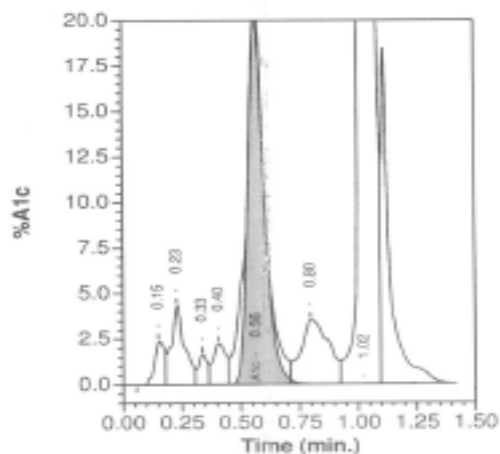
Comments:

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	1.2	0.151	18157
A1b	---	3.0	0.227	43746
Unknown	---	0.8	0.334	11380
Unknown	---	1.5	0.403	22100
A1c	20.2*	---	0.564	249913
P3	---	5.1	0.798	74484
Ao	---	71.2	1.024	1039161

*Values outside of expected ranges

Total Area: 1,458,940

HbA1c (NGSP) = 20.2* %



Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

Patient Data

Sample ID: 912730406342
Patient ID:
Name:
Physician:
Sex:
DOB:
Comments:

Analysis Data

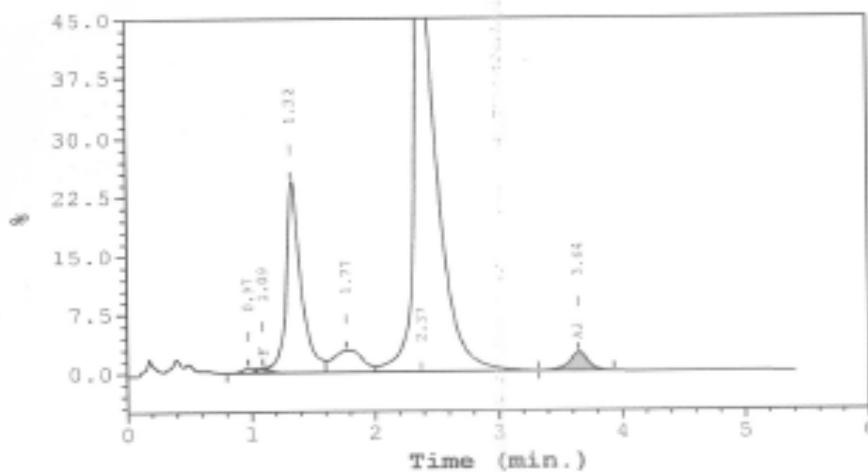
Analysis Performed: 27/05/2017 10:22:13
Injection Number: 6026
Run Number: 157
Rack ID:
Tube Number: 10
Report Generated: 05/05/2018 09:48:19
Operator ID: MARIA

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
Unknown	---	0.4	0.97	11065
F	0.5	---	1.09	12489
P2	---	20.6	1.32	526126
P3	---	4.6	1.77	118699
A0	---	71.3	2.37	1820278
A2	2.4	---	3.64	65051

Total Area: 2,553,708

F Concentration = 0.5 %
A2 Concentration = 2.4 %

Analysis comments:



N	00145-1		
HB-W3 (C2)	A1-W3 (C2)	RWD3 (C2)	
26.751	0.970	5.5	

Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

(Figura 4)

Patient Data

Sample ID: 053249801101
 Patient ID:
 Name:
 Physician:
 Sex:
 DOB:

Analysis Data

Analysis Performed: 30/06/2017 13:44:59
 Injection Number: 2643
 Run Number: 56
 Rack ID:
 Tube Number: 1
 Report Generated: 30/06/2017 16:43:46
 Operator ID: THAILANE

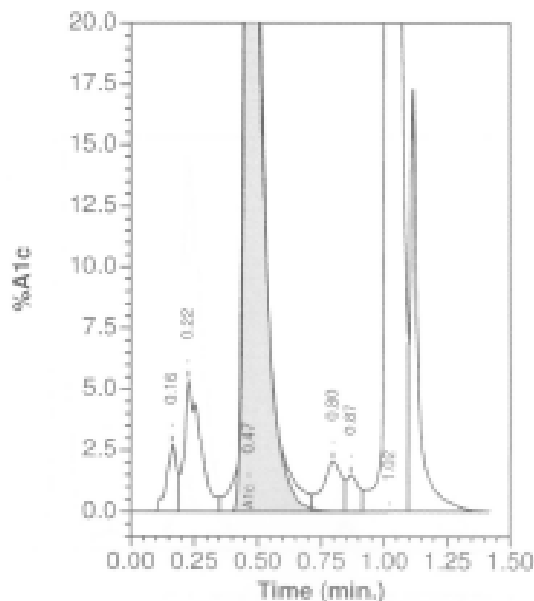
Comments:

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	1.5	0.162	21108
A1b	---	4.8	0.225	66660
A1c	42.6*	---	0.487	521135
P3	---	2.2	0.797	30002
P4	---	1.0	0.868	14212
Ap	---	52.5	1.021	722325

*Values outside of expected ranges

Total Area: 1,375,443

HbA1c (NGSP) = 42.6* %



Monit. Dados 30/06/17 15:22

Sobrnd NR 03087-3 053249801101

30/06/17 HB-W3 (C3) A1-W3 (C3) RW03 (C3)

15:05:56 15.001 0.601 5.4

LAB

Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

5.0 – ANEXO

Data	Nº do pedido	Resultado A1C (%)	Glicemia Estimada (mg/dL)	Resultado COBAS (%)	Glicemia Estimada (mg/dL)	ELFHB			Glicemia (mg/dL)	P3	
						P2	F	A2		ELFHB	HBA1C
09/05/2017	53-2108325	43,0	1187,4	11,6	286,2	41,6	0,3	3,0			
09/05/2017	51-2840666	41,3	1138,6	7,2	159,9	39,4	0,7	3,2			
10/05/2017	52-9420230	16,0	412,5	15,1	386,7	14,7	1,0	2,2			
10/05/2017	50-1202638	18,5	484,3	18,2	475,6	16,9	0,5	2,0			
10/05/2017	59-1575298	17,2	446,9	17,6	458,4	16,0	0,3	2,3			
10/05/2017	54-2216314	16,0	412,5	15,0	383,8	14,9	0,3	2,4			
10/05/2017	57-8725407	16,5	426,9	14,6	372,3	15,6	0,5	2,3			
10/05/2017	50-1211577	22,4	596,2	LIPEMIA (2006 TRIG)	Falha na dosagem	21,1	0,5	2,1	748 11/5 (LV)		
11/05/2017	55-1442513	18,3	478,5	Falha na dosagem	Falha na dosagem	17,9	0,3	2,1	453 9/5 (LC)		
11/05/2017	58-9952627	18,9	495,7	Falha na dosagem	Falha na dosagem	17,9	0,2	2,0	350 10/5 (LC)		
11/05/2017	57-8756742	20,8	550,3	6,3	134,1	20,5	0,5	1,7			
11/05/2017	55-1443758	43,7	1207,5	6,3	134,1	39,8	0,4	3,1			
12/05/2017	50-1224096	22,9	610,5	Falha na dosagem	Falha na dosagem	21,9	0,3	2,0	464 13/05 (LV)		
12/05/2017	50-1239312	16,4	424,0	16,7	432,6	15,4	0,5	2,4			
12/05/2017	52-9437336	16,1	415,4	15,8	406,8	15,1	1,5	2,3			
12/05/2017	55-1445912	16,1	415,4	Falha na dosagem	Falha na dosagem	14,5	0,3	2,4	296 10/5 (LC)		
13/05/2017	50-1245794	16,1	415,4	17,7	461,3	15,1	0,3	2,3			
13/05/2017	56-4312446	16,0	412,5	16,7	432,6	15,0	0,2	2,5			
13/05/2017	56-4303196	16,4	424,0	17,6	458,4	15,5	0,2	2,2			
16/05/2017	57-8782694	18,8	492,9	Falha na dosagem	Falha na dosagem	18,7	0,6	1,9	498 12/5 (LC)		
17/05/2017	59-1617322	16,1	415,4	Falha na dosagem	Falha na dosagem	15,9	1	2,4			
17/05/2017	55-1483174	3,7	59,5	5	96,8		0,5	3,2		P3=38	P3=35,2
24/05/2017	53-2215728	3,7	59,5	5,7	116,9		2,2	2,5		P3=45,7	P3=42,6
27/05/2017	50-1331216	20,7	547,4	5,5	111,2	20,6	0,5	2,4			
30/05/2017	53-2254941	21,5	570,35	Falha na dosagem	Falha na dosagem	20,1	0,7	2			
03/06/2017	56-4484639	46,6	1290,72	4,6	85,3	46,9	0,7	2,9			
08/06/2017	57-8922551	42,0	1158,7	Falha na dosagem	Falha na dosagem	46,5	0,4	2,9	94 01/06 (LC)		
09/06/2017	57-8909840	47,2	1307,94	5,4	108,3	47,1	0,4	3			
10/06/2017	911851051008	19,8	521,56	Falha na dosagem	Falha na dosagem	19,1	0,5	2,3			
11/06/2017	56-4551167	21,4	567,48	Falha na dosagem	Falha na dosagem	19,3	0,5	2,2	410 08/06 (LV)		
15/06/2017	13-1028347	20,5	541,65	Falha na dosagem	Falha na dosagem	20,4	0,3	2,1	608 13/06 (LV)		
15/06/2017	57-8965713	19,8	521,56	Falha na dosagem	Falha na dosagem	20,1	1,9	2,3			
15/06/2017	55-1672427	19,5	512,95	Falha na dosagem	Falha na dosagem	19,2	0,2	2,3			
16/06/2017	57-8970812	47,6	1319,42	5,2	102,5	46,8	0,3	3			
15/06/2017	57-8976585	44,3	1224,71	5,2	102,5	3	1	2,2		P3=48,0	
05/06/2017	58-1130326	42,2	1164,44	4,6	85,3	45,6	0,2	2,9			
04/06/2017	57-8905620	3,5	53,75	5,3	105,4	3,3	1	2,2		P3= 47,8/P3= 45,3	
13/05/2017	51-2885671	18,3	478,51	Falha na dosagem	Falha na dosagem	17,9	0,2	2,2			
13/05/2017	50-1224096	22,9	610,53	Falha na dosagem	Falha na dosagem	21,9	0,3	2			
13/05/2017	50-1239312	16,4	423,98	16,7	432,6	15,4	0,5	2,4			
23/06/2017	59-1921752	20,9	553,13	Falha na dosagem	Falha na dosagem	19,6	0,3	2	395,20 21/06 (LC)		
29/06/2017	54-2550593	47,8	1325,16	5,3	105,4	46,7	0,3	2,8			
30/06/2017	53-2498011	42,6	1175,92	5,6	114,0	40,3	0,3	3,3			
01/07/2016	51-3288617	40,2	1107,04	10,1	243,2	41	0,4	3,1			
05/07/2017	51-3322339	40,8	1124,26	7,2	159,94	40,1	0,8	3,1			
10/07/2017	57-9078654	19,3	507,21	Falha na dosagem	Falha na dosagem	19,7	0,3	2			
10/07/2017	50-1593520	20,1	530,17	Falha na dosagem	Falha na dosagem	12,6	0,4	3,1		ELFHB - S = 29,1	
21/07/2017	51-3432200	39	1072,6	8,5	197,25	38,3	0,3	3,5			
25/07/2017	55-1922456	43,8	1210,36	9,3	220,21	48,6	0,4	2,8			
25/07/2017	56-4913280	43,1	1190,27	4,6	85,32	43,9	0,8	3			
06/08/2017	56-5026572	18,4	481,38	17,7	461,29	17,4	0,4	2,3			
06/08/2017	50-1795624	18,4	481,38	Falha na dosagem	Falha na dosagem	17,3	0,7	2	395 04/08 (LC)		

Fonte: Resultados extraídos do equipamento Variant II (HPLC), laboratório Hermes Pardini (2017)

6.0 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conforme planilha e gráficos anexos pode-se concluir que a dosagem de Hba1c por HPLC, pode sofrer interferência na presença de hemoglobinas variantes, sendo esta, menor pelo método de Imunoturbidimetria.

É de fundamental importância este conhecimento técnico de um profissional de análises clínicas, para que possa emitir laudos de resultados precisos, cabendo apenas ao médico preceptor, traçar qual a melhor conduta e metodologia de controle glicêmico para seu paciente.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ATUALIZAÇÃO SOBRE HEMOGLOBINA GLICADA (A1C) PARA AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO E PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.

Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/publico/images/banners/posicionamento-3-2.pdf>>. Acesso em: 13 de abril 2018.

- 2- TINA-QUANT HEMOGLOBIN A1C GEN.3 – HEMOLYSATE AND WHOLE BLOOD APPLICATION.

Disponível em:< https://pim-ervices.roche.com/eld_sf/br/pt/documents/getdocument?documentid=53535ded-1dc6-e711-b48d-00215a9b3428>. Acesso em: 13 de abril de 2018.

- 3- MANUAL DE INSTRUÇÕES VARIANT II TURBO HBA1C KIT – 2.0 Disponível em:< http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/cdg/pt/270-2455_09-2010.pdf>.

Acesso em 16 de abril de 2018.

- 4- HOYER JD, SCHEIDT RM. COMPEDIUM OF HEMOGLOBINOPATHIES

Identification of hemoglobin variants by hplc - clin chem.2005 juli; 51(7):1303-4; autor reply 1305

- 5- INSTITUTO DE PATOLOGIA CLÍNICA HERMES PARDINI – ANÁLISES CLÍNICAS

Disponível em: < <https://www3.hermespardini.com.br/pagina/112/analises-clinicas.aspx>>

- 6- GLICOHEMOGLOBINA – DOCUMENTS – DOCGO.NET

Disponível em: <<https://docgo.net/documents>>

(Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/4:451-463) Descritores: Hemoglobina glicada; Controle metabólico do DM; medida de GHb; Hemoglobina anômala; ...

- 7- GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA A1C. HEMOGLOBINA GLICADA. POSICIONAMENTO OFICIAL (2009). ATUALIZAÇÃO SOBRE HEMOGLOBINA GLICADA (A1C) PARA AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO E PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES: ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS, 2009.
- 8- MANUAL DE INSTRUÇÕES D-10 TM HEMOGLOBIN A1C PROGRAM. UNITED STATES, BIO-RAD LABORATORIES, INC., HERCULES, CA 94547. FRANCE, BIO-RAD, MARNES-LA-COQUETTE. REF 220- 0101, L20012103PT00, 22 P.