

# D-10 Hemoglobin A1c Program

220-0101

400 TESTES

---

## PROGRAMA DE HEMOGLOBINA A1c

---

**IVD**



Sempre verifique se a versão da Instrução de Uso constante no rótulo externo do seu produto corresponde ao documento obtido no endereço eletrônico <http://www.bio-rad.com/pt-br/clinical-diagnostics/support>.

Para obter a Instrução de Uso em formato impresso, entre em contato com a Bio-Rad: [brz\\_bulas@bio-rad.com](mailto:brz_bulas@bio-rad.com).

**BIO-RAD**

# ÍNDICE

1- OBJETIVO DO TESTE. ....	3
2- RESUMO E EXPLICAÇÃO SOBRE O TESTE. ....	3
3- PRINCÍPIO DE PROCEDIMENTO. ....	4
4- COMPONENTES DO KIT . ....	4
5- ITENS ADICIONAIS, DISPONÍVEIS JUNTO À BIO-RAD . ....	6
6- ITENS ADICIONAIS REQUERIDOS, NÃO DISPONÍVEIS JUNTO À BIO-RAD . ....	7
7- PRECAUÇÕES/AVISOS . ....	7
8- COLETA E MANUSEIO DE AMOSTRA. ....	8
9- PREPARO E ARMAZENAGEM DOS REAGENTES. ....	9
10- INDICAÇÃO DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DE REAGENTES . ....	11
11- PROCEDIMENTO . ....	12
12- DIRETRIZES DE INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS. ....	15
13- LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO. ....	16
14- VALORES DE REFERÊNCIA . ....	17
15- CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO . ....	18
16- FORMATO DE RELATÓRIO DE AMOSTRA . ....	21
17- INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO. ....	31
18- INFORMAÇÃO SOBRE MARCA REGISTRADA . ....	31
19- REFERÊNCIAS . ....	31

## 1- OBJETIVO DO TESTE

O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10™ da Bio-Rad visa a determinação percentual de hemoglobina A<sub>1c</sub> no sangue total humano usando cromatografia líquida de alta pressão por troca de íon (HPLC). O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 da Bio-Rad é para uso exclusivo de Profissionais. Para Uso no Diagnóstico In Vitro .

## 2- RESUMO E EXPLICAÇÃO SOBRE O TESTE

Diabetes mellitus é uma condição caracterizada pela hiperglicemia resultante da incapacidade do corpo em utilizar a glicose no sangue para energia. No diabetes Tipo 1, o pâncreas deixa de produzir insulina e, portanto, a glicose no sangue não pode entrar nas células para uso de energia. No diabetes Tipo 2, o pâncreas não produz insulina suficiente ou o corpo é incapaz de utilizar a insulina de forma correta.<sup>1</sup> Os efeitos diretos e indiretos da hiperglicemia no sistema vascular humano são as principais fontes de morbidade e mortalidade no diabetes de Tipo 1 e Tipo 2. Esses efeitos incluem complicações macrovasculares (doença da artéria coronária, doença arterial periférica e derrame) e complicações microvasculares (nefropatia diabética, neuropatia e retinopatia).<sup>2</sup> Diabetes mellitus afeta aproximadamente 7% da população mundial.<sup>3</sup>

Terapia para diabetes exige a manutenção a longo prazo de um nível de glicose sanguínea o mais próximo possível do nível normal, minimizando o risco de consequências vasculares a longo prazo.<sup>4,5</sup> Uma única medição da glicose sanguínea em jejum é uma indicação da condição anterior imediata do paciente (horas), mas pode não representar a condição real da regulação da glicose sanguínea.<sup>6,7</sup> A medição da hemoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>) a cada dois a três meses é aceita como uma medição de controle glicêmico no tratamento e cuidado de pacientes com diabetes mellitus.

HbA<sub>1c</sub>, a glicohemoglobina de interesse, é formada em duas etapas pela glicação não-enzimática de HbA. A primeira etapa é a formação de uma aldimina (lábil A<sub>1c</sub>, ou pré-A<sub>1c</sub>), uma reação adversa entre o grupo de carbonila de glicose e a valina N-terminal da cadeia  $\alpha$  de hemoglobina. A formação de lábil A<sub>1c</sub> é diretamente proporcional à concentração de glicose sanguínea. Durante a circulação de células vermelhas do sangue, parte de lábil A<sub>1c</sub> é convertida (rearranjo de Amadori) para formar uma cetoamina estável, HbA<sub>1c</sub>.<sup>8</sup>

O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 tem como base a separação cromatográfica de HbA<sub>1c</sub> em um cartucho de troca de cátion. A separação é otimizada para minimizar interferência de variantes da hemoglobina, lábil A<sub>1c</sub> e hemoglobina carbamilada. Vide Limitações do Procedimento e Características de Desempenho para outras informações. O Programa de

Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 também oferece amostragem a partir de um tubo de sangue total primário, seguido de diluição de amostra e um tempo de análise de três minutos por amostra.

### 3- PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 utiliza o princípio de cromatografia líquida de alta pressão por troca de íon (HPLC). As amostras são automaticamente diluídas no D-10 e injetadas na coluna de análise. O D-10 fornece um gradiente de tamponamento programado para aumento da força iônica para a coluna, onde as hemoglobinas são separadas com base em suas interações iônicas com o material da coluna. As hemoglobinas separadas passam, então, pela célula de fluxo do fotômetro de filtro, onde as trocas na absorbância em 415 nm são medidas.

O software do D-10 desempenha a redução dos dados brutos coletados de cada análise. A calibração em dois níveis é utilizada para quantificação dos valores de HbA<sub>1c</sub>. Um relatório de amostra e um cromatograma são gerados para cada amostra. O pico de A<sub>1c</sub> é sombreado. Essa área é calculada usando um algoritmo exponencialmente modificado de Gaussian (EMG) que exclui o lábil A<sub>1c</sub> e áreas de pico carbamilado da área de pico de A<sub>1c</sub>.

O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 é para uso exclusivo do Sistema de Teste de Hemoglobina D-10 da Bio-Rad.

### 4- COMPONENTES DO KIT

#### [400 teste] 220-0101, Kit do D-10 para Hemoglobina A<sub>1c</sub>

O Kit contém componentes para 400 testes:

[REF]	Descrição
220-0110*	Tampão de Eluição 1. Dois frascos contendo 2000 mL de tampão de Bis-Tris/Fosfato, pH 6,0. Contém azida de sódio a <0,05% como conservante.
220-0111*	Tampão de Eluição 2. Um frasco contendo 1000 mL de tampão de Bis-Tris/Fosfato, pH 6,7. Contém azida de sódio a <0,05% como conservante.
220-0112*	Solução de Lavagem/Diluyente. Um frasco contendo 1600 mL de água deionizada com azida de sódio a <0,05% como conservante.

## **Tampões de Eluição e Solução de Lavagem/Diluyente**

1. Permita que os Tampões de Eluição e Solução de Lavagem/Diluyente atinjam temperatura ambiente (15-30 °C) antes de executar o ensaio. Misture cada frasco ao inverter gentilmente antes da instalação.
2. Os Tampões de Eluição e Solução de Lavagem/Diluyente permanecerão estáveis até a data de validade se armazenados fechados de 15-30 °C. Após abertura dos frascos, esses reagentes permanecem estáveis por 8 semanas quando armazenados de 15-30°C.
3. Com um Kit novo, instale um frasco de reagente e siga os procedimentos de Instalação de *Kit Novo de Lote na seção Procedimento*. Após 200 injeções, instale um frasco novo de Tampão de Eluição 1. Restaure o volume na tela LOT INFO/Buffer 1 após instalação deste reagente.

**OBS.:** *Ao utilizar o Carregador de Rack D-10 opcional, os dois frascos de Tampão de Eluição 1 são instalados simultaneamente. A restauração manual do volume não é necessária.*

4. A Solução de Lavagem/Diluyente é inter-cambiável entre os lotes de um Kit novo.

## **Primer de Sangue Total**

Utilize alíquotas frescas de rimer de Sangue Total ao instalar um nova coluna.

1. O Primer de Sangue Estável permanecerá estável até a data de validade quando armazenado fechado de 2-8 °C.
2. Prepare o Primer de Sangue Total ao adicionar 1 mL de água deionizada no frasco.
3. Mantenha por 10-15 minutos de 15-30 °C.
4. Gire gentilmente para dissolver e garantir a mistura total.
5. Escreva a ata de reconstituição no rótulo. O Primer de Sangue Total reconstituído é estável por 1 dia quando armazenado de 2-8 °C.

[REF]	Descrição
220-0110*	Tampão de Eluição 1. Dois frascos contendo 2000 mL de tampão de Bis-Tris/Fosfato, pH 6,0. Contém azida de sódio a <0,05% como conservante.
220-0111*	Tampão de Eluição 2. Um frasco contendo 1000 mL de tampão de Bis-Tris/Fosfato, pH 6,7. Contém azida de sódio a <0,05% como conservante.
220-0112*	Solução de Lavagem/Diluente. Um frasco contendo 1600 mL de água deionizada com azida de sódio a <0,05% como conservante.

**\*Os componentes não estão disponíveis para a venda individualmente.**

**OBS.:** O D-10 calcula os níveis de tampão e nível de dejetos assumindo volumes de testes de 200 ou mais testes por mês e 4 ou mais amostras por ensaio. Usuários com baixo volume de teste ficarão sem tampão e encherão o tanque externo de dejetos antes que os avisos aplicáveis sejam exibidos. Verifique visualmente os níveis de tampão e o nível do tanque externo antes de cada execução.

## 5- ITENS ADICIONAIS, DISPONÍVEIS JUNTO À BIO-RAD

[imagem]	Descrição
220-0297	<b>Adaptador de Frasco de Amostra</b> , 10 x 1,5 mL
220-0375	<b>Papel Térmico para D-10</b> , 10 rolos
740	<b>Lyphochek® Controle de Nível Duplo de Diabetes</b> , 6 x 0,5 mL
120	<b>Lyphochek® Conjunto de Linearidade de Hemoglobina A1c (1 de cada 4 níveis)</b> , 4 x 0,5 mL
171	<b>Liquichek™ Controle de Diabetes, Nível 1</b> , 6 x 1,0 mL

[imagem]	Descrição
172	Liquichek™ Controle de Diabetes, Nível 2, 6 x 1,0 mL
173	Liquichek™ Controle de Diabetes, Nível 3, 6 x 1,0 mL
172X	Liquichek™ Controle de Diabetes, MiniPacote de Nível Triplo, 3 x 1,0 mL

## 6- ITENS ADICIONAIS REQUERIDOS, NÃO DISPONÍVEIS JUNTO À BIO-RAD

Pipetas, 5 µL, 0,5 mL, 1 mL, 7 mL

Água Deionizada

Luvas Descartáveis

## 7- PRECAUÇÕES/AVISOS

1. Para uso no diagnóstico in vitro.
2. Vista equipamento de proteção individual durante o manuseio de todos os reagentes e amostras e ao operar o sistema D-10.
3. Descarte todos os dejetos de acordo com as normas locais e/ou nacionais.
4. Alguns reagentes contêm azida de sódio, que pode reagir com cobre ou chumbo formando azidas de metal explosivas. Cuidado ao descartar esses reagentes. Se descartar para que escoe, enxágue com bastante água para que a azida não se acumule.
5. Material de dejetos contendo amostras do paciente ou produtos biológicos deve ser considerado como um risco biológico no descarte ou tratamento.
6. Reagentes químicos devem ser manipulados de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais.
7. Limpe imediatamente e completamente todos os derrames. Desinfete a área de quaisquer derramamentos envolvendo materiais de risco biológico. Descarte todos os materiais contaminados de forma adequada.

8. Não troque as tampas dos frascos; isso pode levar à contaminação cruzada dos reagentes.

9. Nunca misture os conteúdos de diferentes frascos do mesmo reagente. Isso pode levar à contaminação do reagente e comprometer o desempenho do produto.

10. Cada unidade de sangue total utilizada na fabricação dos calibradores e Primer de sangue total foram testadas usando os métodos aprovados pela FDA e se mostraram não-reativos para HIV-1, HIV-2, Hepatite B (VHB), Hepatite C (VHC) e sífilis. Nenhum método de teste pode oferecer garantia total de que os produtos contendo materiais de origem humana estarão ausentes desses e outros agentes infecciosos. De acordo com as boas práticas laboratoriais, todo o material de origem humana deve ser considerado potencialmente infeccioso para todos os agentes infecciosos; portanto, manuseie os calibradores e o Primer de sangue total com as mesmas precauções utilizadas para as amostras de paciente.

11. Aderência ao protocolo determinado aqui é necessária a fim de garantir o desempenho adequado deste produto.

12. As tampas dos frascos do Calibrador possuem borracha natural seca.

13. Não utilize o Diluente do Calibrador para pré-diluir as amostras do paciente.

## **8- COLETA E MANUSEIO DAS AMOSTRAS**

### **Tipo de Amostra**

Sangue total.

### **Precauções para Coleta da Amostra**

Considere qualquer material de origem humana como infeccioso e os manuseie usando procedimentos típicos para segurança biológica.

### **Aditivos e Conservantes das Amostras**

As amostras de sangue total devem ser coletadas em tubo de coleta a vácuo contendo EDTA.

### **Armazenagem da Amostra**

Amostras de sangue total podem ser armazenadas por até 7 dias de 2-8 °C ou 3 dias em temperatura ambiente (15-30 °C).

## Preparo das Amostras

1. Permita que os tubos de amostra atinjam temperatura ambiente (15-30 °C) antes de executar o ensaio. Não é necessário preparar a amostra. Misturar não tem impacto no valor de HbA<sub>1c</sub> contanto que a área total esteja dentro da variação. Os tubos de amostra são carregados na rack de amostra do D-10 e colocado no D-10. Garanta que os códigos de barra da amostra estejam voltados para a parte de trás do instrumento. Utilize as inserções da rack especial para tubos de 12, 13 e 14 mm de diâmetro. Remova todas as inserções para os tubos de 16 mm de diâmetro. Tubos com altura de 75 mm a 100 mm podem ser utilizados.

2. Se a amostra estiver em um tubo de tamanho/tipo anormal, ou se houver menos de 2,0 mL de amostra no tubo, então, a amostra deve ser pré-diluída. Antes de pipetar, misture por completo a amostra ao inverter gentilmente o tubo. Para pré-diluição, pipete 1,5 mL de Solução de Lavagem/Diluyente em um frasco rotulado de 1,5 mL, seguido de 5 µL da amostra de sangue total. Tampe o frasco de amostra e misture bem. Utilize um adaptador de frasco de amostra para frascos de 1,5 mL.

**OBS.:** *Estudos indicam que o uso de tubos de coleta MONOJECT™ ([REF] 8881311446, Covidien, Mansfield, MA, 02048 EUA) no Sistema de Teste de Hemoglobina D-10 pode resultar em área total elevada. Em alguns casos, o sangue fica preso na tampa e causa super-amostragem, resultando em área total alta que excede a variação aceitável. Para utilizar esse tipo de tubo, os usuários devem diluir manualmente a amostra ou garantir que sangue não fique preso na tampa antes de carregar a amostra no Sistema de Teste de Hemoglobina D-10. Resultados com área total dentro da variação aceitável são relatáveis.*

### Remessa de Amostras

Todas as amostras de origem humana devem ser enviadas de acordo com as normas nacionais e internacionais de transporte.

## 9- PREPARO E ARMAZENAGEM DE REAGENTES

Vide a bula incluída no lote atual de calibradores e controles para designação de valores e variações. Ao mudar para um lote diferente de reagentes e/ou cartuchos, os parâmetros do disquete devem ser instalados a fim de garantir um desempenho ideal do programa. Para instalar ou alterar os Tampões de Eluição, Solução de Lavagem/Diluyente e Coluna de Análise, siga os procedimentos descritos no *Manual de Operação do D-10, Seção 4.2.*

## **Tampões de Eluição e Solução de Lavagem/Diluyente**

1. Permita que os Tampões de Eluição e Solução de Lavagem/Diluyente atinjam temperatura ambiente (15-30 °C) antes de executar o ensaio. Misture cada frasco ao inverter gentilmente antes da instalação.
2. Os Tampões de Eluição e Solução de Lavagem/Diluyente permanecerão estáveis até a data de validade se armazenados fechados de 15-30 °C. Após abertura dos frascos, esses reagentes permanecem estáveis por 8 semanas quando armazenados de 15-30°C.
3. Com um Kit novo, instale um frasco de reagente e siga os procedimentos de Instalação de *Kit Novo de Lote na seção Procedimento*. Após 200 injeções, instale um frasco novo de Tampão de Eluição 1. Restaure o volume na tela LOT INFO/Buffer 1 após instalação deste reagente.

**OBS.:** *Ao utilizar o Carregador de Rack D-10 opcional, os dois frascos de Tampão de Eluição 1 são instalados simultaneamente. A restauração manual do volume não é necessária.*

4. A Solução de Lavagem/Diluyente é inter-cambiável entre os lotes de um Kit novo.

## **Primer de Sangue Total**

Utilize alíquotas frescas de Primer de Sangue Total ao instalar um nova coluna.

1. O Primer de Sangue Estável permanecerá estável até a data de validade quando armazenado fechado de 2-8 °C.
2. Prepare o Primer de Sangue Total ao adicionar 1 mL de água deionizada no frasco.
3. Mantenha por 10-15 minutos de 15-30 °C.
4. Gire gentilmente para dissolver e garantir a mistura total.
5. Escreva a ata de reconstituição no rótulo. O Primer de Sangue Total reconstituído é estável por 1 dia quando armazenado de 2-8 °C.

6. O Primer de Sangue Total é inter-cambiável entre lotes.

### **Calibradores de Hemoglobina A<sub>1c</sub>**

Reconstitua e armazene os Calibradores de HbA<sub>1c</sub> conforme instruído na *Bula de Conjunto de Calibrador/Diluyente*.

### **Padrões Extraídos**

Este método de HPLC não utiliza padrões extraídos.

### **Controles**

- Reconstitua e armazene os controles de acordo com a bula do fabricante.
- Controle de Diabetes Lyphochek da Bio-Rad devem ser diluídos 1:300 antes da análise. Pipete 1,5 mL de Solução de Lavagem/Diluyente em um frasco rotulado de 1,5 mL, seguido de 5 µL de controle reconstituído. Tampe o frasco de controle e misture bem.
- Controle de Diabetes Liquichek da Bio-Rad devem ser diluídos 1:200 antes da análise. Pipete 1,0 mL de Solução de Lavagem/Diluyente em um frasco rotulado de 1,5 mL, seguido de 5 µL de controle. Tampe o frasco de controle e misture bem.

## **10- INDICAÇÕES DE INSTABILIDADE OU DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES**

- Se os reagentes foram congelados durante a remessa, misture cada frasco ao inverter gentilmente antes de instalar no instrumento.
- Não utilize qualquer reagente que apresente qualquer indicação de descoloração, turvação, ou precipitação.
- Não utilize qualquer reagente que mostre qualquer sinal de vazamento.
- Não utilize o calibrador ou Primer de sangue total se a pastilha estiver marrom ou o frasco estiver quebrado. Se o material liofilizado contiver substância insolúvel, descarte o material e reconstitua um novo frasco.

## 11- PROCEDIMENTO

### Seleção de Método

Na tela LOT INFO:

- Pressione METHOD na tela de toque.
- Selecione o método desejado (HbA<sub>1c</sub>).
- Pressione EXIT.
- Pressione YES para confirmar a troca de método.
- Pressione EXIT.
- O método selecionado é indicado no lado esquerdo na barra de status.

Não é necessário realizar um enxágue do sistema a menos que esteja instalando um novo lote de reagentes.

### Instalação de um Novo Kit de Lote diferente (Disquete do Kit de Atualização)

- Vá para a tela LOT INFO.
- Pressione o botão UPDATE KIT.
- Coloque o disquete UPDATE KIT no drive A:\.
- Siga as instruções na tela para proceder com o Procedimento do Kit de Atualização.
- Remova o disquete do drive A:\ assim que o procedimento for concluído.

### Procedimento de Condicionamento da coluna de Análise

- Pipete 1 mL de *Primer* de Sangue Total reconstituído em um frasco de amostra. Coloque o frasco de amostra em um adaptador de frasco de amostra rotulado com um código de barras de *Primer*, então, coloque o adaptador na posição 1 do *rack* de amostra.

- Inicie um ensaio. Quando concluído, o cartucho estará pronto para calibragem.

## Calibração

A calibração deve ser desempenhada uma vez após a instalação de um novo Kit análise. Calibração adicional pode ser desempenhada a critério do laboratório.

- Prepare as amostras conforme descrito na seção *Preparo das Amostras*.
- Coloque os calibradores e os controles no D-10. Utilize os adaptadores de frasco para frascos de 1,5 mL com calibradores e controles. Os adaptadores devem ter código de barras identificando o tipo de amostra.

Ordem de amostra com calibradores:

Nº da Amostra	Reagente	Adaptador
1	Calibrador de HbA <sub>1c</sub> , Nível 1	Calibrador 1
2	Calibrador de HbA <sub>1c</sub> , Nível 2	Calibrador 2
3	Controle, Nível 1	Controle Baixo de A <sub>1c</sub>
4	Controle, Nível 2	Controle Alto de A <sub>1c</sub>
5-10	Amostras do Paciente	

**OBS.:** Os valores do analito impressos nos relatórios do calibrador são os valores designados ao calibrador. No caso de falha na calibração, os relatórios indicarão esses valores designados; entretanto, a mensagem “Calibration Failed” será impressa na parte inferior do relatório do calibrador. Se o alerta “Stop if calibration fails” NÃO for selecionado (vide Seção 2.4.4 do Manual de Operação do D-10), o ensaio continuará, usando os fatores de calibração do ensaio prévio da calibragem aceitável. Para solução de problemas, vide a Seção 6.1 do Manual de Operação do D-10.

## Ensaio de Rotina

Assim que o D10 estiver calibrado, utilize a seguinte configuração de ensaio. Vide os *Requerimentos de CQ* para informação sobre a frequência de amostra de controle.

Ordem de amostra sem calibradores:

<b>Nº da Amostra</b>	<b>Reagente</b>
1	Controle, Nível 1
2	Controle, Nível 2
3-10	Amostras do Paciente

### **Instalação de um Tampão Suplementar**

- Ao instalar os reagentes do Pacote de Reagente Suplementar, o Tampão 1 e o Tampão 2 sempre devem ser utilizados como um conjunto equiparado. Nunca utilize um frasco de tampão do Pacote de Novo Pedido com um frasco de tampão do Pacote de Reagente Suplementar.
- Os usuários precisarão restaurar o volume do tampão quando novos frascos forem instalados. (Vide a Seção 2.4.5, Tela LOT INFO, no Manual de Operação do D-10).
- A informação de validade e de lote do Tampão Solução de Lavagem/ Diluente deve ser registrada manualmente no sistema.
- Ao instalar o segundo frasco de Tampão 1, restaure o volume de Buffer 1.

### **Certificação/Rastreabilidade do Material e Método de Referência**

O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 é rastreável aos métodos de referência do Programa Nacional de Padronização de Glicohemoglobina (NGSP) e a Federação Internacional de Bioquímica Clínica e Medicina Laboratorial (IFCC).

O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 é certificado pelo NGSP como tendo rastreabilidade documentada para o método de referência do Estudo de Complicações e Controle de Diabetes (DCCT). A finalidade do NGSP é padronizar os resultados de teste de glicohemoglobina de modo que os resultados laboratoriais clínicos sejam comparáveis no DCCT, onde as relações entre glicose no sangue média e risco de complicações vasculares foram estabelecidas.<sup>9</sup>

O Grupo de Trabalho da IFCC para padronização de HbA<sub>1c</sub> desenvolveu e mantém o procedimento de medição de referência para HbA<sub>1c</sub> a ser utilizado como âncora analítica para rastreabilidade de HbA<sub>1c</sub>. O método de referência da IFCC separa os peptídeos N-terminais glicosados e não-glicosados da cadeia β através de HPLC de fase reversa e quantifica o analito por espectrometria

de massa ou eletroforese capilar.<sup>10</sup>

O método de referência da IFCC é utilizado para designar valores de IFCC aos materiais secundários de referência. Esses materiais são utilizados pelos fabricantes a fim de designar valores aos calibradores de produto.<sup>11</sup>

Os resultados de HbA<sub>1c</sub> são tradicionalmente relatados em percentual convencional (100 x HbA<sub>1c</sub>/Hb total) ou em unidades percentuais de SI (HbA<sub>1c</sub>/Hb total). Em maio de 2007, a Associação Americana para Diabetes, a Associação Europeia para o Estudo do Diabetes, a Federação Internacional para o Diabetes e a IFCC emitiram uma declaração de consenso sobre a padronização mundial da medição de HbA<sub>1c</sub>. Eles recomendam o uso da unidade de SI da IFCC (mmol/mol).<sup>12</sup> A fim de implementar as unidades de SI recentemente aceitas, as equações mestre originalmente publicadas entre a referência da IFCC e os métodos de comparação designados foram modificadas conforme segue:

Equação Mestre para Método de Comparação Designado (DCM):

<b>DCM</b>	<b>Conversão de IFCC para DCM<sup>10</sup></b>
NGSP (EUA)	$NGSP = (0,09148 \times IFCC) + 2,152$

Exemplos de Resultados de Paciente:

<b>IFCC</b>	<b>NGSP</b>
43 mmol/mol	6,1%
48 mmol/mol	6,5%
53 mmol/mol	7,0%

### **Requerimentos de CQ**

Ao manter as boas práticas laboratoriais, amostras de controle diabético e não-diabético devem ser incluídas no ensaio a cada 24 horas. Um ensaio repetido é indicado quando valores de controle esperado não são obtidos.

## **12- DIRETRIZES PARA INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS**

Observe as seguintes diretrizes a fim de garantir resultados aceitáveis:

1. O D-10 passou na calibração. Para sua referência, as variações aceitáveis de curva e intersecção são fornecidas na *Bula do Conjunto de Calibrador Diluente do Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10*.

2. A área total de cada análise deve variar de 1,0 a 4,0 milhões de  $\mu\text{volt}\cdot\text{segundo}$ . Os resultados não devem ser relatados se a área estiver fora dessa variação.

3. Os picos são corretamente identificados. Para sua referência, as janelas de tempo de retenção do analito são fornecidas na *Bula da Coluna de Análise para Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10*.

4. Os valores de Controle de Qualidade estão dentro da variação.

5. A variação relatável para HbA<sub>1c</sub> foi estabelecida com base nos dados apresentados nas Características de *Desempenho, Linearidade/Recuperação*. Se o resultado de HbA<sub>1c</sub> ficar fora da variação relatável, este não deve ser relatado.

	<b>Varição Relatável</b>
HbA <sub>1c</sub> % por NGSP	3,8-18,5
HbA <sub>1c</sub> em mmol/mol pela IFCC	18-179

6. Qualquer amostra com HbA<sub>1c</sub> >15% ou >140 mmol/mol deve ser suspeita de ter uma variante de hemoglobina.<sup>13</sup>

7. Qualquer amostra com uma área combinada de  $\geq 60\%$  nas janelas de Variante, S e C deve ser suspeita de ter uma variante homozigótica ou um fenótipo de variante de talassemia  $\beta$ . O resultado de HbA<sub>1c</sub> não deve ser relatado para essas amostras.<sup>14</sup>

### **Resolução de Pico P3**

O pico P3 pode se dividir em razão de resolução melhorada. Quando isso ocorre, um pico “Unknown” será listado na tabela de pico para o pico P3 (vide a Figura 4). A presença deste pico “Unknown” não tem efeito na quantificação de HbA<sub>1c</sub>.

## **13- LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

### **Diluição da Amostra**

Concentração normal de hemoglobina total corresponde à área total de aproximadamente 2,5 milhões de  $\mu\text{volt}\cdot\text{segundo}$ . Amostras de sangue total do paciente de volume baixo, médio e alto foram diluídas para obter áreas totais de 1,0 a 5,0 milhões de  $\mu\text{volt}\cdot\text{segundo}$ . Essas amostras foram ensaiadas no Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 para confirmar que a área total não afeta o resultado. A variação de área total recomendada é de

1,0 a 5,0 milhões de  $\mu\text{volt}\cdot\text{segundo}$ .

Se a área de amostra estiver fora da variação esperada, pré-dilua manualmente a amostra de acordo com as diretrizes de *Preparo de Amostra*. Se a área de amostra ainda estiver fora da variação esperada, a amostra deve ser novamente diluída dentro de uma variação de contagem de área de 1,0 a 5,0 milhões e novamente ensaiada.

**OBS.:** *Para algumas áreas totais altas, nas amostras altas de HbA<sub>1c</sub> (por exemplo, HbA<sub>1c</sub> de 15% ou 140 mmol/mol com área total de 5 M), o pico de A<sub>1c</sub> pode ficar fora da janela de tempo de retenção estabelecida. Pré-dilua a amostra em aproximadamente 2,5 M da área total e ensaie novamente.*

### **Sobrevida Anormal das Células Vermelhas**

Amostras de pacientes com anemias hemolíticas exibirão uma redução nos valores de hemoglobina glicada em razão do tempo de vida curto das células vermelhas. Este efeito dependerá da gravidade da anemia. Amostras de pacientes com policitemia ou pós-esplenectomia podem exibir aumento nos valores da hemoglobina glicada em razão de um tempo de vida um pouco mais longo das células vermelhas.<sup>15</sup>

### **Variantes de Hemoglobina**

Os valores de HbA<sub>1c</sub> determinados usando o Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 para amostras de traço de HbS e traço de HbC não mostraram diferença clinicamente significativa dos valores determinados por um método de afinidade por boronato certificado pelo NGSP. Cromatogramas típicos para amostras de traço de HbS e HbC são fornecidos nas Figuras 7 e 8. Nas formas homozigóticas raras (SS ou CC), não existe a presença de HbA; portanto, nenhum valor de HbA<sub>1c</sub> pode ser determinado.

Outros variantes anormais de hemoglobina não foram avaliados no Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10. Para a confirmação positiva de qualquer variante específica de hemoglobina, métodos alternativos de separação são necessários.

## **14- VALORES DE REFERÊNCIA**

### **Variações de Hemoglobina A<sub>1c</sub><sup>16</sup>**

As seguintes variações de HbA<sub>1c</sub> podem ser utilizadas para a interpretação dos resultados; entretanto, fatores tais como duração do diabetes, aderência à terapia e idade do paciente devem ser considerados na avaliação do grau de controle de glicose sanguínea. Esses valores são para não-gestantes. “Ação Sugerida” depende das circunstâncias individuais do paciente. Tais ações podem incluir ampliação da educação de auto-controle do diabetes,

co-tratamento com uma equipe de diabetes, encaminhamento para um endocrinologista, alteração na terapia farmacológica, início ou aumento do auto-controle da glicose no sangue, ou contato mais frequente com o paciente.

Hemoglobina A <sub>1c</sub> (%)	Grau de Controle da Glicose
> 8	Ação Sugerida†
< 7	Meta‡
< 6	Nível Não-Diabético

† Alto risco de desenvolver complicações a longo prazo, tais como retinopatia, nefropatia, neuropatia e cardiopatia. Ação Sugerida depende das circunstâncias individuais do paciente.

‡ Certo risco de reação hipoglicêmica no diabetes Tipo I. Alguns indivíduos intolerantes à glicose e diabéticos “sub-clínicos” podem demonstrar HbA<sub>1c</sub> (elevada) nesta área.

### Intervalo de Referência Não-Diabética

A Terceira Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição nos EUA incluiu indivíduos acima dos 20 anos de idade com glicose plasmática normal em jejum e sem diagnóstico prévio de diabetes. Os valores de HbA<sub>1c</sub> foram medidos no Sistema DIAMAT™ da Bio-Rad.

A HbA<sub>1c</sub> média pesada para os pacientes com glicose plasmática normal em jejum (n = 5.694) foi de 5,17% com um desvio padrão de 0,45%. Os limites de confiança de 95% (média ± 2SD) foram de 4,27-6,07% para HbA<sub>1c</sub>.<sup>9</sup>

Uma vez que o Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 é certificado pelo NGSP, este intervalo de referência pode ser utilizado como um ponto de referência até que o laboratório tenha analisado um número suficiente de amostras para determinar seu próprio intervalo de referência diabética e não-diabética representativo da população regional sendo testada.

## 15- CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### Exatidão

A exatidão do Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 foi avaliada em um estudo com base na diretriz EP5-T2 do NCCLS “Avaliação da Exatidão de Desempenho de Dispositivos de Bioquímica Clínica” conforme adaptado pelo NGSP para uso na certificação dos métodos de glicohemoglobina. Neste estudo, 40 ensaios foram desempenhados no Sistema D-10 ao longo de 20 dias úteis. Em cada ensaio, alíquotas de amostras normais e diabéticas

foram analisadas em duplicata. Os resultados do estudo de exatidão são resumidos na Tabela 1.

	<b>Paciente Normal</b>	<b>Paciente Diabético</b>
Média (HbA <sub>1c</sub> %)	5,7	9,4
Dentro do Ensaio (% CV)	0,78	0,46
Entre os Dias (% CV)	0,68	0,99
Entre Ensaios (% CV)	0,52	0,53
Exatidão Total (% CV)	1,16	1,22

*Tabela 1. Resultados do Estudo de Exatidão.*

### **Precisão**

O Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 foi comparado com o Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do VARIANT™ II ([REF] 270-2101). Um estudo de comparação foi desempenhado em 40 amostras de pacientes. Vide a Figura 1.

Curva = 0,9743

Intersecção = 0,3078

R<sup>2</sup> = 0,9945

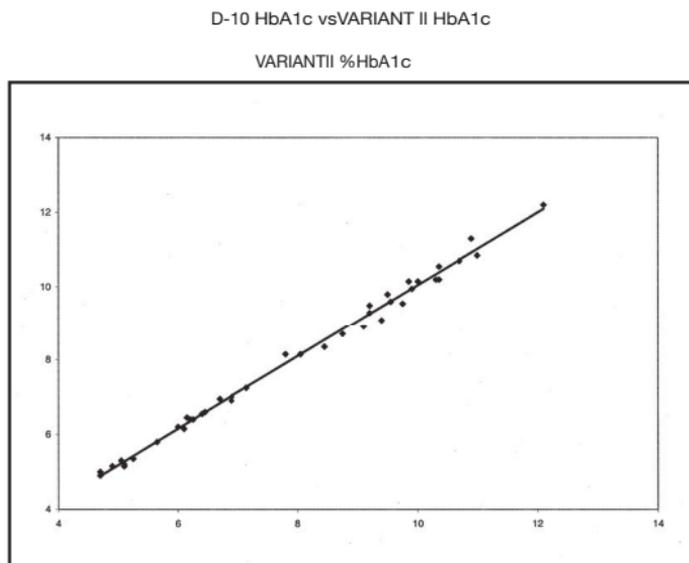


Figura 1. Correlação: Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 vs. Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do VARIANT II (H 270-2101)

## Linearidade/Recuperação

A fim de demonstrar a linearidade da medição do HbA<sub>1c</sub> no Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 para toda a variação relatável, amostras de HbA<sub>1c</sub> normal e diabética foram derivadas conforme segue:

- Normal:** Sangue total de uma amostra de um paciente normal foi suplementada com Nível 1 do Conjunto de Linearidade de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do Lyphochek da Bio-Rad para produzir um nível relativo de HbA<sub>1c</sub> de 3,8%.
- Diabética:** Sangue total de uma amostra de um paciente diabético foi suplementada com Nível 4 do Conjunto de Linearidade de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do Lyphochek da Bio-Rad para produzir um nível relativo de HbA<sub>1c</sub> de 18,5%.

A amostra diabética foi diluída com a amostra normal em várias proporções para produzir percentuais relativos de HbA<sub>1c</sub> específicos (percentual teórico de HbA<sub>1c</sub>). Essas amostras diluídas foram analisadas com o Programa de Hemoglobina A<sub>1c</sub> do D-10 (percentual observado de HbA<sub>1c</sub>). Recuperação percentual foi determinada ao dividir o percentual observado de HbA<sub>1c</sub> pelo percentual teórico de HbA<sub>1c</sub> e multiplicando o resultado por 100. Resultados do Estudo de Linearidade são mostrados na Tabela 2.

Contribuição %		% Teórico de HbA <sub>1c</sub>	% Observado de HbA <sub>1c</sub>	% Recuperação
Normal	Diabética			
100	0	3,8	3,8	100
80	20	6,6	6,6	100
67	33	8,6	8,5	99
50	50	11,0	11,0	100
33	67	13,5	13,2	98
20	80	15,4	15,2	99
0	100	18,5	18,5	100

Tabela 2. Resultados do Estudo de Linearidade e Recuperação.

### Substâncias Interferentes

- Íctericia, conforme indicado pelas concentrações de bilirrubina até 20 mg/dL, não interfere no ensaio.
- Lipemia, conforme indicado pelas concentrações de triglicérides até 5.680 mg/dL, não interfere no ensaio.

- Concentrações de Hemoglobina F de até 10% não interferem com o ensaio.
- Concentrações de Lábil A<sub>1c</sub> (LA1c/CHb-1) de até 4% não interferem com o ensaio.
- Concentrações de hemoglobina carbamila (LA1c/CHb-2) de até 3,5% não interferem com o ensaio.

## 16- FORMATO DE RELATÓRIO DE AMOSTRA

Diversos dos seguintes exemplos de relatório de amostra incluem as unidades de IFCC (mmol/mol) e NGSP (%) para HbA<sub>1c</sub>. Iniciando com a versão 3.60 do software do D-10, suas unidades laboratoriais preferidas de relato para resultados padronizados de HbA<sub>1c</sub> (ou seja, apenas NGSP ou NGSP e IFCC) podem ser configuradas no Software de Serviço do D-10 por um representante da Bio-Rad.

**OBS.:** Os exemplos de relatório de amostra com o resultado de HbA<sub>1c</sub> em % foram gerados apenas com o uso da versão 3.50 do software do D-10.

### Formato de relatório de amostra

#### Patient report

Bio-Rad	DATE: 09/23/2010
D-10	TIME: 09:16 AM
S/N: #DA3G222606	Software version: 3.57
Sample ID:	RACKB3-3-23-22-9-2010
Injection date	09/22/2010 11:45 AM Injection #: 23
Method: HbA1c	Rack #: B3 Rack position: 3

Peak	R.time	Height	Area	Area %
Unknown	0.14	8245	9082	0.3
A1a	0.20	6676	17769	0.5
A1b	0.28	8455	40358	1.2
F	0.44	5438	30425	0.9
LA1c/CHb-1	0.61	6180	46070	1.4
A1c	0.78	12575	125339	5.1
P3	1.36	32535	149519	4.5
A0	1.45	734587	2909750	87.4
Total Area:			3328311	

Concentration:	%	mmol/mol
A1c	5.1	32

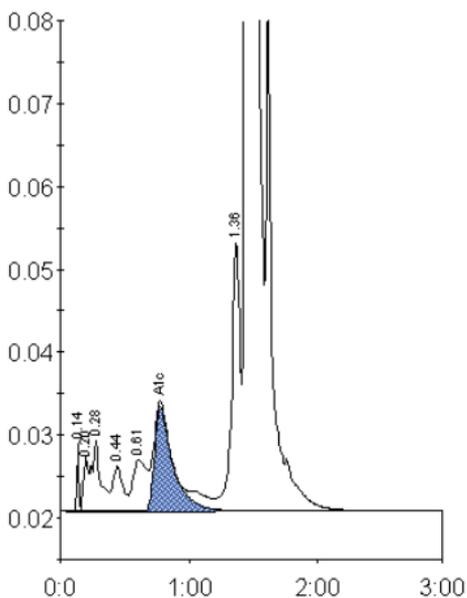


Figure 2. Non-Diabetic (Normal) Sample



## Formato de relatório de amostra

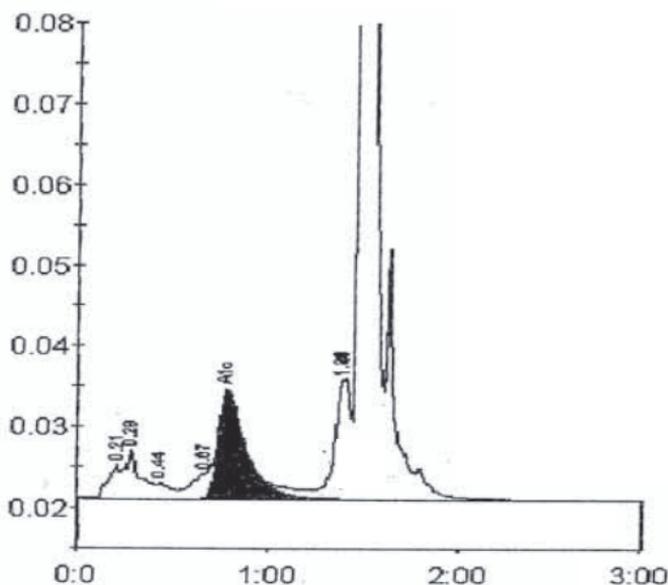


Figure 4. Split P3 Peak

### Control report

Bio-Rad

DATE: 03/23/2007

D-10

TIME: 04:03 PM

S/N: #DA5H505313

Software version: 3.50-1

Control ID:

33712

Injection date

11/08/2006 10:00 AM Injection #: 5

Method: HbA1c

Rack #: D4

Rack position: 5

Peak table - ID: A1CTRH

Peak	R.time	Height	Area	Area %
A1a	0.21	3951	17524	1.0
A1b	0.28	5794	31276	1.8
F	0.44	1852	11829	0.7
LA1c/CHb-1	0.67	3008	18783	1.1
A1c	0.79	13142	131154	10.3
P3	1.39	14754	56407	3.2
Unknown	1.41	14990	30733	1.8
A0	1.48	382268	1445140	82.9
Total Area:	1742844			

Concentration:	
% A1c	10.3

Control OK

## Formato de relatório de amostra

### Patient report

Bio-Rad

DATE: 01/25/2008

D-10

TIME: 04:03 PM

S/N: #DA5H505327

Software version: 3.50-A1

Sample ID:

00010

Injection date

01/25/2008 03:50 PM Injection #: 14

Method: HbA1c

Rack #: C1

Rack position: 2

### Peak table - ID: 00010

Peak	R.time	Height	Area	Area %
A1a	0.20	6503	24054	0.9
A1b	0.28	7981	47991	1.8
F	0.43	2600	16423	0.6
LA1c/CHb-1	0.63	6114	42262	1.6
LA1c/CHb-2	0.68	6802	54664	2.0
A1c	0.81	8536	109265	5.4
P3	1.36	34764	153264	5.7
A0	1.44	527758	2231123	83.3
Total Area:	2679047			

Concentration:	
% A1c	5.4

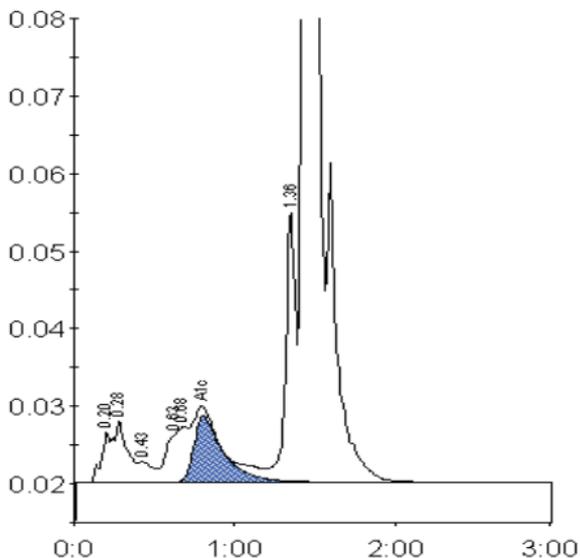


Figure 5. Labile A1c and Carbamylated Hemoglobin

## Formato de relatório de amostra

### Patient report

Bio-Rad

DATE: 12/15/2007

D-10

TIME: 04:04 AM

S/N: #DA4C323319

Software version: 3.50-A1

Sample ID: F-INTERFERENCE Injection date 10/29/2006

04:58 PM Injection #: 102

Method

Rack #: E3

Rack position: 2

Peak table - ID: F-INTERFERENCE

Peak	R.time	Height	Area	Area %
Unknown	0.14	4111	8862	0.4
A1a	0.25	8240	59580	2.4
F	0.47	12960	78089	3.1
LA1c/CHb-1	0.69	3470	22827	0.9
A1c	0.81	9755	97424	5.7
P3	1.39	20716	107715	4.3
A0	1.49	565969	2119338	85.0
Total Area:	2493835			

Concentration:	
% A1c	5.7

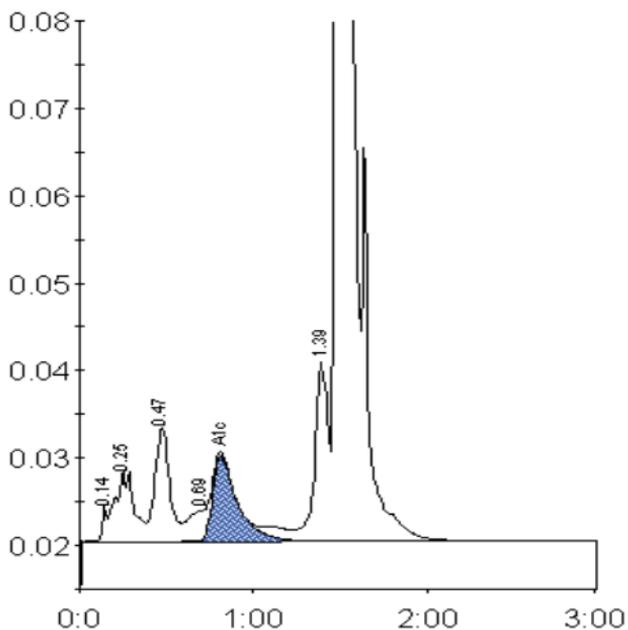


Figure 6. Patient Sample with Elevated HbF



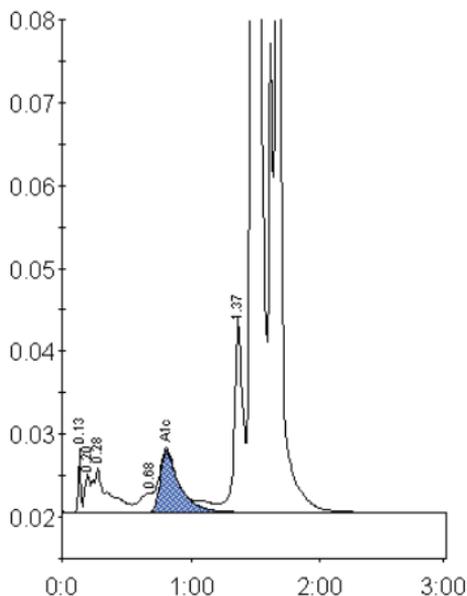


Figure 7. Patient Sample with Hemoglobin S Trait, or Sickle Cell Trait (AS)

## Formato de relatório de amostra

### Patient report

Bio-Rad

DATE: 09/23/2010

D-10

TIME: 02:57 PM

S/N: #DA3G222606

Software version: 3.57

Sample ID:

RACKC2-1-24-17-9-2010

Injection date

09/17/2010 11:18 AM Injection #: 24

Method: HbA1c

Rack #: C2

Rack position: 1

Peak table - ID: RACKC2-1-24-17-9-2010

Peak	R.time	Height	Area	Area %
Unknown	0.14	10208	13877	0.4
A1a	0.20	6542	23873	0.8
A1b	0.28	6573	24966	0.8
F	0.42	1810	12280	0.4
LA1c/CHb-1	0.67	2654	20186	0.7
A1c	0.79	8243	82393	5.1
P3	1.36	20991	104655	3.4
A0	1.46	470153	1979912	63.9
C-Window	1.79	407012	834752	27.0
Total Area:	3096895			

Concentration:	%	mmol/mol
A1c	5.1	32

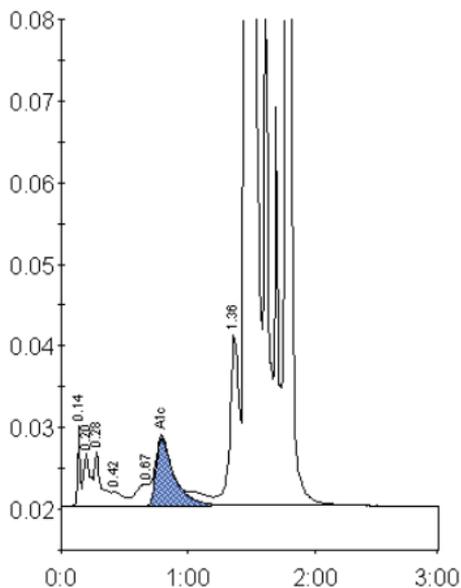


Figure 7. Patient Sample with Hemoglobin S Trait, or Sickle Cell Trait (AS)

## **17- INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DO PRODUTO**

### **Iniciador de Sangue Total e Calibrador 1 e 2 de Hemoglobina A<sub>1c</sub>**

**AVISO:** Estes produtos possuem um produto químico conhecido, no Estado da Califórnia, por causar defeitos de nascimento ou outros danos na reprodução. Contém Sulfato de Gentamicina a <0,1% e Tobramicina a <0,1%.

## **18- INFORMAÇÃO SOBRE MARCA REGISTRADA**

D-10, DIAMAT, VARIANT e Liquichek são marcas registradas da Bio-Rad Laboratories, Inc. Lyphochek é uma marca registrada da Bio-Rad Laboratories, Inc. MONOJECT é uma marca registrada da Covidien.

## **19- REFERÊNCIAS**

1. American Diabetes Association Home Page. <http://www.diabetes.org> (accessed Jan 2010).
2. Fowler, M. J. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clin. Diabetes* 2008, 26 (2), 77–82.
3. Shaw, J. E.; Sicree, R. A.; Zimmet, P. Z. Global Estimates of the Prevalence of Diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010, 87, 4–14.
4. Forsham, P. H. Diabetes Mellitus: A Rational Plan for Management. *Postgrad. Med.* 1982, 71,139–154.
5. Hollander, P. The Case for Tight Control in Diabetes. *Postgrad. Med.* 1984, 75, 80–87.
6. Baynes, J. W.; Bunn, H. F.; Goldstein, D.; Harris, M.; Martin, D. B.; Peterson, C.; Winterhalter, K. National Diabetes Data Group: Report of the Expert Committee on Glycosylated Hemoglobin. *Diabetes Care* 1984, 7, 602–606.
7. Nathan, D. M.; Singer, D. E.; Hurxthal, K.; Goodson, J. D. The Clinical Information Value of the Glycosylated Hemoglobin Assay. *N. Engl. J. Med.* 1984, 310, 341–346.
8. Mayer, T. K.; Freedman, Z. R. Protein Glycosylation in Diabetes Mellitus: A Review of Laboratory Measurements and of Their Clinical Utility. *Clin. Chim. Acta* 1983, 127, 147–184.

9. Rohlfing, C. L.; Little, R. R.; Wiedmeyer, H. M.; England, J. D.; Madsen, R.; Harris, M. I.; Flegal, K. M.; Eberhardt, M. S.; Goldstein, D. E. Use of GHb (HbA1c) in Screening for Undiagnosed Diabetes in the U.S. Population. *Diabetes Care* 2000, 23, 187–191.

10. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Home Page. <http://www.ifcchba1c.net> (accessed Jan 2010).

11. Hoelzel, W.; Weykamp, C.; Jeppsson, J. O.; Miedema, K.; Barr, J. R.; Goodall, I.; Hoshino, T.; John, W. G.; Kobold, U.; Little, R.; Mosca, A.; Mauri, P.; Paroni, R.; Susanto, F.; Takei, I.; Thienpont, L.;

Umemoto, M.; Wiedmeyer, H. M.; IFCC Working Group on HbA1c Standardization. IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in Human Blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method-Comparison Study. *Clin. Chem.* 2004, 50 (1), 166–174.

12. American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and International Diabetes Federation. Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1c Measurement. *Diabetes Care* 2007, 30 (9), 2399–2400.22 Instruction Manual L20012105

13. Sacks, D. B.; Bruns, D. E.; Goldstein, D. E.; Maclaren, N. K.; McDonald, J. M.; Parrott, M. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clin. Chem.* 2002, 48 (3), 436–472.

14. Williams, J. L. Anemias of Abnormal Globin Development—Thalassemias. In *Clinical Hematology:*

*Principles, Procedures, Correlations*, 2nd ed.; Stiene-Martin, E. A., Lotspeich-Steininger, C. A., Koepke, J. A., Eds.; Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, PA, 1998; pp 217–240.

15. Panzer, S.; Kronik, G.; Lechner, K.; Bettelheim, P.; Neumann, E.; Dudczak, R. Glycosylated Hemoglobins (GHb): An Index of Red Cell Survival. *Blood* 1982, 59, 1348–1350.

16. American Diabetes Association. Standards of Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2001, 24 (Suppl. 1), 33–43.





**Bio-Rad Laboratories**  
2000, Alfred Nobel Drive  
Hercules, CA 94547  
United States

**Bio-Rad Laboratorios Brasil Ltda.**

Rua Alfredo Albano da Costa - 100 - salas 1, 2 e 3

CEP: 33.400-000 - Lagoa Santa - MG - Brasil

CNPJ: 03.188.198/0001-77

Tel: (31) 3689-6600



08/2010

Código: 881060