

**Universidade Federal do Rio Grande Do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós - Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia**

**Mestrado e Doutorado**

**Determinação da Glico-hemoglobina: Relação com a  
glicemia e aspectos analíticos**

**Joíza Lins Camargo**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Gross**

Porto Alegre, Setembro de 2003.

*Para Afonso,  
Marina e Júlia,  
por serem as razões da minha vida.*

*Para os pacientes, que exercem  
a árdua tarefa diária de controlar o diabetes melito.*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Gross, por sua dedicação, por todo o apoio, estímulo e amizade ao longo de todos estes anos. O seu brilhante exemplo de professor, pesquisador e médico é um pilar fortalecedor da minha formação como pesquisadora. Ter recebido sua orientação foi um privilégio.

À minha amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sandra Silveiro, por ter guiado meus primeiros passos para dentro do mundo da pesquisa científica, por ter acreditado no laboratório e ter me amadrinhado no "Grupo da Nefropatia Diabética".

A todos os meus colegas da Unidade de Bioquímica, bioquímicos e práticos, pela inestimável colaboração, amizade e dedicação durante todos estes anos. Pela paciência e entendimento, durante meus períodos de ausência. Pela presteza e profissionalismo ao realizar os testes bioquímicos, armazenar amostras e arquivar dados brutos.

Ao meu esposo, companheiro, amigo e colega Afonso, pelo amor, carinho e estímulo em todos os momentos da minha vida. Seu apoio irrestrito foi fundamental para a realização deste trabalho. Seu exemplo como profissional e pesquisador é um estímulo para seguir em frente.

Às minhas amadas filhas, Marina e Júlia, pela compreensão e paciência, nos dias em que o parque, o cinema e as brincadeiras ficaram para mais tarde.

À minha maravilhosa família, minha mãe Ariza, minha irmã Aline, minha avó Clô, Lena e Denzi pelo amor e carinho incondicionais, sempre presentes na minha vida. Ao meu pai, Jofre, que apesar de não estar em corpo presente, guiou e iluminou todos os meus caminhos.

Às Dras Randie Little e Hsiao Mei Windemeyer, do "National Glycohemoglobin Standardization Program - NGSP", pelas sugestões e dosagens de GHb, que enriqueceram este trabalho. Pela amigável e gentil acolhida, na sede do NGSP, em Columbia, Missouri.

Às minhas queridas Roses, a "poderosa" e a "valente", do Serviço de Endocrinologia e do Serviço de Patologia Clínica, pelo secretariado, pela amizade e pelos bons momentos que compartilhamos nestes últimos anos.

A todos os meus colegas e amigos do Serviço de Endocrinologia e do Serviço de Patologia Clínica, pelo carinho e amizade.

À Mariane Felisberto, pela amizade e contribuição valiosa na execução dos experimentos que constituíram o capítulo I.

Ao doutorando Jonathas Stiff, pela imensa ajuda no recrutamento e acompanhamento dos voluntários que participaram do estudo de interferência de drogas.

Às minhas amigas Carmen Pilla, Rosalva e Neide pela parceria e companheirismo ao longo destes anos.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estudo.

## **Conteúdo**

Agradecimentos _____	<b>iii</b>
Abreviaturas _____	<b>vii</b>
Lista de Tabelas _____	<b>ix</b>
Lista de Figuras _____	<b>xi</b>
Resumo _____	<b>xii</b>
Abstract _____	<b>xiii</b>

### **Capítulo I** **1**

#### **Introdução**

##### **Glico-hemoglobina: relação com a glicemia e aspectos analíticos**

Importância e Epidemiologia do Diabetes Melito _____	<b>2</b>
Uso Clínico da GbH/HbA <sub>1c</sub> _____	<b>5</b>
Valor ideal de HbA <sub>1c</sub> : qual o objetivo do tratamento? _____	<b>11</b>
Reação de glicação não-enzimática e GHb _____	<b>14</b>
Relação da Glicose e GHb _____	<b>18</b>
Métodos para Dosagem da GHb/HbA <sub>1c</sub> _____	<b>22</b>
Padronização e Harmonização dos Resultados _____	<b>29</b>
Fatores que Afetam os Resultados _____	<b>35</b>
Comentários Finais _____	<b>39</b>
Referências _____	<b>40</b>

### **Objetivos** **52**

### **Capítulo II** **53**

#### **Effect of Pre - Analytical Variables on Glycohemoglobin Measurements in Routine Clinical Care**

Sinopse _____	<b>55</b>
Abstract _____	<b>56</b>
Introduction _____	<b>57</b>
Material and Methods _____	<b>59</b>

Results	61
Discussion	62
References	70

***Capítulo III*** 73

**Conditions associated with very low values of glycohemoglobin measured by a HPLC method**

Sinopse	75
Abstract	76
Introduction	77
Materials And Methods	79
Results	82
Discussion	84
References	92

***Capítulo IV*** 96

**Effect of Aspirin, Vitamin C and E on HbA<sub>1c</sub> Assays**

Sinopse	98
Abstract	99
Introduction	100
Research Design And Methods	102
Results	105
Conclusions	106
References	112

***Considerações Finais*** 115

### ***Abreviaturas***

3SI: 3 h saline incubation at 37°C

3WBI: 3 h whole blood incubation at 37°C

6SI: 6 h saline incubation at 37°C

6WBI: 6 h whole blood incubation at 37°C

AACC: American Association of Clinical Chemistry

AADE: American Association of Diabetes Educators

ACE: American College of Endocrinology

ADA: American Diabetes Association

CAP: College of American Pathology

CV: coeficiente de variação

DCCT: Diabetes Control and Complications Trial

DCV: doença cardiovascular

DGKC: Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie

DM: Diabetes Mellito

EDTA: Etileno diamino tetra acetato

GHb: glico-hemoglobina/HbA<sub>1c</sub>/A<sub>1c</sub>

Hb: hemoglobina

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Ht: hematócrito

IAM: Infarto agudo do miocárdio

IDF: International Diabetes Federation

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry

L-A<sub>1c</sub>: HbA<sub>1c</sub> labile fraction, fração lábil da GHb

NACB: National Academy of Clinical Biochemistry

NDDG: National Diabetes Data Group

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program

OMS: Organização Mundial de Saúde

POCT: Point of Care Testing

SBAC: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

SBPC: Sociedade Brasileira de Patologia Clínica

UKEQAS: United Kingdom External Quality Assurance Scheme

UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study



## **Lista de Tabelas**

### **Capítulo I**

Tabela 1: Complicações crônicas do diabetes e algumas proteínas glicadas envolvidas em sua patogenia. _____	10
Tabela 2: Evidências relevantes da relação da GHb com as complicações do DM. _____	10
Tabela 3: Composição da hemoglobina normal em adultos. _____	17
Tabela 4: Valores aproximados de glicemia média e os valores correspondentes de HbA <sub>1c</sub> para uso clínico. _____	21
Tabela 5: Métodos para dosagem de glicohemoglobina no laboratório clínico. _____	27
Tabela 6: Distribuição e frequência dos diferentes métodos para dosagem de GHb em Programas Externos Internacionais da Garantia da Qualidade. _____	28
Tabela 7: Relação dos valores de HbA <sub>1c</sub> dados por métodos NGSP/DCCT e método referência IFCC. _____	32

### **Capítulo II**

Table 1: Comparison of 5 methods to eliminate labile fraction prior to analysis. _____	66
Table 2: Glycohemoglobin results in whole blood samples stored under different conditions over time _____	67

### **Capítulo III**

Table 1: Characteristics of patients and results of Hb, Ht and HbA <sub>1c</sub> in a group of diabetic patients with very low values of GHb in southern Brazil. _____	89
--	----

**Capítulo IV**

Table 1: Baseline characteristic of 27 non-diabetic volunteers enrolled in the study.	110
Table 2: HbA <sub>1c</sub> results in non-diabetic volunteers before, during and after vitamin C, vitamin E and aspirin (ASA) treatment for 4 months.	111
Table 3: Within - subject variation on HbA <sub>1c</sub> levels in non - diabetic individuals during treatment with vitamin C, E and aspirin (ASA).	112

## **Lista de Figuras**

### **Capítulo I**

Figura 1: Número de requisições mensais de GHb na Unidade de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. _____	4
Figura 2: Reação de glicação não-enzimática da hemoglobina. _____	16
Figura 3: Princípio dos métodos utilizados para dosar GHb. _____	26
Figura 4: Correlação entre os diferentes métodos para dosagem de GHb. _____	33
Figura 5: Erro relativo das fórmulas de conversão. _____	34
Figura 6: Diferenças na seqüência N-terminal da cadeia $\beta$ das hemoglobinas anômalas mais comuns e a hemoglobina A. _____	38

### **Capítulo II**

Figure 1: Comparison of 5 methods to eliminate the labile fraction prior to analysis. _	68
Figure 2: Effect of temperature storage on glycohemoglobin results from whole blood samples. _____	69

### **Capítulo III**

Figure 1: Flow diagram of research protocol used to identify conditions associated with very low GHb values. _____	90
Figure 2: Summary of conditions associated with very low GHb values in a group of diabetic patients in southern Brazil. _____	91
Figure 3: Glycohemoglobin, hemoglobin and hematocrit values in patient presenting very low GHb levels. _____	92

## Resumo

A glico-hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>) é um parâmetro importante no controle glicêmico de pacientes diabéticos. Vários estudos clínicos mostraram claramente que a melhora no controle glicêmico está fortemente associada com a diminuição no desenvolvimento e/ou progressão das complicações microvasculares do diabetes. A medida exata e precisa da HbA<sub>1c</sub> é uma questão importante para os laboratórios clínicos. Vários fatores afetam os resultados e podem levar a resultados errôneos. Este trabalho analisou o efeito de fatores analíticos, estados patológicos e drogas nos resultados de HbA<sub>1c</sub>.

Em um primeiro estudo, demonstramos que a fração lábil de HbA<sub>1c</sub> contribui significativamente para o resultado final. Quando esta fração é separada inadequadamente, há a necessidade de um pré - tratamento na amostra, para evitarmos valores falsamente elevados. O armazenamento das amostras é um fator pré – analítico importante. Amostras mantidas sob refrigeração são estáveis por 10 dias e o armazenamento a longo prazo deve ser feito a – 80°C. No entanto, amostras congeladas a –20°C apresentam uma diminuição significativa nos valores de HbA<sub>1c</sub>, já nas primeiras 24h de armazenamento. Em um segundo estudo, relatamos que as hemoglobinas anômalas estão associadas com valores muito baixos de HbA<sub>1c</sub>. Adicionalmente, também demonstramos que a anemia é uma importante fonte de interferência negativa nos resultados. Sugerimos que, para a correta interpretação dos valores de HbA<sub>1c</sub>, o estado hematológico do paciente seja sempre considerado. Em um terceiro estudo, analisamos o uso crônico de aspirina, vitamina C e vitamina E nos níveis de HbA<sub>1c</sub>. Houve inexistência de efeito significativo nos resultados de HbA<sub>1c</sub>, medidos por 3 métodos rotineiramente utilizados pelos laboratórios clínicos, em indivíduos não - diabéticos.

O clínico deve conhecer os fatores que afetam a determinação de HbA<sub>1c</sub> na população atendida e os resultados discordantes com a história clínica do paciente devem ser sempre investigado.

## **Abstract**

Glycohemoglobin (GHb) has a key role in the assessment of glycemic control in diabetic patients. Several studies have clearly shown that improved glycemic control is strongly associated with decreased development and/or progression of diabetic microvascular complications in both type 1 and 2 diabetes mellitus. Therefore accurate determination of GHb concentration is an important issue for clinical laboratories. Several factors may affect the results and lead to erroneous results. This study analysed the effect of analytical factors, pathologic conditions and drugs on HbA<sub>1c</sub> results.

In a first study we related that labile HbA<sub>1c</sub> fraction, if not adequately separated, is a positive interference on final HbA<sub>1c</sub> results. In this cases a pre-treatment to removal this fraction is needed. Storage condition is also an important pre-analytical factor. Samples kept at 4°C are stable for ten days and storage at -80°C is preferred for long-term storage. Sample stored at -20°C showed statistically significant lower HbA<sub>1c</sub> concentration by one day of storage. In another study we related that the presence of anomalous hemoglobin is associated with very low values of HbA<sub>1c</sub>. Additionally, we demonstrated that anemia is an important source of negative interference. Hematological status should always be considered to ensure the correct interpretation of GHb results. In a third study we investigate the effect of usual doses of aspirin, vitamin C and E on HbA<sub>1c</sub> levels. These drugs do not affect HbA<sub>1c</sub> results measured by three different assays, two HPLCs and one immunoassay, in a group of non-diabetic volunteers.

Clinicians must be aware of all pitfalls to avoid adding more confusion to the clinical interpretation of HbA<sub>1c</sub> values and discrepancies between clinical impressions and laboratory data should be always investigate.

## **Capítulo I**

### **Introdução**

***Glico-hemoglobina: relação com a glicemia e aspectos analíticos***

Artigo de Revisão submetido para publicação ao *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, com algumas modificações, Outubro de 2003.

## Capítulo I

### INTRODUÇÃO

#### ***Importância e Epidemiologia do Diabetes Melito***

O diabetes melito (DM) é uma doença metabólica crônica que se caracteriza, primariamente, por hiperglicemia e pode apresentar complicações micro e macrovasculares. A forma mais prevalente da doença (90% dos casos) é o DM tipo 2, que se caracteriza por deficiência e/ou resistência insulínica. O DM tipo 1 está presente em 10% dos casos e é causado por uma deficiência absoluta de insulina, devido à destruição auto-imune ou idiopática das células  $\beta$  do pâncreas (1). Nos últimos anos, esta doença tem alcançado proporções epidêmicas em vários países e é atualmente um dos maiores problemas mundiais de saúde.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2), no ano de 2000 mais de 170 milhões de pessoas eram portadoras de DM em todo o mundo. Estima-se que este número aumente progressivamente, totalizando 370 milhões de indivíduos em 2030, a maioria deles com DM tipo 2.

A prevalência da doença em indivíduos brasileiros entre 30 e 64 anos de idade é de 7,0 e 8,9%, em homens e mulheres respectivamente (2). No Brasil, atualmente, existem mais de 4,5 milhões de pacientes diabéticos e estima-se que em 30 anos este número chegará a mais de 10 milhões de pessoas.

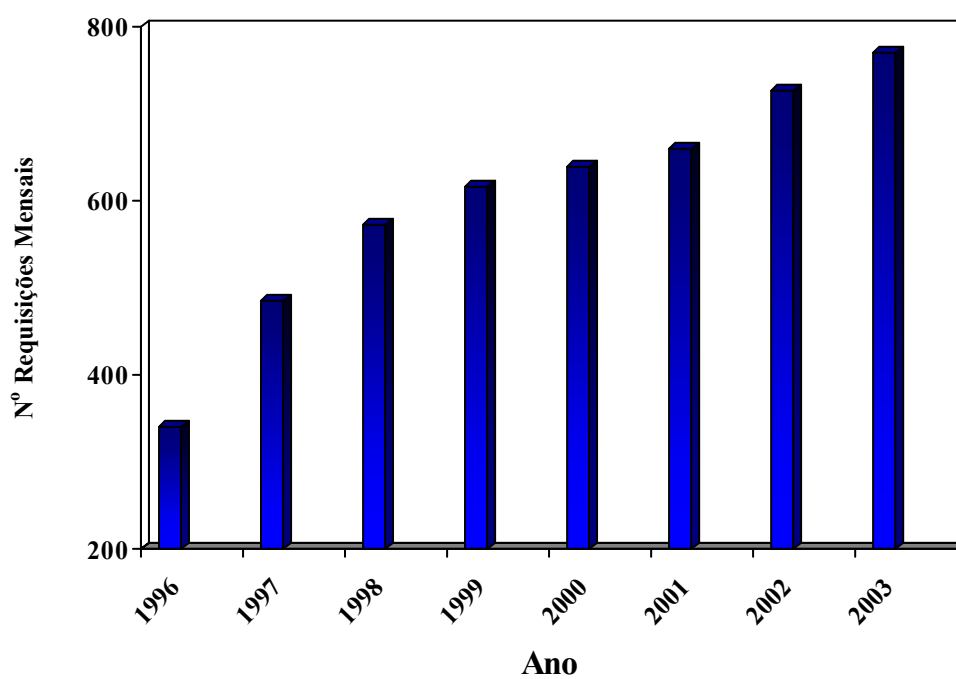
O DM pode se acompanhar de complicações crônicas micro e macrovasculares que estão associadas a elevada morbidade e mortalidade. A nefropatia diabética acomete mais de um terço dos pacientes e é a causa mais comum de doença renal terminal e

ingresso em programas de hemodiálise (3). As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por mais de 50% das mortes em pacientes diabéticos tipo 2 e também por 30% das internações em centros de tratamento intensivo (3). O DM tipo 2 é considerado um fator de risco isolado, independente dos fatores de riscos clássicos como hipercolesterolemia, hipertensão e fumo, para DCV (4). Quando associados, estes fatores estão relacionados com uma maior prevalência de complicações crônicas em pacientes diabéticos tipo 2 (5). O tratamento destas complicações consome parte significativa do orçamento destinado à assistência médica (6).

O entendimento da patogênese e a prevenção e/ou retardamento destas complicações tem sido o maior objetivo das pesquisas em DM nas últimas décadas.

Os níveis glicêmicos são um fator determinante do desenvolvimento e progressão das complicações do DM (7,8). A medida da glico-hemoglobina (GHb) é o parâmetro de referência para avaliar o grau do controle glicêmico em pacientes diabéticos (9). A Associação Americana de Diabetes (ADA) recomenda que a GHb seja medida regularmente em todos os pacientes a intervalos de 4 a 6 meses (10). Considerando a alta prevalência do DM e o impacto das complicações da doença na sociedade, a dosagem da GHb é um dos procedimentos mais importantes no laboratório clínico atual. O número de requisições deste analito tem aumentado consideravelmente nos últimos dez anos e os laboratórios devem estar preparados para fornecer resultados exatos e precisos de GHb, para ajudar o clínico a prevenir e manejar as complicações do DM. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o número médio de requisições mensais para GHb era 340 em 1996 e aumentou para 750 em 2003, indicando um aumento de 120% no número de exames realizados mensalmente (dados da Unidade de Bioquímica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Figura 1).





**Figura 1:** Número de requisições mensais de GHb na Unidade de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre ( $P$  for trend < 0,0001).

### **Uso Clínico da GHb/HbA<sub>1c</sub>**

A associação entre os níveis elevados de glicemia e o aparecimento das complicações diabéticas crônicas tem sido muito estudada. O acúmulo de produtos protéicos glicosados nos diferentes tecidos, oriundos de reações de glicação não-enzimática – denominada reação de Maillard, é um dos mecanismos patogênicos pelo qual a hiperglicemia pode levar às disfunções que acompanham o DM (Tabela 1). Alterações estruturais e funcionais de diversas proteínas glicosadas foram relatadas *in vivo* e *in vitro* (11-13). A glicação de componentes da matriz extracelular pode ser um mecanismo importante de modulação nas trocas celulares e na fosforilação de moléculas sinalizadoras intracelulares. Também pode alterar a expressão de determinadas proteínas e seus moduladores alterando o comportamento celular (14-16). A matriz extracelular de pacientes diabéticos apresenta maior grau de glicação do que a de pacientes não-diabéticos. Alterações estruturais da matriz extracelular e o acúmulo de produtos de glicação estão associados ao desenvolvimento de complicações do DM (17-18). Estas alterações estruturais são lentas e acumulativas, favorecendo o aparecimento de complicações a longo-prazo, que podem atingir diversos órgãos, alterando as funções renais, visuais, nervosas e cardíacas. Como o desenvolvimento destas complicações está relacionado com o aumento na formação e acúmulo de produtos da glicação não-enzimática nos tecidos, métodos que possam medir ou estimar o grau de extensão da glicação são ferramentas necessárias para auxiliar no manejo terapêutico do DM.

As dosagens de GHb foram disponibilizadas no laboratório clínico no início da década de 80 (19). O teste foi logo introduzido na prática clínica para auxiliar no manejo dos pacientes diabéticos (20). No entanto, foi apenas na década de 90 que o

verdadeiro valor clínico desta dosagem laboratorial ficou definitivamente estabelecido a partir de dois grandes ensaios clínicos (7-8), que analisaram o papel do controle intensivo da glicemia no desenvolvimento das complicações crônicas do DM. O parâmetro utilizado para avaliar o controle glicêmico foi a GHb.

A importância do controle glicêmico no manejo e acompanhamento do paciente diabético foi primeiramente confirmada pelos resultados do “Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)” que foram publicados em 1993 (7). O risco para o desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do DM foi intimamente relacionado com o grau do controle glicêmico, medido pela GHb, fração HbA<sub>1c</sub>. Os resultados do DCCT determinaram a relação dos valores de HbA<sub>1c</sub> com a glicemia média e estabeleceram objetivos a serem atingidos em pacientes diabéticos tipo 1. Neste estudo, foram selecionados 1441 pacientes com DM tipo 1, que foram aleatoriamente designados para receber tratamento convencional (1 ou 2 doses diárias de insulina com monitoramento diário da glicemia/glicosúria) ou tratamento intensivo (múltiplas injeções diárias de insulina e múltiplas medidas diárias da glicemia capilar). Após uma média de 6,5 anos de seguimento, o grupo que foi tratado intensivamente apresentou uma mediana de HbA<sub>1c</sub> de 7% e o grupo que teve tratamento convencional uma mediana de HbA<sub>1c</sub> de 9%. Houve uma redução de 76%, 39%, 54% e 60% no risco de desenvolver retinopatia, microalbuminúria, proteinúria e neuropatia clínica, respectivamente, no grupo que foi tratado intensivamente comparado com o grupo que teve tratamento convencional. Houve também uma diminuição da progressão de retinopatia naqueles pacientes que já apresentavam evidências desta complicação ao iniciarem o estudo. Também foi observado, um aumento exponencial no desenvolvimento destas complicações, com o aumento dos níveis de HbA<sub>1c</sub>.

O estudo “Epidemiologic Diabetes Interventions and Complications - EDIC” (21), acompanhou por mais 6 anos a coorte de pacientes que participou do DCCT. Os resultados mostraram que os pacientes que tiveram tratamento convencional melhoraram o controle glicêmico. Os níveis de HbA<sub>1c</sub> diminuíram de 9%, no final do estudo em 1993, para aproximadamente 8%. Entretanto, os indivíduos que tiveram tratamento intensivo pioraram o controle glicêmico, aumentando os valores de HbA<sub>1c</sub> para 7,9%. Portanto, os níveis de HbA<sub>1c</sub>, 6 anos após o término do DCCT, foram iguais nos dois grupos. No entanto, a redução de risco para retinopatia e nefropatia permaneceu a mesma no grupo que havia sido tratado intensivamente. O efeito da terapia intensiva persistiu 4-6 anos após o término do tratamento, embora tivesse havido um aumento dos níveis de HbA<sub>1c</sub>.

Os resultados do DCCT foram confirmados pelo “United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS)” em 1998 (8), em pacientes com DM tipo 2. Este estudo recrutou 5102 pacientes diabéticos tipo 2 em 23 centros britânicos. Após randomização para diferentes grupos de tratamento, eles foram seguidos, em média, 10 anos. Similarmente aos resultados do DCCT, este estudo também mostrou que a intensificação do tratamento da hiperglicemia reduz a incidência das complicações. Para cada 1% de decréscimo absoluto em HbA<sub>1c</sub>, houve diminuição de 35%, 25% e 7% no risco de complicações microvasculares, mortes relacionadas ao DM e mortes em geral, respectivamente.

Em geral, estes ensaios clínicos demonstraram que a cada decréscimo absoluto de 1% em HbA<sub>1c</sub>, há uma redução de 30 a 35% no risco de complicações microvasculares do DM.

Esta mesma relação entre níveis de HbA<sub>1c</sub> e o desenvolvimento das complicações crônicas do DM também foi observada em outros ensaios clínicos publicados nas últimas décadas (22-29). Os principais achados destes estudos estão resumidos na Tabela 2.

Dois estudos com menor número de pacientes, Oslo (22) e Stockholm (23), após aproximadamente 7 anos de acompanhamento, relataram resultados similares aos do DCCT em pacientes diabéticos tipo 1. Nestes dois estudos, os pacientes tratados mais intensivamente com insulina, apresentaram taxas menores de excreção urinária de albumina.

Em DM tipo 2, além do UKPDS, outros estudos descreveram a mesma relação do grau de controle glicêmico com o risco de complicações (24-26). O estudo epidemiológico "Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESTDR)", demonstrou que existe uma correlação direta entre os níveis elevados de HbA<sub>1c</sub> e a incidência e/ou progressão de complicações em pacientes diabéticos tipo 1 e 2 (27).

Embora a maioria dos estudos não tenha sido primariamente delineada para estabelecer a relação entre controle glicêmico e DCV, análises de subgrupos de dados nas coortes do DCCT e UKPDS mostraram uma associação fortemente sugestiva entre controle glicêmico e doença macrovascular. Devido aos pacientes serem jovens, a taxa de eventos cardíacos foi baixa no grupo do DCCT. Mesmo assim, houve um maior número de eventos no grupo que foi tratado convencionalmente, quando comparado com o grupo que teve tratamento intensivo ( $P = 0,08$ ). Na coorte do UKPDS, a taxa de eventos cardiovasculares foi alta. Houve uma redução de 18% nos casos de infarto agudo do miocárdio (IAM) no grupo de pacientes que teve tratamento intensivo, mas este achado apresentou significância estatística limítrofe ( $P = 0,052$ ). Quando o grupo

foi observado como um todo, houve uma relação altamente significativa entre HbA<sub>1c</sub> e o risco de DCV nestes pacientes. Apenas um estudo (28) relatou aumento da incidência de doença macrovascular em pacientes diabéticos tipo 2 tratados intensivamente. Neste estudo, o grupo selecionado tinha DM por vários anos. Estes dados sugerem que, o efeito do controle glicêmico pode ser diferente em pacientes no estado inicial da doença, como os pacientes do UKPDS, e em pacientes com mais de 10 anos de duração do DM. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar esta relação.

Na população de indivíduos não-diabéticos, níveis elevados de GHb/HbA<sub>1c</sub> também são marcadores de risco cardiovascular, de eventos e mortalidade. A coorte de Norfolk (29) apresentou um aumento no risco de doença macrovascular com o aumento dos níveis de HbA<sub>1c</sub> nos indivíduos sem DM.

Com base nas evidências acima, pode-se concluir que níveis elevados de GHb/HbA<sub>1c</sub> estão associados, em todas as populações estudadas, com aumento das complicações do DM, ou seja, a HbA<sub>1c</sub> é um marcador do risco de complicações no DM. O tratamento dos pacientes com DM deve portanto procurar atingir os níveis mais próximos do normal possível da homeostase glicêmica e o grau do controle glicêmico deve ser avaliado pela medida da GHb/HbA<sub>1c</sub>.

**Tabela 1:** Complicações crônicas do diabetes e algumas proteínas glicadas envolvidas em sua patogenia.

<b>Complicação</b>	<b>Proteínas</b>
Catarata	Cristalino
Nefropatia	Membrana Basal Glomerular Fibronectina Colágeno tipo IV
Aterosclerose	LDL – colesterol HDL – colesterol
Eventos Tromboembolíticos	Fibrinogênio Proteínas Plaquetárias
Neuropatia	Mielina

**Tabela 2:** Evidências relevantes da relação da GHb com as complicações do DM.

Estudo	Tipo de DM	N	Principais Achados *	Diferença % HbA <sub>1c</sub> entre grupos
DCCT (7)	1	1441	Redução no risco de retinopatia em 76%, microalbuminúria em 39%, proteinúria em 54%, doença macrovascular** em 41% nos pacientes com terapia intensiva.	1,9
UKPDS (8)	2	5102	Redução na progressão da proteinúria, redução no risco de retinopatia em 12%, mortes relacionadas ao DM em 10%, mortes geral em 6% no grupo com terapia intensiva.	0,9
Kumamoto (24)	2	102	Redução no risco de retinopatia em 67%, nefropatia em 66% e neuropatia clínica em 64% no grupo com terapia intensiva.	2,3
WESDTR (27)	1 e 2	2366	HbA <sub>1</sub> (quartis e quintis) foi forte determinante da incidência/progressão de retinopatia e positivamente relacionada com a incidência de proteinúria em 10 anos.	-
Oslo (22)	1	45	Pacientes em terapia convencional apresentaram maior excreção urinária de albumina.	-
Stockholm (23)	1	102	Redução no desenvolvimento de retinopatia em 25% e nefropatia em 16% nos pacientes com tratamento intensivo.	1,4
Wu et al (25)	2	137	Redução no desenvolvimento de retinopatia em 34%. Duas vezes menor risco de morte após 5 anos de diálise, e diminuição da mortalidade e morbidade cardiovascular no grupo com HbA <sub>1c</sub> mais baixa.	3,6
Ravid et al (26)	2	574	Cada % de aumento em HbA <sub>1c</sub> foi associado com aumento da incidência de albuminúria. Pacientes no quintil mais alto de HbA <sub>1c</sub> apresentaram maior risco (14.75) de eventos cardiovasculares	-
Norfolk (29)	Com e sem DM	4662	1% de redução em HbA <sub>1c</sub> está associado com diminuição no risco de morte por doença cardiovascular no grupo com níveis de HbA <sub>1c</sub> > 5%.	-

\* grupo com terapia intensiva vs grupo com terapia convencional ou entre diferentes percentiles de HbA<sub>1c</sub>. \*\*P = 0,052



**Valor ideal de HbA<sub>1c</sub>: qual o objetivo do tratamento?**

A medida da GHb é um teste de rotina para o manejo clínico do DM. O tratamento deve ter como objetivo a normalização dos níveis glicêmicos. Baseado nos dados do DCCT e UKPDS (7,8), recomenda-se atingir valores de HbA<sub>1c</sub> < 7,0% (9,10). Este foi o valor alcançado pelos pacientes tratados intensivamente nos ensaios clínicos e abaixo do qual há uma diminuição considerável das complicações crônicas. A ADA recomenda que medidas terapêuticas adicionais devem ser implantadas quando os valores excederem a 8,0% (10). Devido a essa última recomendação, muitos clínicos não tratam o DM tão agressivamente como deveriam, e deixam para intensificar o controle glicêmico só quando com valores de HbA<sub>1c</sub> > 8,0%. Conseqüentemente, os valores de HbA<sub>1c</sub>, na maioria dos pacientes, estão acima da meta de 7,0% preconizada. Devido a isso, a meta para HbA<sub>1c</sub> recomendada pela Federação Internacional de Diabetes (IDF European Policy Group), com o respaldo do Colégio Americano de Endocrinologia (ACE) (30, 31), é 6,5%. O UKPDS mostrou que o risco de ocorrer complicações micro e macrovasculares é maior para os valores de HbA<sub>1c</sub> > 6,5% (8). Este valor se constitui de três desvios padrões (3DP) acima da média de HbA<sub>1c</sub> para populações não – diabéticas. Estudos indicam que valores elevados de HbA<sub>1c</sub>, ainda que dentro dos limites normais, já estão associados com desenvolvimento de complicações, principalmente cardiovasculares, em coortes sem diabetes (29).

A Academia Nacional de Bioquímica Clínica (NACB), respaldada pela ADA, recomenda que a determinação de HbA<sub>1c</sub> seja feito pelo menos duas vezes ao ano em todos os pacientes portadores de diabetes tipo 1 e 2 (9). Este intervalo deve ser menor, a cada 3 ou 4 meses, para aqueles pacientes que não atingem o controle glicêmico desejável.

Um aspecto importante a ser observado é que muitos pacientes desconhecem a existência do teste  $A_{1c}$  e, conseqüentemente, não sabem que existem metas a serem atingidas. Dados norte-americanos (32) revelam que cerca de 40% dos pacientes diabéticos não tem o teste  $A_{1c}$  realizado na freqüência recomendada. Aqueles que têm o teste realizado, apresentam níveis  $> 8\%$  em mais de 50% dos casos. Estes dados não surpreendem, pois os pacientes que foram recrutados para participar da maioria dos ensaios clínicos apresentavam valores de  $HbA_{1c}$  ao redor de 9% na época da seleção (7,8).

O conhecimento dos médicos e pacientes sobre o teste tem um papel importante no manejo clínico. Recentemente, campanhas nacionais americanas, promovidas por órgãos públicos e privados, foram lançadas com o objetivo de divulgar o teste e orientar sobre a interpretação dos resultados. A campanha “*The Diabetes  $A_{1c}$  initiative™*”, promovida pela Associação Americana de Educadores em Diabetes (AADE), foi lançada nacionalmente no Dia Mundial do Diabetes (14 de novembro) do ano passado. Com o slogan “Aim. Believe. Achieve.”, o objetivo da campanha foi alertar e educar os pacientes diabéticos para alcançar valores de  $HbA_{1c} < 7\%$ , e com isso baixar os riscos de complicações do DM.

No Brasil, não existem dados sobre a disponibilidade do teste nos laboratórios. Também não há informação sobre o conhecimento, por parte dos pacientes, da importância e necessidade de realizar o teste  $A_{1c}$ . A Sociedade Brasileira de Diabetes recomenda que o teste  $A_{1c}$  seja feito regularmente, no mínimo duas vezes ao ano, e os valores devem ser mantidos no limite superior do intervalo de referência do método utilizado para dosagem (33).

Clínicos e pacientes devem entender bem o significado da  $GHb/HbA_{1c}$ , e saber

sobre as limitações que envolvem a dosagem, para garantir o valor clínico do teste  $A_{1c}$ .

Devido ao impacto das complicações crônicas do DM, para pacientes e sociedade, o teste  $A_{1c}$  tem sido utilizado como indicador importante na avaliação e monitoramento da qualidade da assistência aos pacientes diabéticos pelas diferentes instituições (9). Informações sobre a frequência com que é solicitado e os níveis alcançados pelos pacientes têm sido requisitadas como forma de garantir que o teste  $A_{1c}$  seja utilizado e que as metas recomendadas para o controle glicêmico sejam atingidas.

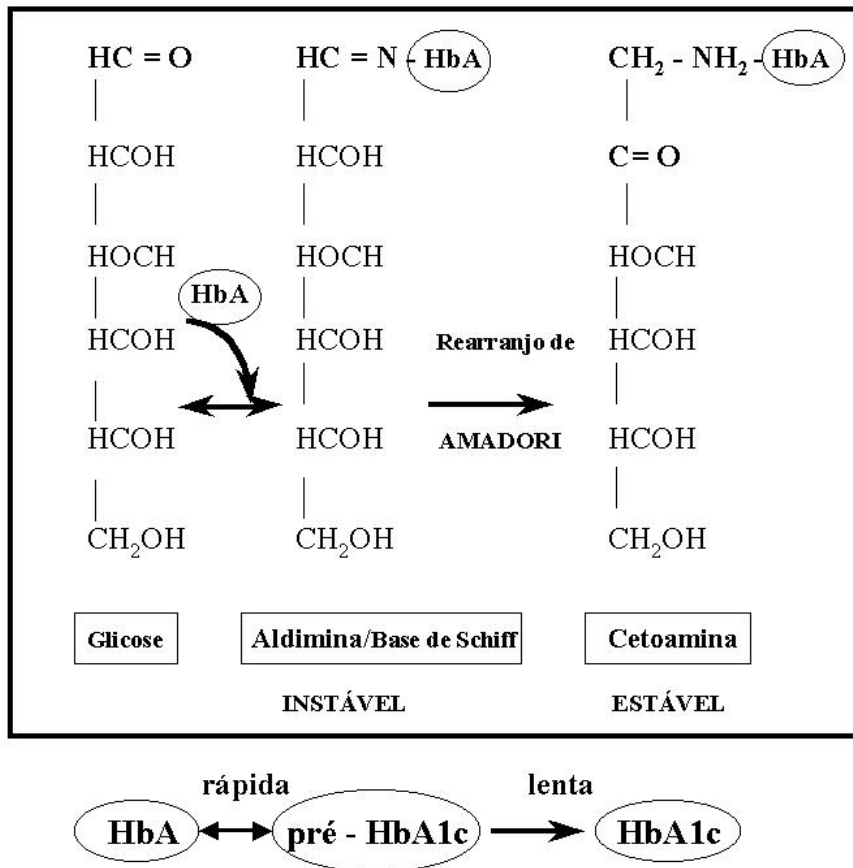
### **Reação de glicação não-enzimática e GHb**

Em 1955, Kunkel e Wallenius (34) descreveram, pela primeira vez, a heterogeneidade da hemoglobina normal (Hb) em adultos. A sequência de aminoácidos dos componentes menores, que foram separados por cromatografia, era idêntica ao componente principal (hemoglobina A<sub>0</sub>). Estudos posteriores (35), identificaram subfrações que eluíam mais rápido que HbA<sub>0</sub>, e foram coletivamente chamadas de Hb “rápidas” e nomeadas, individualmente, como HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub> e HbA<sub>1c</sub>, conforme a ordem de eluição da coluna. Rahbar e colaboradores (36) mostraram que estas frações estavam elevadas nos eritrócitos de pacientes diabéticos. Em 1971, pela primeira vez, foi descrito a relação entre as hemoglobinas rápidas, a glicemia média e as complicações crônicas de pacientes diabéticos (19).

A formação da GHb ocorre via uma reação de glicação não – enzimática entre o grupo aldeído livre da glicose, ou outros açúcares, e um grupo amino livre na molécula da hemoglobina. Esta reação é conhecida como reação de Maillard (Figura 2). A reação envolve a formação de um composto intermediário instável (base de Schiff, aldimina ou fração lábil), que forma-se rapidamente, e é proporcional à concentração de glicose momentânea (37). Este composto sofre, lentamente, o rearranjo de Amadori e forma uma cetoamina estável e irreversível (proteína glicada/GHb).

Existem vários sítios de glicação na molécula de hemoglobina. O resíduo terminal de valina na cadeia  $\beta$  corresponde a aproximadamente 60-80% da glicose ligada. Outros sítios de ligação também ocorrem na cadeia  $\alpha$ . Outros açúcares podem se ligar à molécula e contribuem para a fração total glicada (HbA<sub>1</sub>). O componente especificamente ligado à glicose é conhecido como HbA<sub>1c</sub> (38).

A natureza heterogênea da GHb tem gerado confusão na nomenclatura e no componente que está sendo medido por um determinado método. A “International Federation of Clinical Chemistry – IFCC” (39) define GHb como o termo genérico para denominar os componentes menores da hemoglobina. O termo inclui todas as hemoglobinas modificadas com a glicose ou outros açúcares, incluindo HbA<sub>1</sub> e suas frações HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1c</sub> e HbA<sub>1d</sub>, bem como as outras hemoglobinas anômalas glicadas (HbS, HbF, HbC) que, eventualmente, possam estar presentes. As espécies mais conhecidas de GHb são HbA<sub>1</sub>, HbA<sub>1c</sub> e GHb total (todas as frações ligadas a um açúcar, em qualquer sítio da cadeia de Hb, inclusive as Hb anômalas) (Tabela 3). Recentemente, baseados nos dados do DCCT e UKPDS (7-8), que usaram métodos que mediam especificamente HbA<sub>1c</sub>, o termo “teste A<sub>1c</sub>” tem sido recomendado (9, 10,40).



**Figura 2:** Reação de glicação não-enzimática da hemoglobina.

**Tabela 3:** Composição da hemoglobina normal em adultos.

Tipo de Hemoglobina	Cadeias na molécula	Resíduo de açúcar	Quantidade (%)	
A	$\alpha_2\beta_2$	–	97	
A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$	–	<1.5	
F	$\alpha_2\gamma_2$	–	<0.8	
A <sub>1</sub>				
	A <sub>1a1</sub>	$\alpha_2\beta_2^*$	Frutose-1,6-difosfato	<1
	A <sub>1a2</sub>	$\alpha_2\beta_2^*$	Glicose-6-fosfato	<1
	A <sub>1b</sub>	?	?	<1
	A <sub>1c</sub>	$\alpha_2\beta_2^*$	Glicose	4-6
	A <sub>1d</sub>	?	?	Traços
	A <sub>1e</sub>	?	?	Traços

\* Resíduo de açúcar

### **Relação da Glicose e GHb**

A glicação não enzimática da hemoglobina é determinada principalmente por três fatores: concentração média da glicose plasmática, tempo de meia vida da hemácia e permeabilidade da membrana do eritrócito à glicose. A membrana de eritrócitos humanos é livremente permeável à glicose (41). Sendo assim, a concentração plasmática de glicose e o tempo de meia vida da hemácia são os principais determinantes da reação de glicação da proteína em seres humanos. Como a meia-vida dos eritrócitos é, em média, 120 dias podemos dizer que a GHb é um índice da média da glicemia nos 120 dias que precedem à coleta do material para o teste laboratorial. A GHb reflete, mais especificamente, o controle glicêmico dos meses que precederam a dosagem.

A relação da glicose e GHb é complexa e não pode ser explicada por um simples cálculo matemático. Modelos matemáticos e dados clínicos (7,42-44) mostram que, a média glicêmica dos 20-30 dias anteriores à coleta da amostra contribui com aproximadamente 50% do resultado final, e que os 90-120 dias precedentes contribuem com apenas 10%. Isso significa que, o valor de HbA<sub>1c</sub>, em qualquer momento, tem a contribuição de todos os eritrócitos: velhos (120 dias de idade) e os novos. No entanto, os níveis recentes de glicose (1 - 2 meses anteriores) contribuem mais para o resultado final. Devido a isso, a GHb pode detectar grandes variações da glicemia em pequenos períodos de tempo, como 3 a 4 semanas. É possível detectar mudanças clinicamente relevantes nos valores de HbA<sub>1c</sub> sem precisar esperar 120 dias após os supostos episódios hiperglicêmicos.



Estudos cinéticos na formação da GHb (42), sugerem que a reação de glicação da Hb é uma reação de primeira ordem e ocorre em condições de equilíbrio. O tempo requerido para se alcançar um ponto médio entre o valor inicial e um novo valor é relativamente constante em 30-35 dias.

Os dados do DCCT (7) proporcionaram informações importantes sobre a complexa relação entre glicemia média e GHb. Existe uma forte correlação entre glicemia e GHb ( $r = 0,81$ ,  $P < 0,0001$ ) e aproximadamente 1% de GHb (%HbA<sub>1c</sub>) corresponde a 35 mg/dL em glicemia (44). Esta relação originou-se da análise de mais de 26.000 resultados de HbA<sub>1c</sub> de 1439 pacientes da coorte do DCCT. Em média, foram analisados 18 valores de HbA<sub>1c</sub> para cada paciente e seus perfis glicêmicos correspondentes (7 pontos de glicemia - antes das refeições, 90 minutos após as refeições e antes de dormir). Estes dados mostraram que a relação GHb e Glicemia é previsível e pode ser resumida pela equação:  $Glicose (mmol/L) = 1,98 \%HbA_{1c} - 4,29$ . Esta relação pode ser utilizada para estabelecer os valores de glicose, apropriados para cada paciente, para que os valores de GHb recomendados possam ser alcançados e mantidos na prática (Tabela 4).

A correlação entre os valores de HbA<sub>1c</sub> e glicemia de jejum foi menor ( $r = 0,69$ ) do que a encontrada para HbA<sub>1c</sub> e glicemia média estimada pelo perfil glicêmico de sete pontos. Os valores elevados de glicose de jejum subestimam progressivamente os valores de HbA<sub>1c</sub>. Os níveis glicêmicos pós-refeições não apresentam a mesma relação com os valores de HbA<sub>1c</sub>. Níveis pós-desjejum tendem a superestimar HbA<sub>1c</sub>, enquanto que as glicemias pós-almoço apresentam uma relação similar àquela da glicemia média determinada pelo perfil glicêmico (44). Em pacientes tipo 2, a relação entre glicemia e HbA<sub>1c</sub> parece ser mais complexa (45). Em geral, os níveis glicêmicos, durante

diferentes períodos do dia, apresentam uma correlação menor do que a encontrada para pacientes tipo 1, sendo que os níveis pré-refeição foram os mais relacionados com os níveis de HbA<sub>1c</sub>. Em DM tipo 2, HbA<sub>1c</sub> parece fornecer pouca informação sobre os níveis pós-prandiais e, conseqüentemente, pode não ser um bom índice para as variações dos níveis glicêmicos após as refeições. Devido a isso, há sugestões de que o monitoramento de pacientes diabéticos tipo 2 seja feito através de medidas de glicemias de jejum, HbA<sub>1c</sub> e também de medidas glicêmicas pós-prandiais (45). Esta relação em pacientes tipo 2 precisa ser melhor estudada.

Na prática, os pacientes que mantiverem seus níveis glicêmicos médios ao redor de 170 mg/dL (9,5 mmol/L) alcançarão o valor - alvo de 7% recomendado para HbA<sub>1c</sub>. Aqueles pacientes com glicemias > 200 mg/dL (11.1 mmol/L) necessitarão ação adicional no tratamento. A determinação da glicemia não substitui o teste A<sub>1c</sub>, mas pode dar uma idéia do valor da A<sub>1c</sub> no acompanhamento ambulatorial dos pacientes. Precauções devem ser tomadas na interpretação destas relações. Os dados são válidos apenas quando métodos similares ao usado pelo DCCT, ou métodos DCCT alinhados/convertidos, são utilizados para a dosagem de HbA<sub>1c</sub> (9).

**Tabela 4:** Valores aproximados de glicemia média e os valores correspondentes de HbA<sub>1c</sub> para uso clínico.

HbA <sub>1c</sub> (%)	Glicemia Média			
	(estimada pelo perfil de 7 pontos)		(estimada pela glicemia de jejum)	
	mg/dL	mmol/L	mg/dL	mmol/L
4	65	3,5	85	4,7
5	100	5,5	112	6,2
6	135	7,5	139	7,7
<b>7*</b>	<b>170</b>	<b>9,5</b>	<b>166</b>	<b>9,2</b>
8	205	11,5	193	10,7
9	240	13,5	220	12,2
10	275	15,5	248	13,8
11	310	17,5	275	15,3
12	345	19,5	302	16,8

\* valor máximo recomendado pela ADA

adaptado de Rohlfing CL et al. *Diabetes Care* 2002;25:275-78.

## ***Métodos para Dosagem da GHb***

Existem mais de 30 métodos diferentes para a dosagem de GHb disponíveis para uso no laboratório clínico (9,46). Eles medem a GHb baseados nas diferenças físicas, químicas ou imunológicas entre a fração glicada (HbA<sub>1</sub> ou HbA<sub>1c</sub>) e a não-glicada HbA<sub>0</sub> (Figura 3).

De uma maneira geral, os métodos podem ser classificados em dois grandes grupos (Tabela 5):

1) Métodos baseados na diferença de carga elétrica entre GHb e HbA<sub>0</sub>: A cromatografia de troca catiônica (HPLC e minicolunas) e a eletroforese usam este princípio. O princípio baseia-se no fato de que a ligação da glicose, ou de outro açúcar, ao amino grupo terminal da cadeia  $\beta$  altera a carga total da hemoglobina, fazendo com que a fração glicada migre mais rápido em um campo elétrico ou em resinas de troca iônica, permitindo a separação das frações.

A cromatografia de troca iônica foi introduzida no mercado no início da década de 70 (19). As minicolunas cromatográficas invadiram os laboratórios clínicos na década de 80 por serem baratas e de fácil acesso. Estes métodos são pH e temperatura dependentes, apresentam problemas de calibração e baixa reprodutibilidade (47). Por não possuírem resolução suficiente para separar as frações glicadas, eles medem a fração glicada total (HbA<sub>1</sub>). Nos últimos anos, eles têm sido substituídos por sistemas de HPLC mais robustos e automatizados (47-50). Estes novos equipamentos apresentam excelentes níveis de precisão intra e inter-ensaio e são amplamente usados no mundo todo. A diluição, hemólise da amostra e remoção (ou determinação) da fração lábil (base Schiff) podem ser feitas automaticamente pelo aparelho. Os resultados são

expressos como percentagem da HbA<sub>1c</sub>. Muitos equipamentos podem fazer a leitura de códigos de barra para identificação das amostras e usar o próprio tubo em que o sangue foi coletado na análise. Os cromatogramas estão disponíveis em 3-4 minutos com os resultados das diferentes frações de GHb. O método de HPLC por troca iônica foi utilizado pelo DCCT (7) e é recomendado como método de referência interino para a dosagem de GHb até que os órgãos internacionais decidam sobre o método de referência definitivo (39,51).

A eletroforese é pouco utilizada nos laboratórios. As técnicas manuais são laboriosas e apresentam problemas de precisão. Equipamentos automatizados já estão disponíveis no mercado e houve um grande avanço em relação aos métodos manuais (52). Uma grande vantagem destes métodos é que as hemoglobinas anômalas mais comuns, que interferem em alguns métodos de cromatografia de troca iônica, podem ser identificadas.

2) Métodos baseados em ligações específicas: Esses métodos usam a diferença estrutural ou química entre GHb e HbA<sub>0</sub> para separar as frações.

a) Cromatografia de afinidade: Baseia-se na reação específica dos grupos *1,2 cis-diol*, resultantes da ligação da hemoglobina com a molécula de glicose, com o ácido fenilborônico ou derivados. Nestes métodos, minicolunas manuais ou sistemas de HPLC, a GHb liga-se à coluna ou ao suporte contendo o boronato e a fração HbA<sub>0</sub> elui primeiro. As variações de temperatura e pH, presença de Hb anômalas, uremia e fração lábil não afetam estes métodos. As minicolunas manuais são muito lentas e apresentam considerável variação entre lotes. O sistema de HPLC Primus (Primus Corp) usa a

cromatografia de afinidade de maneira automatizada e é um dos métodos de apoio utilizados pelo laboratório central do DCCT (47,51,53).

Sistemas automatizados também usam o princípio da afinidade para imobilizar a GHb em matrizes específicas, separando-a das outras frações, sendo que a medida final da GHb pode ser dar por fluorescência ou por diferença de absorção. Exemplo desta modalidade é o equipamento Abbott IMX (47, 54). Os resultados são expressos como GHb total ou padronizados, via fórmula de conversão, para porcentagem de HbA<sub>1c</sub>.

b) Métodos imunológicos: estes métodos usam anticorpos direcionados ao N-terminal glicado da hemoglobina (seqüências que variam de 3 a 8 aminoácidos) e são específicos para a fração HbA<sub>1c</sub>, sendo que os resultados são expressos com porcentagem de HbA<sub>1c</sub>. A grande vantagem destes ensaios é a facilidade de automatização em autoanalisadores bioquímicos comuns. Ensaios utilizando imunoturbidimetria (55) e imunoaglutinação estão disponíveis no mercado (56).

Com a popularização do teste A<sub>1c</sub>, esta modalidade de ensaio tem sido, recentemente, utilizada para desenvolver testes rápidos para monitoramento do paciente em casa ou no consultório médico na hora da consulta (point of care testing – POCT). Estes métodos utilizam sangue capilar e cassetes descartáveis que contêm o conjunto reativo (56,57). Os resultados são disponibilizados em menos de 10 minutos e apresentam uma boa correlação e concordância com os resultados dos métodos tradicionalmente usados no laboratório clínico. Um desvantagem é o custo elevado de, aproximadamente, 10 a 20 dólares / por teste.

c) Método Enzimático: recentemente foi descrito um método que utiliza proteases para digerir a hemoglobina produzindo “frutosil-aminoácido” (58). Pela ação de uma oxidase, este composto produz peróxido de hidrogênio, que reage com cromogênios na

presença de peroxidase. A hemoglobina total é medida espectrofotometricamente e o resultado é dado como a relação GHb/Hb total. Os autores relatam que os resultados do método enzimático correlacionam-se bem com os métodos convencionais, como HPLC e imunoenaios, podendo ser muito mais preciso. A vantagem deste novo método é que, por ser um ensaio enzimático colorimétrico, pode ser adaptado a qualquer analisador bioquímico. No entanto, a estabilidade do método a longo-prazo e a análise das interferências mais comuns necessitam maior avaliação.

A Tabela 6 mostra os principais métodos utilizados para a dosagem de GHb, utilizados pelos participantes dos 4 maiores programas externos internacionais de garantia da qualidade para GHb, divididos por categorias e por fabricantes. O Brasil ainda não possui um programa externo específico para GHb. A participação em programas internos e externos, para garantir a qualidade de todos os analitos, é uma exigência dos órgãos fiscalizadores para a obtenção de Certificado de Acreditação para o laboratório clínico. Apesar disto, os dois maiores Programas Externos para Garantia da Qualidade, gerenciados pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC – PELM) e Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC – Control-Lab) não contemplam o analito GHb (59,60).

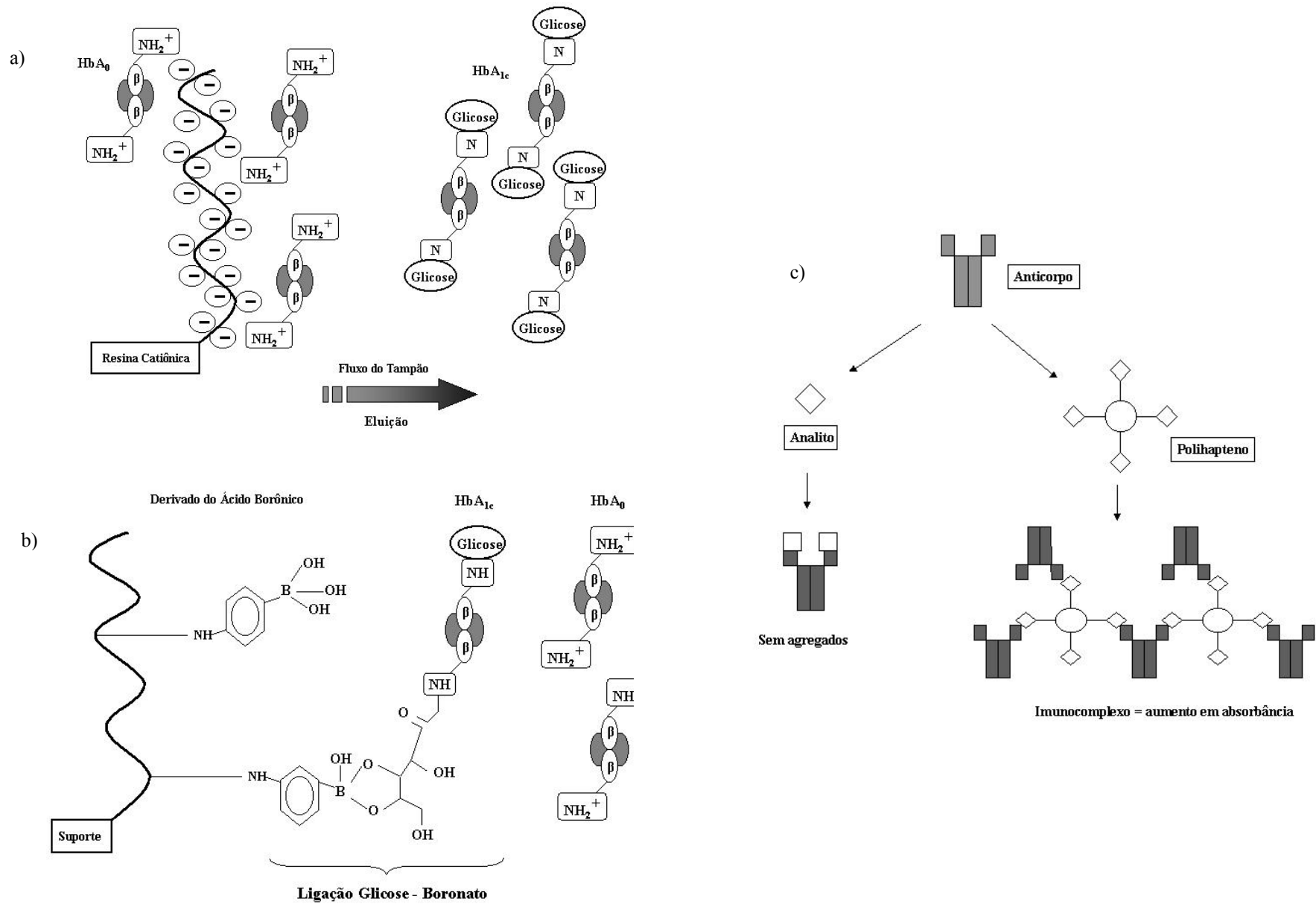


Figura 3: Princípio dos métodos utilizados para dosar GB: a) troca iônica; b) afinidade; c) imunoensaio.



**Tabela 5:** Métodos para dosagem de glicohemoglobina no laboratório clínico. \*

Princípio Geral	Método	Princípio específico	Tipo de GHb dosada	Principais Interferentes	CV (%) Interensaio	Certificação NSGP	Marcas Comerciais Disponíveis
<b>Separação por diferença de carga das frações</b>	Minicoluna –Troca iônica	HbA <sub>1</sub> , menos positiva em pH neutro, liga-se mais fracamente à coluna e elui primeiro	HbA <sub>1</sub>	HbF e outras Hb Lipemia/Icterícia Temperatura Fração lábil Uremia pH	> 10	Não	Labtest **
	HPLC - Troca Iônica	Frações glicadas são eluídas por gradiente de pH	HbA <sub>1</sub> A <sub>1a</sub> A <sub>1b</sub> A <sub>1c</sub> Lábil (?)	HbF e outras Hb Uremia/Aspirina Vitamina C (?) Vitamina E (?)	<5	Sim	Biorad Variant I e II TOSOH Hitachi Menarini
	Eletroforese	Migração em campo elétrico: HbA <sub>1c</sub> é mais lenta devido a glicose	HbA <sub>1</sub> A <sub>1c</sub>	Uremia HbF	5 – 10	Sim	Beckman Sebia Helena
<b>Separação por ligação a compostos específicos</b>	Cromatografia por Afinidade	Afinidade com ácido amino fenilborônico (HPLC e minicolunas)	GHb Total	?	<5	Sim	Primus HPLC Pierce e Isolab Minicolunas
	Afinidade/Captura iônica	Afinidade + captura iônica +fluorescência	GHb Total	?	5 – 6	Sim	IMX Abbot
	Imunoensaios	Imunoturbidimetria (IT) Imunoaglutinação (IA)	HbA <sub>1c</sub> (S <sub>1c</sub> , C <sub>1c</sub> , D <sub>1c</sub> )	?	6 – 8	Sim	TinaQuant Roche Dade Bering Dimension DCA Bayer Metrika

\* Métodos referência IFCC não são aplicados para uso na rotina e não constam na tabela. \*\* teste disponível apenas no Brasil.

**Tabela 6:** Distribuição e frequência dos diferentes métodos para dosagem de glicohemoglobina em Programas Externos Internacionais da Garantia da Qualidade.

<b>Programa Externo de Garantia da Qualidade</b>				
	<b>CAP - EUA</b>	<b>DGKC – Alemanha</b>	<b>Glicata - Itália</b>	<b>UKEQAS – Reino Unido</b>
Nº total de participantes	<b>2019</b>	<b>657</b>	<b>235</b>	<b>196</b>
HPLC	<b>856</b>	<b>184</b>	<b>157</b>	<b>126</b>
BioRad	478	-	34	38
TOSOH	378	-	21	31
Menarini	-	-	97	57
Outros	-	-	5	-
Eletroforese	<b>298</b>	<b>6</b>	-	-
Afinidade	<b>21</b>	-	-	<b>9</b>
Imunoensaios	<b>836</b>	<b>388</b>	<b>46</b>	<b>37</b>
Bayer	185	-	28	7
Roche	348	-	18	30
Dade Beringh	303	-	-	-
Outros	-	-	-	-
POCT *	<b>8</b>	<b>65</b>	<b>9</b>	-
Metrika	8	-	-	-
Nycocard	-	29	9	-
Outros	-	<b>14</b>	<b>23</b>	<b>24</b>

\*categoria POCT é separada no programa DGKC, o aparelho Bayer DCA 2000 participa de todos os programas na categoria imunoensaio, também pode ser considerado POCT.

### ***Padronização e Harmonização dos Resultados***

Em geral, métodos utilizando diferentes princípios de ensaio apresentam excelente correlação e não existem dados suficientes para mostrar se um ou outro método, ou fração, tem valor clínico superior (Figura 4). No entanto, os valores de GHb/HbA<sub>1c</sub> fornecidos por um laboratório podem não corresponder com os valores fornecidos por outro laboratório, mesmo usando a mesma metodologia, e medindo a mesma fração. Não existe concordância entre os valores de referência e a comparação dos resultados é muito difícil (9,47,61-63). A mesma amostra pode apresentar um valor de 7% em um laboratório e 9% em outro. A carência de padronização limita o uso destes métodos. Apesar do uso de fórmulas de conversão, oriundas de estudos comparativos, ser uma prática largamente adotada, a validade desta ferramenta para padronização dos resultados de GHb depende do método originalmente utilizado. Em um estudo prévio (47), relatamos que as fórmulas de conversão, baseadas em métodos que não medem a fração HbA<sub>1c</sub> (como as minicolunas de troca iônica, métodos baseados em afinidade e eletroforese), têm uma variabilidade que pode resultar em diferenças absolutas maior que 1% do valor verdadeiro. Esta variação pode mascarar uma verdadeira, e clinicamente relevante, diferença em níveis de HbA<sub>1c</sub>. Os métodos com baixa reprodutibilidade inferem um grande erro nos resultados convertidos. No entanto, quando métodos precisos são utilizados, o erro na conversão dos resultados é muito menor e aceitável para uso clínico (Figura 5).

A preocupação com a padronização dos métodos para GHb foi intensificada no início da década de 90, com a previsão dos resultados finais do DCCT(63). Desde 1984, o National Diabetes Data Group (NDDG) reconhecia a necessidade de padronização, e

grupos de estudo discutiam o problema (64). Em 1991, mudanças foram feitas no programa externo de qualidade para GHb do College of American Pathologists (CAP) para permitir uma melhor avaliação da variação interlaboratorial e exatidão dos resultados. Os métodos foram divididos por categorias e o analito medido por cada laboratório foi especificado (HbA<sub>1c</sub>, A<sub>1c</sub> ou GHb total). Foi o primeiro mapeamento da situação e um programa piloto de padronização foi proposto (65). Outros estudos foram realizados e mostraram que a padronização era viável (66-69).

Após a publicação dos resultados do DCCT (7), preocupados com o impacto clínico dos resultados de GHb no manejo do paciente diabético, vários comitês internacionais trabalharam na padronização e unificação dos resultados de GHb (62,70,71). O “National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)” (51), patrocinado pelas Associações Americanas de Diabetes (ADA) e de Química Clínica (AACC), começou em 1996 a comparar e certificar os diferentes métodos utilizados para dosar GHb, com o intuito de relacionar os diferentes valores de GHb obtidos com os valores de HbA<sub>1c</sub> do DCCT. O centro de referência é o laboratório que participou como laboratório central do DCCT na Universidade de Missouri. O objetivo principal do NGSP é certificar os métodos a nível de fabricantes, mas laboratórios podem também obter certificação a nível de laboratório de referência (nível 1) ou clínico (nível 2). O programa inclui a análise e monitoramento da precisão e desvio, considerando o método do DCCT como referência. Os critérios para certificação são: CV < 5% (<3% para Laboratórios de Nível 1) e um erro de  $\pm 5\%$  para os valores estabelecidos pelo laboratório central (valores DCCT). Desta maneira cada método ou laboratório pode informar os resultados de GHb em % HbA<sub>1c</sub> diretamente comparáveis com os do DCCT. O sucesso desta iniciativa está implícito no grande número de métodos

certificados e na pequena variação interlaboratorial obtida pelos métodos certificados nos programas externos de garantia da qualidade (72).

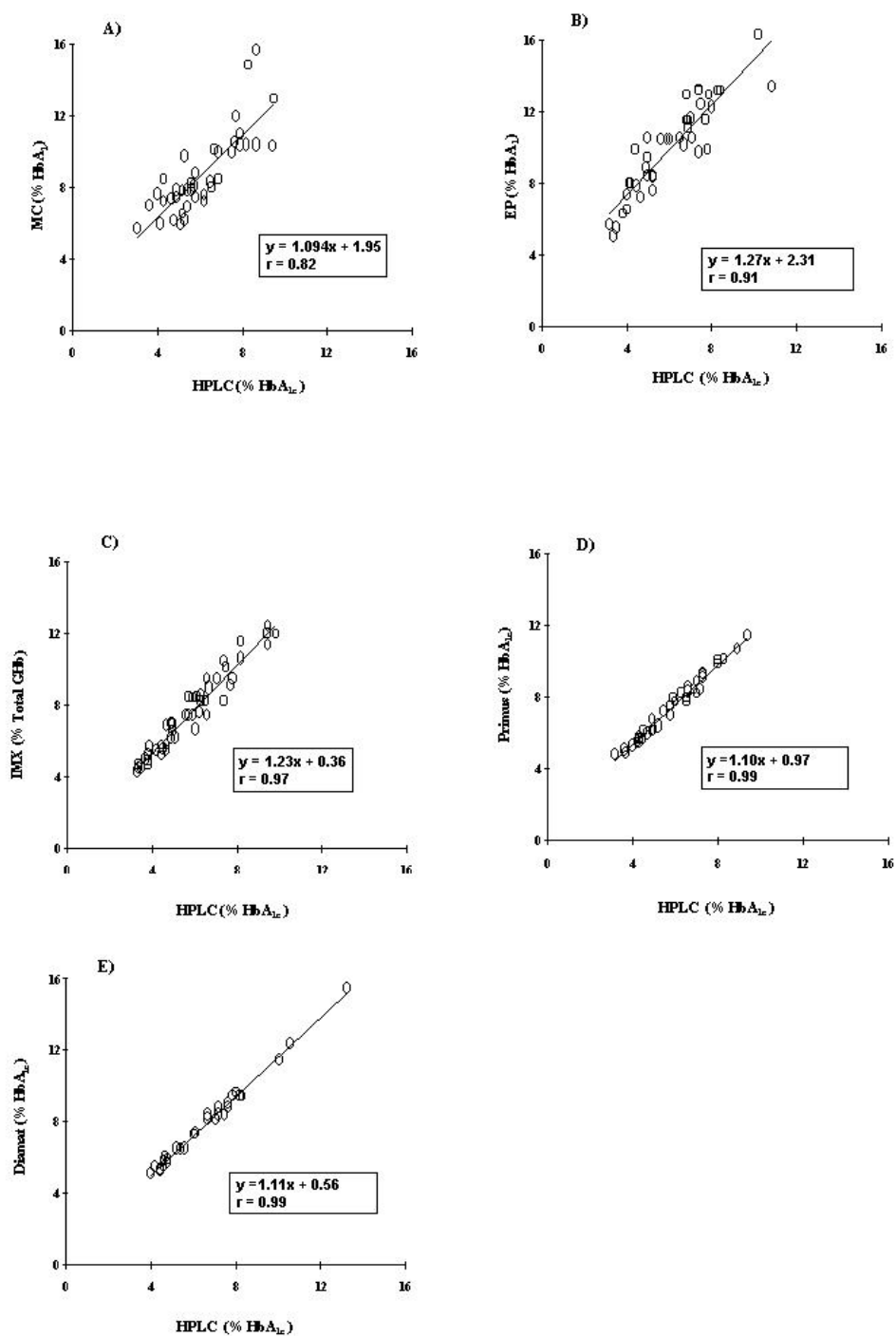
A descrição de novas técnicas para dosagem da GHb, como a espectrometria de massa e técnicas recombinantes, levaram alguns grupos a estudar propostas de métodos de referência (73-75). A Federação Internacional de Bioquímica Clínica (IFCC) aprovou recentemente um método de referência para GHb (39). O método é baseado em clivagem da GHb em peptídios específicos, separação por HPLC de troca iônica, e identificação por espectrometria de massa ou por eletroforese capilar. A correlação entre resultados do IFCC e NGSP é excelente, porém os valores absolutos são diferentes (Tabela 7). Em média, os valores IFCC são 1.6 %HbA<sub>1c</sub> mais baixos que os valores do NGSP, conseqüentemente, do que os do DCCT (72). Os resultados do IFCC são baseados na exatidão analítica e os resultados dos métodos certificados pelo NGSP são baseados em evidências clínicas. Estudos da relação dos resultados do IFCC e DCCT estão em andamento para saber quais valores devem ser utilizados. O impacto da mudança de valores no manejo clínico será grande. Enquanto os órgãos internacionais não chegam a um acordo, o NGSP continuará certificando os métodos de GHb e incluirá o método do IFCC como um dos métodos âncora da rede de laboratórios do programa. Os programas externos de garantia da qualidade da Europa já estão informando os resultados de GHb IFCC, juntamente com os valores DCCT/NGSP.

**Tabela 7:** Relação dos valores de HbA<sub>1c</sub> dados por métodos NGSP/DCCT e método referência IFCC.

NGSP/DCCT % HbA <sub>1c</sub>	IFCC % HbA <sub>1c</sub>	Diferença % HbA <sub>1c</sub>
4	2,1	1,9
5	3,2	1,8
6	4,3	1,7
<b>7*</b>	<b>5,4</b>	<b>1,6</b>
8	6,4	1,6
9	7,5	1,5
10	8,6	1,4
11	9,7	1,3
12	10,7	1,3

\* valor máximo recomendado pela ADA

<http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp>. Acessado em Julho de 2003.



**Figura 4:** Correlação entre os diferentes métodos para dosagem de GHb e fórmulas de conversão para HPLC/DCCT método. a) microcoluna; b) eletroforese; c) IMX; d) Primus HPLC; e) Diamat HPLC. *Camargo JL et al Scand J Clin Lab Invest 1998;58:521-28*

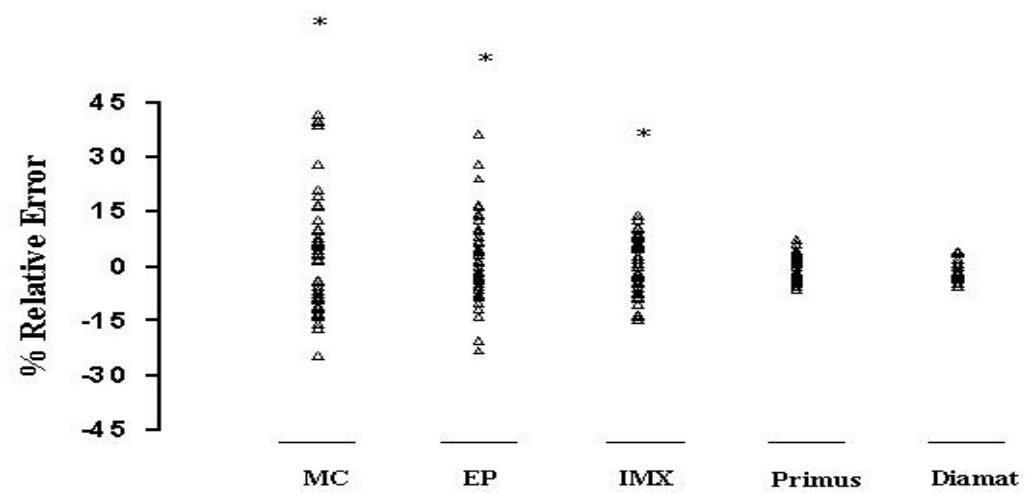


Figura 5: Erro relativo das fórmulas de conversão.



### ***Fatores que Afetam os Resultados***

Dependendo dos métodos utilizados, muitos fatores podem afetar ou interferir nos resultados. Os fatores mais conhecidos são a fração lábil e a conservação da amostra (76-78). Estes estudos são antigos e há carência de dados recentes que possam ser aplicados aos novos métodos e equipamentos disponíveis no mercado. Além disso, algumas doenças e estados patológicos, como anemias, dislipidemias, e alguns medicamentos podem alterar significativamente os resultados de GHb (9,10).

A presença de hemoglobinas (Hb) anômalas é considerada um importante fator de interferência positiva ou negativa nas dosagens de GHb, independente do método utilizado (79). Relatos de diferentes interferências, em diferentes métodos, têm sido publicados nos últimos anos (80-85), enfatizando que cada laboratório deve ter conhecimento da influência das hemoglobinopatias no método que está sendo empregado. A interferência das hemoglobinas anômalas é maior nos métodos que baseiam-se na separação de cargas, como HPLC de troca catiônica. Alguns HPLC identificam e quantificam as Hb variantes, outros podem apenas expressar resultados muito baixos ou altos (79). Os métodos imunológicos parecem não ser afetados por esta interferência. Em geral, os anticorpos anti-HbA<sub>1c</sub> utilizados nos ensaios, reconhecem os 3-5 primeiros aminoácidos do N-terminal da cadeia  $\beta$  que está ligado à glicose. Esta seqüência inicial é igual para a HbA e as Hb variantes comuns (Figura 6).

Como a concentração de GHb depende da meia vida normal dos eritrócitos (9,10), doenças hemolíticas ou outras condições que encurtam a sobrevivência das células, reduzem significativamente os níveis de GHb. O papel da anemia nos níveis de GHb tem sido pouco estudado. Provavelmente, pacientes com diferentes tipos de anemia

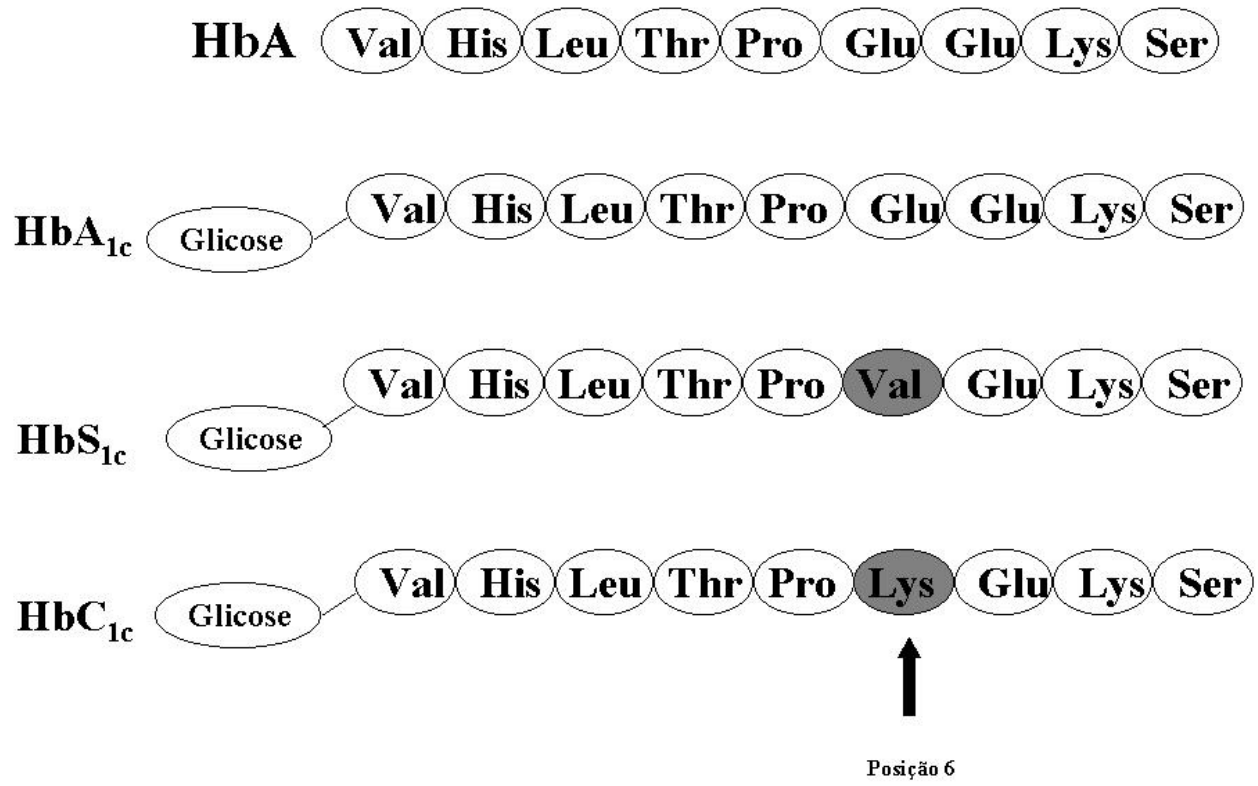
apresentem níveis reduzidos de GHb, e uma vez corrigida a anemia, tenham os valores de GHb aumentados. Este fato pode estar relacionado com aqueles pacientes que apresentam um controle glicêmico, medido pela GHb, em desacordo com a história clínica ou glicemia. Alguns estudos mostram que as anemias deficientes de ferro e de vitamina B<sub>12</sub> alteram os níveis de GHb (86-88). É provável que anemias por outras causas, como as de doenças crônicas, afetem os resultados de GHb da mesma forma.

A Hb carbamilada, resultado da reação da Hb com a uréia em pacientes urêmicos (uremia > 160 mg/dL), pode ser uma fonte significativa de erro nas dosagens de GHb. Estudos divergem quanto a significância clínica e a magnitude desta interferência, que é dependente do método que está sendo utilizado (89-91).

A ação de drogas, como a aspirina, na formação e determinação da GHb tem sido estudada (89,92,93). A aspirina pode levar a formação de um derivado de Hb “acetilado”, o qual, devido a sua carga elétrica, migra junto com a GHb naqueles métodos que baseiam-se na diferença de carga para a dosagem de GHb, resultando em valores falsamente elevados. Em um destes estudos (92), foi demonstrado que a ingestão de aspirina acarreta um aumento aparente de GHb. Outros dois estudos (89,93) não encontraram diferenças nos valores de GHb após ingestão de aspirina. Da mesma forma que a interferência pelas Hb anômalas e pela uremia, a interferência da aspirina é método-dependente. O consumo abusivo de álcool, semelhante à aspirina, pode levar à formação do mesmo derivado “acetilado”, interferindo também nas dosagens de GHb (93).

Em paralelo, o uso prolongado de vitamina C e E também tem sido estudado como possível fonte de interferência negativa nas dosagens de GHb (94-96). O estresse oxidativo é apontado como uma provável causa do aparecimento das complicações do

diabetes. Oxidantes e anti-oxidantes têm um papel importante na terapia destas complicações. Vitaminas C, E e  $\beta$ -carotenos têm sido usados como anti-oxidantes em pacientes diabéticos (97). A suplementação de vitamina E e C melhora o controle glicêmico de pacientes diabéticos (98-100). Recentemente (101), foi relatado que os níveis de GHb podem ser modificados pela dieta ou pelo estilo de vida em indivíduos normais. O consumo de álcool, vitamina C e E foi relacionado com o risco de indivíduos não-diabéticos apresentarem níveis mais baixos de GHb. Todavia, os resultados destes estudos são contraditórios e não está claro, até o momento, se o uso das vitaminas C ou E altera verdadeiramente os valores de GHb devido a uma inibição na glicação proteica ou se este efeito é devido a outros fatores, não relacionados à glicação, mas à formação de produtos derivados, que podem causar erros metodológicos.



**Figura 6:** Diferenças na seqüência N-terminal da cadeia  $\beta$  das hemoglobinas anômalas mais comuns e a hemoglobina A.

### **Comentários Finais**

Os estudos que avaliaram o papel do controle glicêmico no desenvolvimento das complicações crônicas do DM (7,8,102) mostraram que redução absoluta de 1% na HbA<sub>1c</sub> determinou uma redução significativa no desenvolvimento ou progressão da retinopatia, nefropatia e doenças cardiovasculares. Estima-se que mais de 5 milhões de brasileiros tenham diabetes (1).

Devido ao grande número de fatores que podem afetar os diferentes métodos, cada laboratório deve estar atento às fontes de erros que podem alterar seus resultados de GHb. Embora a maioria destas interferências esteja relatada na literatura internacional, os resultados dos estudos são contraditórios. Outro aspecto importante a ser mencionado, é que as interferências são dependentes dos métodos empregados para realizar as dosagens. Uma interferência pode ocorrer em uma magnitude clinicamente significativa em um método e ser negligível em outro.

Os laboratórios clínicos devem estar preparados para fornecer resultados exatos e precisos de GHb/HbA<sub>1c</sub>, para ajudar o clínico a prevenir e manejar as complicações do DM.

## **Referências**

- 1) World Health Organization. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation**. Geneva, World Health Organization, **1999**;59p.
- 2) World Health Organization. Diabetes. <http://www.who.int/ncd/dia/databases.htm>. Acessado em Julho 2003.
- 3) Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso, Detecção e Tratamento das Complicações Crônicas do Diabetes Mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metabol** **1999**;43: 7-13.
- 4) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III). **JAMA** **2001**;285:2486-97.
- 5) Costa L, Canani LH, Lisbôa HR, Tres GS and Gross JL. The aggregation of metabolic syndrome features is associated with increased prevalence of chronic complications in type 2 diabetes. **Diabetic Med** **2003**; *in press*.
- 6) Silvestre JA. Hospitalizações SUS 1997. Coordenadoria da Atenção à Saúde do Idoso. Ministério da Saúde. 1997.
- 7) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med** **1993**; 329:977-86.

- 8) U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet** **1998**;352:837-51.
- 9) Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem** **2002**;48:436-72.
- 10) American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. Tests of glycemia in diabetes. **Diabetes Care** **2003**;26 (Suppl 1):S106-S108.
- 11) Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. **J Biol Chem** **1984**;259:3812-17.
- 12) Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA, Baynes JW. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. **Diabetes** **1991**;40:1010-15.
- 13) Charonis AS, Tsilibary EC. Structural and functional changes of laminin and type IV collagen after nonenzymatic glycosylation. **Diabetes** **1992**;41:49-54.
- 14) Bisell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message?. **J Cell Sci Suppl** **1987**;8:327-35.
- 15) Striker GE, Peten EP, Carome MA, Pesce CM, Schmidt K, Yang CW, Elliot SJ, et al. The kidney disease of diabetes mellitus: a cell and molecular biology approach. **Diabetes Metab Rev** **1993**;9:37-56.
- 16) Krishnamurti U, Rondeau E, Sraer JD, Michael AF, Tsilibary EC. Alterations in human glomerular epithelial cells interacting with nonenzymatically glycosylated matrix. **J Biol Chem** **1997**;272:27966-27970.

- 17) Steffes MW, Osterby R, Chavers B, Mauer SM. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. **Diabetes** **1989**;38:1077-81.
- 18) Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DER, Mauer M. Sequential renal biopsies in insulin dependent diabetic patients: structural factors associated with clinical progression. **Kidney Int** **1995**;48:1929-35.
- 19) Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. **N Engl J Med** **1971**;284:353-57.
- 20) Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. **N Engl J Med** **1984**; 310:341-46.
- 21) The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiologic of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. **N Engl J M** **2000**;342:381-89.
- 22) Dahl-Jorgensen K, Bjoro T, Kierulf P, Sandvik L, Bangstad HJ, Hanssen KF. Long-term glycemic control and kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus. **Kidney Int** **1992**;41:920-23.
- 23) Reichard P, Nilsson BY, Rosenqvist U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. **N Engl J Med** **1993**;329:304-309.
- 24) Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. **Diabetes Res Clin Pract** **1995**;28:103-117.



- 25) Wu MS, Yu CC, Yang CW. Poor predialysis glycaemic control is a predictor of mortality in type II diabetic patients on maintenance hemodialysis. **Nephrol Dial Transplant** **1997**;12:2105-10.
- 26) Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D. Main risk factors for nephropathy in type II diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. **Arch Intern Med** **1998**;158:998-1004.
- 27) Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. **Diabetes Care** **1995**;18:258-68.
- 28) Abraira C, Colwell JA, Nuttall FQ, et al. Veterans Affairs Cooperative Study on glycemic control and complications in type II diabetes (VA CSDM): results of the feasibility trial. **Diabetes Care** **1995**;18:1113-23.
- 29) Khaw KT, Wareham N, Luben R, et al. Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). **BMJ** **2001**;322:15-18.
- 30) Standl E. International Diabetes Federation European Policy Group Standards for Diabetes. **Endocrine Prac** **2002**;8(Suppl 1):37-39.
- 31) American College of Endocrinology Consensus Statement on Guidelines for Glycemic Control. **Endocrine Prac** **2002**;8(Suppl 1):6-11.
- 32) Davidson JA. Rationale for more aggressive guidelines for diabetes control. **Endocrine Prac** **2002**;8(Suppl 1):13-14.
- 33) Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso Brasileiro sobre Diabetes. Maio 2000. <http://www.diabetes.org.br/consenso/index.html>. Acessado em Julho 2003.
- 34) Kunkel GH, Wallenius G. New hemoglobins in normal adult blood. **Science** **1955**;122:288.

- 35) Allen DW, Schroeder WA, Balog J. Observations on chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: a study of the effect of crystallization and chromatography heterogeneity and isoleucine content. **J Am Chem Soc** **1958**;80:1628-32.
- 36) Rahbar S, Blumenfeld D, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. **Biochem Biophys Res Commun** **1969**;36:838-43.
- 37) Bunn HF, Hanney DN, Kamin S et al. The biosynthesis of human hemoglobin A<sub>1c</sub>. **J Clin Inv** **1976**;57:1652-59.
- 38) Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D et al. What is hemoglobin A<sub>1c</sub>? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. **Clin Chem** **1998**;44:1951-58.
- 39) Jeppsson JO, Kobold U, Barr J et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA<sub>1c</sub> in human blood. **Clin Chem Lab Med** **2002**;40:78-89.
- 40) Levetan CS. Hemoglobin A<sub>1c</sub>: Need to standardize the term. **Endocrine Pract** **2002**;8:25-26.
- 41) Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF. Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells: Role of glucose permeability. **Diabetes** **1982**;31:743-48.
- 42) Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England Jd, Rohlfing CL. Glycohemoglobin testing in diabetes mellitus: assay methods and clinical interpretation. In **Drugs in Development**. Vol I. Vasseli JR, MaggioCA, Scriabine A, Eds. Bradford, CT, Neva Press, 1993, p. 253-67.
- 43) Mortensen HB, Volund A and Christophersen. Glucosylation of human haemoglobin A. Dynamic variation in HbA<sub>1c</sub> described by a biokinetic model. **Clin Chim Acta** **1984**;136:75-81.

- 44) Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, et al. Defining the relationship between plasma glucose and HbA<sub>1c</sub>. Analysis of glucose profiles and HbA<sub>1c</sub> in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care** 2002;25:275-78.
- 45) Bonora E, Calcaterra F, Lombardi S, et al. Plasma glucose levels throughout the day and HbA<sub>1c</sub> interrelationships in type 2 diabetes. **Diabetes Care** 2001;24:2023-29.
- 46) Schwartz JG. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. **Diabetes Reviews** 1995; 3:269-87.
- 47) Camargo JL, Zelmanovitz T, Paggi A, Friedman R, Gross JL. Accuracy of conversion formulae for estimation of glycohemoglobin. **Scand J Clin Lab Invest** 1998; 58:521-28.
- 48) John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Akray HA8140 hemoglobin A<sub>1c</sub> analyzer. **Clin Chem** 1997;43:968-75.
- 49) Gibb I, Parnham A, Fonfrede M and Lcock F. Multicenter evaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer. **Clin Chem** 1999;45:1833-41.
- 50) Higgins TN, Blakney GB, Dayton J. Analytical evaluation of the Bio-Rad Variant II automated HbA<sub>1c</sub> analyzer. **Clin Biochem** 2001;34:361-65.
- 51) Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB and Goldstein D. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A five-year report progress. **Clin Chem** 2001;47:1985-92.
- 52) Keating J, Pattinson A, Sherwood RA. Evaluation of the Helena REP automated electrophoresis instrument for the measurement of glycated hemoglobin. **Ann Clin Biochem** 1991;28:185-86.
- 53) Klenk DC, Hermanson GT, Krohn Ri et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-

- exchange methods, and effects of common interferences. **Clin Chem** **1981**;28:2088-94.
- 54) Wilson DH, Bogacz JP, Forsythe CM et al. Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott Imx Analyzer: novel approaches for separation and detection. **Clin Chem** **1993**;39:2090-97.
- 55) Chang J, Hoke C, Ettinger B, Penerian G. Evaluation and interference study of hemoglobin A<sub>1c</sub> measured by turbidimetric inhibition immunoassay. **Am J Clin Pathol** **1998**;109:274-78.
- 56) John WG, Edwards R, Price CP. Laboratory evaluation of the DCA 2000 clinic HbA<sub>1c</sub> immunoassay analyser. **Ann Clin Biochem** **1994**;31:367-70.
- 57) Stivers CR, Baddam SR, Clark AL et al. A miniaturized self-contained single-use disposable quantitative test for hemoglobin A1c in blood at the point of care. **Diabetes Technol Ther** **2000**;2:517-26.
- 58) Sakurabayashi I, Watano T, Yonehara S et al. New enzymatic assay for glycohemoglobin. **Clin Chem** **2003**;49:269-74.
- 59) Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Proficiência em Ensaio Laboratoriais – PELM. <http://www.control-lab.com.br/>. Acessado em Julho 2003.
- 60) Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Programa Nacional de Controle de Qualidade de Laboratórios Clínicos – PNCQ. <http://www.pncq.org.br/>. Acessado em Julho 2003.
- 61) Turpeinen U, Karjalainen U, Stenman U. Three assays for glycohemoglobin compared. **Clin Chem** **1995**; 41:191-95.
- 62) Gilbert RE, Goodall I, Young V, Jerums G. Interlaboratory variation of GHb assays in Victoria, Australia. **Diabetes Care** **1996**; 19:730-34.

- 63) Little RR. Recent Progress in Glycohemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) [editorial]. **Diabetes Care** 2000;23:265-66.
- 64) Baynes JW, Bunn HF, Goldstein DE, et al. National Diabetes Data Group: report of the expert committee on glycosylated hemoglobin. **Diabetes Care** 1984;7:602-06.
- 65) Little RR, Wiedmeyer H, England JD, et al. Interlaboratory comparison of glycohemoglobin results: College of American Pathologists Survey Data. **Clin Chem** 1991; 37:1725-29.
- 66) Bodor GS, Little RR, Garret N, et al. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. **Clin Chem** 1992;38:2414-18.
- 67) Little RR, Wiedmeyer H, England JD, et al. Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. **Clin Chem** 1992;38:2472-78.
- 68) Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, et al. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. **Clin Chem** 1994;40:138-44.
- 69) Weykamp CW, Penders TJ, Miedema K, et al. Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. **Clin Chem** 1995;41:82-86.
- 70) Gibb I, Parnham AJ, Lord C, et al. Standardization of glycated hemoglobin assays throughout the Northern region of England: a pilot study. **Diabet Med** 1997;14:584-88.
- 71) Gillery P, Dumont G, Vassault A. Evaluation of GHb assays in France by national quality control surveys. **Diabetes Care** 1998;21:265-70.

- 72) National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). University of Missouri, <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp>. Acessado em Julho 2003.
- 73) Miedema K. Electrospray mass spectrometry for measurement of glycohemoglobin. **Clin Chem** 1997, 43:705-07.
- 74) Roberts NB, Green BN, Morris M. Potential of electrospray mass spectrophotometry for quantifying glycohemoglobin. **Clin Chem** 1997, 43:771-78.
- 75) Kobold U, Jeppsson J-O, Dulffer T, et al. Candidate reference methods for hemoglobin A<sub>1c</sub> based on peptide mapping. **Clin Chem** 1997, 43:1944-51.
- 76) Nathan D. Labile glycosylated hemoglobin contributes to hemoglobin A<sub>1c</sub> as measured by liquid chromatography or electrophoresis. **Clin Chem** 1981; 27:1261-63.
- 77) Little RR, England JD, Wiedmeyer, Goldstein D. Effects of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. **Clin Chem** 1983; 29:1113-15.
- 78) Simon M, Hoover JD. Effect of sample instability on glycohemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) measured by cation exchange chromatography. **Clin Chem** 1982; 28:195-98.
- 79) Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. **Clin Chem** 2001;47:153-63.
- 80) Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet F, van der Silk W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. **Clin Chem** 1993; 39:1717-23.
- 81) Roberts WL, McCraw M, Cook C. Effects of sickle cell trait and hemoglobin C trait on determinations of HbA<sub>1c</sub> by an immunoassay method. **Diabetes Care** 1998; 21:983-86.

- 82) Roberts WL, Chiasera JM, Ward-Cook KM. Glycohemoglobin results in samples with hemoglobin C or S trait: a comparison of four test systems. **Clin Chem** 1999; 45:906-09.
- 83) Frank EL, Moulton L, Little RR, Wiedmeyer HM, Rohlfing C, Roberts WL. Effects of hemoglobin C and S traits on seven glycohemoglobin methods. **Clin Chem** 2000; 46:864-67.
- 84) Roberts WL, Frank EL, Moulton L, Papadea C, Noffsinger JK, Ou CN. Effects of nine hemoglobin variants on five glycohemoglobin methods. **Clin Chem** 2000; 46:569-72.
- 85) Nakanishi T, Miyazaki A, Iguchi K, Shimizu A. Effect of hemoglobin variants on routine glycohemoglobin measurements assessed by a mass spectrometric method. **Clin Chem** 2000; 46:1689-92.
- 86) Gram-Hansen P, Eriksen J, Mourits-Andersen T, Olesen L. Glycosylated haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in iron- and vitamin B<sub>12</sub> deficiency. **J Intern Med** 1990; 227:133-36.
- 87) Jiao Y, Okumiya T, Saimara T, Park K, Sasaki M. Abnormally decreased HbA<sub>1c</sub> can be assessed with erythrocyte creatine in patients with a shortened erythrocyte age. **Diabetes Care** 1998, 21:1732-35.
- 88) Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A<sub>1c</sub> in type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Int** 1999; 41:357-62.
- 89) Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. **Clin Chem** 1993; 39:138-42.

- 90) Weykamp CW, Miedema K, Haan T, Doelman CJ. Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. **Clin Chem** 1999; 45:438-40.
- 91) Little R, Agrawal A, Tennill A, England J, Khanna R, Goel S, Ou C, Goldstein D. Can glycohemoglobin (GHb) be used to accurately assess glycemic control in patients with chronic renal failure (CRF)? **Clin Chem** 1999, 45 [suppl]:A4.
- 92) Nathan D, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. **Clin Chem** 1983; 29:466-69.
- 93) Koskinen LK, Korpela MM, Lahtela JT, Laippala PJ, Pikkarainen PH, Koivula TA. Effect of acetaldehyde and acetylsalicylic acid on HbA<sub>1c</sub> chromatography in the FLPC method with Mono S cation exchanger. **Clin Chim Acta** 1998; 275:53-61.
- 94) Weykamp CW, Penders TJ, Baadenhuijsen H, Muskiet FA, Martina W, van der Slik W. Vitamin C and Glycohemoglobin. **Clin Chem** 1995; 41:713-16.
- 95) Davie S, Gould B, Yudkin JS. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. **Diabetes** 1992; 41:167-72.
- 96) Jain SK, Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. **Free Radic Biol Med** 1997; 22:593-96.
- 97) Bloomgarden ZT. Antioxidants and diabetes. **Diabetes Care** 1997; 20:670-73.
- 98) Shoff SM, Mares-Perlman JA, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein B, Ritter L. Glycosylated hemoglobin concentrations and vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene intake in diabetic and non-diabetic older adults. **Am J Clin Nutr** 1993; 58:412-16.
- 99) Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F. Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. **Diabetes Care** 1993; 16:1433-37.



- 100) Fuller CJ, Chandalia M, Garg A, Grundy S, Jialal I. RRR- $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation at pharmacologic doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr** 1996; 63:753-59.
- 101) Boeing H, Weisgerber UM, Jeckel A, Rose HJ, Kroke A. Association between glycated hemoglobin and diet and other lifestyle factors in a nondiabetic population: cross-sectional evaluation of data from the Postdam cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. **Am J Clin Nutr** 2000; 71:1115-22.
- 102) Krishnamurti U and Steffes MW. Glycohemoglobin: A primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. **Clin Chem** 2001;47:1157-65.

## Objetivos

**Geral:** analisar o efeito dos fatores analíticos, estados patológicos e drogas nos resultados de GHb.

**Específicos:**

- 1) Analisar a contribuição da fração lábil e das condições de armazenamento das amostras na medida de GHb por HPLC (Capítulo 1);
- 2) Analisar as possíveis causas de valores muito baixos de GHb medidos por HPLC (Capítulo 2);
- 3) Avaliar a interferência do uso de aspirina, vitamina C e vitamina E na medida da GHb em um grupo de indivíduos não-diabéticos (Capítulo 3).

## **Capítulo II**

### ***Effect of Pre - Analytical Variables on Glycohemoglobin Measurements in Routine Clinical Care***

Artigo submetido ao *Clinical Biochemistry* para publicação, em revisão.

# **Effect of Pre - Analytical Variables on Glycohemoglobin Measurements in Routine Clinical Care**

Joíza L Camargo MSc<sup>1, \*</sup>

Mariane Felisberto BSc<sup>1</sup>

Jorge L Gross MD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Pathology Department and <sup>2</sup>Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Porto Alegre, Brazil

*Short Running Title:* Pre-analytical variables and glycohemoglobin measurements

*Manuscript Category:* Analytical Investigation

This work was supported by a grant from Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Ministério de  
Ciência e Tecnologia (Pronex).

Corresponding author: Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro  
Barcellos, 2350, 2<sup>o</sup> andar, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-903, Fax Int +55 51 33325188, E-mail:

[jcamargo@hcpa.ufrgs.br](mailto:jcamargo@hcpa.ufrgs.br), [jorgegross@terra.com.br](mailto:jorgegross@terra.com.br)

### **Sinopse**

O objetivo deste estudo foi analisar a contribuição da fração lábil da HbA<sub>1c</sub> (L-A<sub>1c</sub>) e das diferentes condições de armazenamento das amostras nas determinações de glico-hemoglobina (GHb).

A eficácia na separação *on-line* da L-A<sub>1c</sub> pelo aparelho HPLC Hitachi L-9100 foi analisada, antes e depois das amostras serem tratadas para remoção da L-A<sub>1c</sub>. Cinco métodos diferentes para eliminação da L-A<sub>1c</sub>, antes da análise, foram comparados. O efeito das condições de armazenamento das amostras foi estudado através da comparação dos resultados de HbA<sub>1c</sub> em amostras conservadas em diferentes temperaturas pelo período de 3 meses.

Os resultados de HbA<sub>1c</sub>, antes e depois do pré - tratamento para eliminação da L-A<sub>1c</sub>, apresentaram excelente concordância. As amostras que não apresentaram pico definido para L-A<sub>1c</sub> no cromatograma foram superestimadas em até 1,64% HbA<sub>1c</sub>. As amostras que foram mantidas sob refrigeração (4 °C) apresentaram estabilidade por 10 dias e o armazenamento sob -20 °C subestimou significativamente a concentração de HbA<sub>1c</sub>, independente do tempo de armazenamento. As amostras que foram mantidas sob -80 °C foram estáveis por até 3 meses.

A ausência de um pico definido para L-A<sub>1c</sub> no cromatograma pode indicar que ainda existe uma fração que deve ser eliminada. Amostras que não podem ser imediatamente analisadas podem ser mantidas sob refrigeração por 10 dias. O armazenamento a longo prazo deve ser feito a - 80 °C.

### **Abstract**

**Objectives:** To analyze the contribution of the labile A<sub>1c</sub> fraction (L-A<sub>1c</sub>) and sample storage conditions on GHb measurements.

**Design and Methods:** True on-line L-A<sub>1c</sub> separation (HPLC L-9100) was evaluated before and after sample treatment for L-A<sub>1c</sub> elimination. Four methods for prior analysis of L-A<sub>1c</sub> removal were tested. The effect of sample storage conditions was studied in samples kept under different temperature over time.

**Results:** GHb results before and after pre-treatment were in agreement. Samples with no peak for L-A<sub>1c</sub> in the chromatogram were overestimated up to 1.64 %HbA<sub>1c</sub>. Samples at 4°C showed stability up to 10 days. Storage at -20°C underestimates GHb concentration at any time of storage. GHb samples are stable at -80°C for up to 3 months.

**Conclusions:** The absence of a peak for L-A<sub>1c</sub> may indicate that there is a fraction that must be eliminated. Samples that cannot be promptly processed may be kept under refrigeration up to 10 days. For long-term storage -80°C is the temperature of choice.

*Key Words:* glycated hemoglobin, metabolic control, labile fraction, sample storage

## ***Introduction***

Glycohemoglobin (GHb) has a key role in the metabolic control of diabetic patients (1). Long-term glycemic control is ideally indicated by the “A<sub>1c</sub> test” (2), a stable GHb containing primarily glycosylated N-terminal  $\beta$ -chains, and its level provides a glycemic history of the 2 to 3 months before the measurement. The results of the prospective randomized clinical trials, the Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) and the U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) (3,4) have consistently demonstrated that GHb/A<sub>1c</sub> levels below 7% are associated with a lower risk for development and/or progression of chronic complications in diabetic patients. The A<sub>1c</sub> test should be performed regularly in all diabetic patients (1,2).

Several factors have been shown to affect the results of A<sub>1c</sub> tests (5). There is evidence (6) that the biological variation of GHb is minimal and has little effect on the interpretation of serial results. However, the efficacy of the GHb assay is affected considerably by pre-analytical and analytical variation (1,7). The labile fraction (L-A<sub>1c</sub>) and storage conditions are important contributors to assay imprecision.

The initial stage in the glycation reaction is the formation of a labile aldimine (Schiff base or L-A<sub>1c</sub>) that may hydrolyze back to glucose and hemoglobin or undergo an Amadori rearrangement to form a more stable ketoamine (8). This fraction has an isoelectric point similar to stable A<sub>1c</sub> and may comigrate with this component when methods based on charge separation are used. It varies with glucose levels at sampling time and does not reflect the long-term mean glycemia. Unless actions are taken to remove or quantify the L-A<sub>1c</sub>, falsely high results will occur. The elimination of this fraction has to be done prior to analysis by sample pre-treatment or on-line,

automatically, in modern systems (9-12). The simplest but most laborious method for L-A<sub>1c</sub> elimination is the red cell incubation in isotonic saline for 6 hours at 37<sup>0</sup>C. Rapid removal systems have been developed such as hemolysis at acid pH, incubation with allosteric effectors, and chromatography separation itself. Some of these methods have been incorporated in HPLC analysers. Most HPLC systems use a hemolysing reagent that acts as a glucose trap (10,11). More recently, the separation of the L-A<sub>1c</sub> as a measurable peak rather than its elimination has been proposed (12,13).

Effects of blood storage conditions may also affect methods in different ways (1, 14-16) and lead to false results. The stability of hemoglobin is essential to interpret patient results from samples after storage and also to prepare quality control materials for monitoring method performance. Authors differ in their reports on sample stability for HbA<sub>1c</sub> analysis.

This study analysed the contribution of the L-A<sub>1c</sub> and sample storage on GHb measurements by a HPLC system in routine diabetes care.



## **Material and Methods**

### *Samples and Analytical method*

Blood samples collected in EDTA-containing evacuated test tubes were obtained from the routine laboratory workload. GHb was measured by HPLC (Hitachi L-9100 Glycated Hemoglobin Analyser, Tokyo, Japan). This cation-exchange system allows the separation of L-A<sub>1c</sub> as a distinct peak on the chromatogram. The assay is calibrated off-line by a conversion formula to assure the traceability to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) GHb reference method. During the period of this study, the laboratory at Hospital de Clínicas de Porto Alegre was regularly monitored by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), as part of a level I laboratory certification process (1). The analytical imprecision was monitored by using whole blood pools, with different A<sub>1c</sub> levels, prepared from fresh whole blood samples. The reference range for A<sub>1c</sub> (4.7 - 6.0 % HbA<sub>1c</sub>) was established based on 57 samples from normal individuals (44 women, 13 men, oral glucose tolerance test, WHO criteria).

### *Effect of Labile Fraction*

A total of 160 whole blood samples from diabetic patients were analysed. The study was performed in 3 steps: the two first steps were designed to evaluate the L-A<sub>1c</sub> peak resolution and the third step aimed to analyse the effectiveness of four different methods for L-A<sub>1c</sub> elimination.

*Step 1:* We compared A<sub>1c</sub> results from 80 samples without previous treatment and after 6 h saline incubation at 37<sup>0</sup>C (6SI) (9).

*Step 2:* Forty-five untreated samples that did not show a peak for L-A<sub>1c</sub> in the chromatogram were re-analysed after 6SI. The A<sub>1c</sub> results from samples without previous treatment and samples after treatment were compared.

*Step 3:* Thirty-five EDTA whole blood samples were submitted to five different methods to eliminate L-A<sub>1c</sub>: 3 and 6 h saline incubation at 37<sup>0</sup>C (3SI, 6SI), 3 and 6 h whole blood incubation at 37<sup>0</sup>C (3WBI, 6WBI) and hemolysis at pH 5.0 (pH 5). Samples for saline incubation were prepared adding saline 0.9% to the red cell precipitate in a 2:1 proportion. The whole blood incubation was carried out in the EDTA primary tube. The hemolysis at pH 5.0 was performed on-line by the HPLC analyser. 6SI was considered the reference method.

#### *Effect of Storage*

Ten EDTA whole blood samples from diabetic patients were kept under different temperature for up to 3 months. After being assayed, the fresh samples were spliced into 21 different microtubes and kept at 4, - 20 and -80 °C. An aliquot from each patient was analysed after 1, 7, 10, 15, 20, 31 and 100 days. The results from samples stored under these different conditions were compared to those obtained from whole blood fresh samples.

#### *Statistical Analysis*

Data are expressed as mean ( $\pm$  SD). Comparisons between methods were performed by linear regression analysis and Altman/Bland plots (17). ANOVA with Tukey correction or paired Student t test were used to compare groups, at a significance level of 5%, when appropriate.

## Results

### *Effect of labile fraction*

The  $A_{1c}$  results from samples with a peak for L- $A_{1c}$  ( $n = 80$ ) were 7.81% ( $\pm 2.02$ ) and 7.84 % ( $\pm 1.92$ ), before and after 6SI, respectively. These results showed an excellent correlation ( $r = 0.998$ ;  $n = 80$ ) and agreement (bias =  $0.02 \pm 0.17$  %  $A_{1c}$ ). The  $A_{1c}$  results for samples without a peak for L- $A_{1c}$  ( $n = 45$ ) were 8.17 ( $\pm 1.87$ ) and 7.42 ( $\pm 1.82$ ), before and after 6SI, respectively. Although there was an excellent correlation ( $r = 0.998$ ;  $n = 45$ ) between treated and untreated samples, the agreement was poor (bias =  $-0.75 \pm 0.45$ %  $A_{1c}$ ). Furthermore, values from untreated samples were higher ( $P < 0.0001$ ) than those from treated samples in the absence of a peak for L- $A_{1c}$ . Therefore, the untreated samples that did not show a peak for L- $A_{1c}$  in the chromatogram were overestimated up to 1.64%  $A_{1c}$ . When the five different methods for L- $A_{1c}$  elimination were compared, only the 6WBI was in acceptable agreement with 6SI (Table and Figure 1). Although there was no statistically significant difference between 3SI and 6SI results, the agreement between these two methods was poor. The 3WBI and pH5 treatments had little effect on L- $A_{1c}$  levels.

### *Effect of storage*

Whole blood samples stored at 4°C showed stability up to 10 days. Sample stored at -20°C showed a statistically significant lower  $A_{1c}$  concentration for any time of storage. Samples at 4°C and -20°C showed a 4.1 and 10.3% decrease after 15 days of storage, respectively (Table and Figure 2). There was no difference in  $A_{1c}$  concentration between fresh samples and samples stored at -80°C for up to 3 months.

## ***Discussion***

This study shows that the unresolved L-A<sub>1c</sub> and inadequate storage conditions may have a significant effect on GHb results.

L-A<sub>1c</sub> accounts for 2-3% of total A<sub>1c</sub> in normal subjects and up to 10% in diabetic individuals (9). This will correspond to 1.0% A<sub>1c</sub> in a patient presenting a total A<sub>1c</sub> of 10%. This value will be lower for those patients near the ADA target level of 7% A<sub>1c</sub> (2). The analysers that perform on-line L-A<sub>1c</sub> separation and quantification must have a high peak resolution to achieve a true A<sub>1c</sub> result. Furthermore, L-A<sub>1c</sub> dissociates during storage and the values may fall by half or more within 10 days. If samples are not promptly analysed, the L-A<sub>1c</sub> may decrease to very low levels and the resolution peak may be compromised. An unresolved fraction will occur and lead to falsely higher results. Several factors may be involved in the lack of peak resolution. Newer dedicated GHb analysers show a high degree of automation to allow a high sample throughput. Time for Hb species separation has been decreased and the resolution may not be sufficient to separate small amounts of L-A<sub>1c</sub>. Laboratories must look out for the presence of a L-A<sub>1c</sub> on the chromatogram if the separation is on-line. If an L-A<sub>1c</sub> peak is not present, samples should be re-assayed after treatment for L-A<sub>1c</sub> removal.

Our data showed that the HPLC system used is able to give a true HbA<sub>1c</sub> when the chromatogram shows a measurable peak for L-A<sub>1c</sub>. There was no difference between results from samples that were treated to remove L-A<sub>1c</sub> by the traditional 6SI before analysis and samples without previous treatment. However, in the absence of a measurable or resolved peak for L-A<sub>1c</sub> there still is a fraction overestimating the final results. This conclusion was based on the observation that treating these samples to remove L-A<sub>1c</sub> there was a 0.75% A<sub>1c</sub> mean reduction as compared to samples that were

not pre-treated. In these cases, whole blood incubation at 37<sup>0</sup>C for 6 hours may be a more practical alternative method for L-A<sub>1c</sub> removal since it uses the primary EDTA tube in the process, avoiding sample manipulation. A<sub>1c</sub> values after 3SI did not present a significant difference from A<sub>1c</sub> values after 6SI but the bias (0.22 ± 0.37) was greater than 6WBI. The other methods tested were not appropriate for L-A<sub>1c</sub> removal since they presented an unacceptable bias when compared to 6SI.

In addition to L-A<sub>1c</sub> interference, our data showed that some sample storage conditions may be an important contribution to method imprecision. There are a few studies reporting the stability of whole blood samples for GHb analysis (14,15) and authors differ in their reports. It has been suggested that the effect of storage is method-dependent (1). Our results showed that whole blood samples kept under refrigeration are suitable for analysis up to 10 days and storage at -80<sup>0</sup>C is also appropriate for GHb analysis. These data are in agreement with previous reports (1,14,15). However, storage at -20<sup>0</sup>C is not suitable for GHb analysis since we observed a relative decrease as large as 2.6% after only 24h storage. There are very few data in the literature that analysed this aspect (1). While there are data reporting the stability of hemolysates up to several months under these temperatures (14,15), there is little information on whole blood stability. In 2001, the NGSP Committee published its first report (18) with details of long-term method imprecision and GHb stability. However, the samples used for analysis were hemolysates and the data reported were not related to the whole blood storage. Our data showed that whole blood is stable for up to 3 months if stored at -80<sup>0</sup>C. This stability may be as long as 2 years as shown by the long-term imprecision (CV < 3%), using frozen whole blood pools as quality control material, of the HPLC analyser at our laboratory (unpublished data). The validation data available from the

widely used HPLC systems (11-13) do not present data related to the effect of long-term whole blood storage on GHb values. Although long-term storage is not applied for routine use, it is very important to store quality control materials. The stability of whole blood samples should be tested by all laboratories regardless of the method used, to assess the viability of these samples as control materials, rather than lyophilized or hemolysate samples. The transport temperature is also an important issue in GHb analysis. Small laboratories may not have the technical conditions to measure GHb adequately and samples have to be transported to reference laboratories under proper conditions.

In conclusion, the absence of a detectable peak in the chromatogram may be evidence that there is an L-A<sub>1c</sub> that must be eliminated. 6WBI in EDTA primary tube is an alternative practical method to eliminate this fraction prior to analysis. Samples that cannot be promptly processed may be kept under refrigeration up to 10 days or at  $-80^{\circ}\text{C}$  if long-term storage is required.

Laboratory staff must be aware of these pitfalls to avoid adding more confusion to the clinical interpretation of GHb values.

### ***Acknowledgements***

We thank the staff of the Clinical Chemistry Unit for providing GHb samples and results. Parts of this study were presented at the 61<sup>st</sup> and 62<sup>nd</sup> Annual Meetings of the American Diabetes Association (ADA), in Philadelphia and San Francisco, 2001 and 2002, respectively. This work was supported by a grant from Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Ministério de Ciência e Tecnologia (Pronex).

**Table 1:** Comparison of 5 methods to eliminate labile fraction prior to analysis. The 6-h saline incubation at 37<sup>0</sup>C (6SI) was considered the reference method.

<b>Methods for elimination of the labile fraction</b>					
	<b>6SI</b>	<b>3SI</b>	<b>3WBI</b>	<b>6WBI</b>	<b>pH 5</b>
<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	7.30	7.52	7.66 *	7.36	7.83 **
(± SD)	(± 1.36)	(± 1.41)	(± 1.50)	(± 1.43)	(±1.58)
<b>Bias</b>	—	- 0.22	0.36	- 0.06	- 0.46
<b>(6SI - Compared Method)</b>		(± 0.37)	(± 0.40)	(± 0.30)	(± 0.53)
<b>Mean Relative Error (%)</b>	—	3.01	4.93	0.82	6.30

p < 0.01 vs 6SI; \*\*p < 0.001 vs 6SI. 6SI = 6 h saline incubation at 37<sup>0</sup>C, 3SI = 3 h saline incubation at 37<sup>0</sup>C,

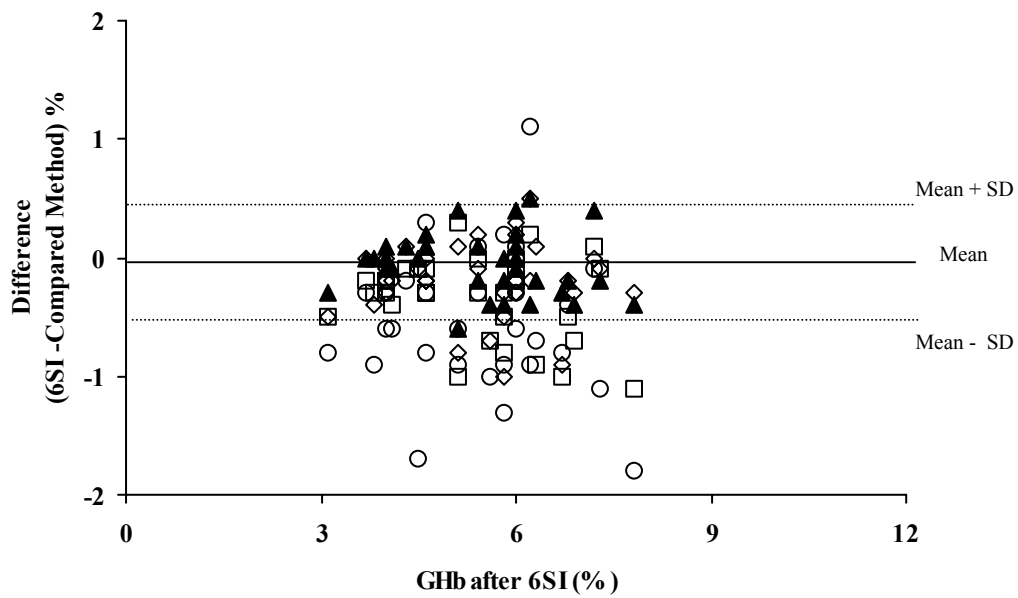
3WBI = 3 h whole blood incubation at 37<sup>0</sup>C, 6WBI = 6 h whole blood incubation at 37<sup>0</sup>C, pH5 = hemolysis at pH 5.0



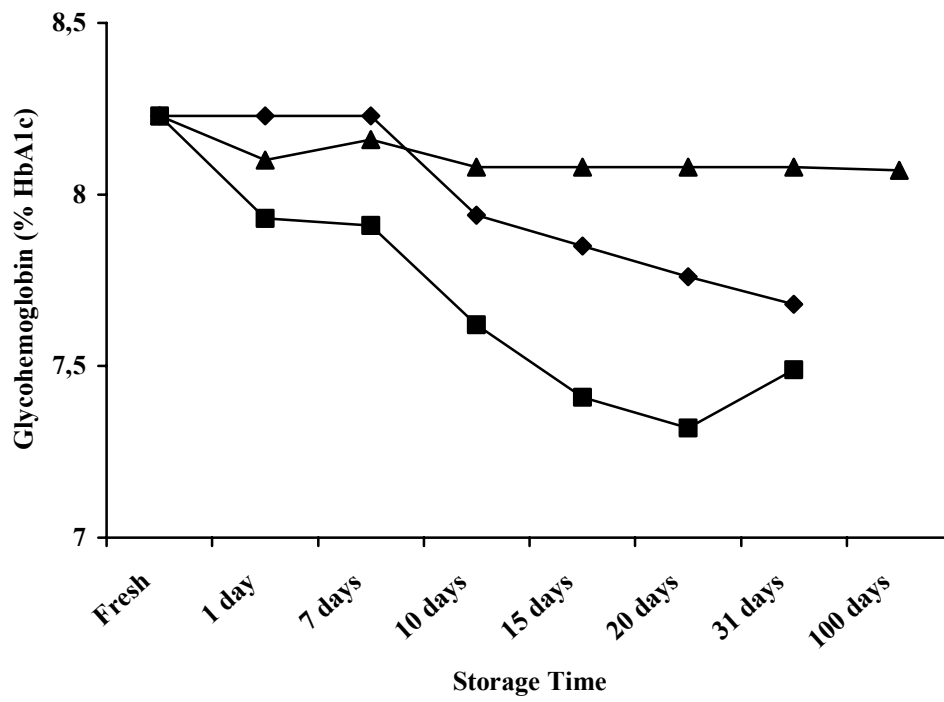
**Table 2:** Glycohemoglobin results in whole blood samples stored under different conditions over time

	% HbA <sub>1c</sub> (± SD)							
	Fresh	1 day	7 days	10 days	15 days	20 days	31 days	100 days
<b>4<sup>0</sup>C</b>	8.14 (± 1.61)	8.14 (± 1.59)	8.05 (± 1.63)	7.94 (± 1.54)	7.85 * (± 1.54)	7.76 ** (± 1.52)	7.56 ** (± 1.55)	-
<b>-20<sup>0</sup>C</b>	8.14 (± 1.61)	7.93 * (± 1.57)	7.91 * (± 1.58)	7.68 ** (± 1.53)	7.48 ** (± 1.53)	7.39 ** (± 1.47)	7.17 ** (± 1.38)	-
<b>-80<sup>0</sup>C</b>	8.14 (± 1.61)	8.10 (± 1.60)	8.16 (± 1.60)	8.08 (± 1.60)	8.06 (± 1.57)	8.06 (± 1.64)	8.06 (± 1.62)	8.07 (± 1.60)

\* p < 0.05 vs Fresh, \*\* p < 0.001 vs Fresh



**Figure 1:** Comparison of 5 methods to eliminate the labile fraction prior to analysis. The 6-h saline incubation at 37<sup>0</sup>C (6SI) was considered the reference method. 3SI = 3-h saline incubation at 37<sup>0</sup>C; 3WB = 3-h whole blood incubation at 37<sup>0</sup>C; 6WB = 6-h whole blood incubation at 37<sup>0</sup>C; pH 5.0 = hemolysis at pH 5.0.      ▲ 6WBI   □ 3WBI   ○ pH 5.0   ◇ 3SI



**Figure 2:** Effect of temperature storage on glycohemoglobin results from whole blood samples.

◆ 4°C ■ -20°C ▲ -80 °C

### **References**

- 1) Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDoneld JM and Parrot M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem 2002;**48**:436-472.
- 2) American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 2003;**26** (Suppl 1):S106-S108.
- 3) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetics on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993;**329**:977-986.
- 4) U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998;**352**:837-851.
- 5) National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). University of Missouri, <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp/factors.htm>. Assessed in July 2002.
- 6) Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, Grotz VL, Tennil A, England J, Madsen R and Goldstein D. Biological variation of glycohemoglobin. Clin Chem 2002;**48**:116-118.
- 7) Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 2001;**47**:153-163.
- 8) Higgins PJ and Bunn HF. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. J Biol Chem 1981;**256**:5204-5208.

- 9) Nathan D. Labile glycosylated hemoglobin contributes to hemoglobin A<sub>1c</sub> as measured by liquid chromatography or electrophoresis. *Clin Chem* 1981;**27**:1261-1263.
- 10) The Diabetes Control and Complications Trial. Feasibility of centralized measurements of glycosylated hemoglobin in the Diabetes Control and Complications Trial: a multicenter study. *Clin Chem* 1987; **33**:2267-2271.
- 11) John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Akroy HA8140 hemoglobin A<sub>1c</sub> analyzer. *Clin Chem* 1997;**43**:968-975.
- 12) Higgins Tn, Blakney GB, Dayton J. Analytical evaluation of the Bio-Rad Variant II automated HbA<sub>1c</sub> analyzer. *Clin Biochem* 2001;**34**:361-365.
- 13) Gibb I, Parnham A, Fonfrede M and Lecoock F. Multicenter evaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer. *Clin Chem* 1999;**45**:1833-1841.
- 14) Little RR, England J, Wiendmeyer HM and Goldstein D. Effect of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. *Clin Chem* 1983;**29**:1113-1115.
- 15) Simon M and Hoover JD. Effect of sample instability on glycohemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) measured by cation-exchange chromatography. *Clin Chem* 1982;**28**:195-198.
- 16) Youngman LD, Clark S, Manley S, Peto R and Collins R. Reliable measurement of glycosylated hemoglobin in frozen blood samples: implications for epidemiologic studies [Letter]. *Clin Chem* 2002;**48**:1627-1629.
- 17) Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;**i**:307-310.

- 18) Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB and Goldstein D.  
The National Glycohemoglobin Standardization Program: A five-year report  
progress. Clin Chem 2001;**47**:1985-1992.

### **Capítulo III**

***Conditions associated with very low values of glycohemoglobin measured  
by a HPLC method***

Artigo aceito para publicação no *Journal of Clinical Pathology*.

## **Conditions associated with very low values of glycohemoglobin measured by a HPLC method**

Joíza L Camargo MSc <sup>1</sup>

Jorge L Gross MD <sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>Clinical Pathology Department and <sup>2</sup>Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Porto Alegre, Brazil

*Short Title:* Very low GHb and associated factors

*Key Words:* glycated hemoglobin, metabolic control, variant hemoglobin, anemia

This work was supported by a grant from Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Ministério de Ciência e Tecnologia (Pronex).

\*Corresponding author: Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcellos, 2350 Prédio 12, 4<sup>o</sup> andar, Porto Alegre, RS, Brazil, 90035-003, Fax Int +55 51 33325188, E-mail: [jorgegross@terra.com.br](mailto:jorgegross@terra.com.br); [jcamargo@hcpa.ufrgs.br](mailto:jcamargo@hcpa.ufrgs.br).



### **Sinopse**

O objetivo deste trabalho foi identificar as causas de valores muito baixos de glico-hemoglobina (GhH) em um grupo de pacientes diabéticos do sul do Brasil, usando HPLC.

No período de Agosto de 1996 e Dezembro de 2001, todas as amostras provenientes de pacientes diabéticos, que foram analisadas para GhH na Unidade de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e apresentaram GhH com valor abaixo do intervalo de referência (4,7 – 6,0 % HbA<sub>1c</sub>), foram submetidas a eletroforese de hemoglobina (Hb). Todos os prontuários foram revistos para se identificar condições que poderiam estar associadas com estes valores baixos.

Durante o período, 29.657 amostras foram analisadas, 130 pacientes apresentaram GhH < 4,7 %. Setenta e três pacientes (56%) foram heterozigotos para Hb S, C ou D (19 negros, 3 mulatos e 51 brancos). Os outros 57 pacientes (44%) que não apresentaram Hb anômala apresentaram valores baixos de hematócrito e hemoglobina (42 pacientes) ou outras condições como gravidez, lipemia, câncer, cirrose, uso de ácido acetilsalicílico e ausência de diabetes (15 pacientes).

A presença de Hb anômala pode falsamente baixar os valores de GhH. No entanto, a anemia é também uma importante fonte de interferência negativa nos resultados. Para a correta interpretação dos valores de GhH, o estado hematológico do paciente sempre deve ser considerado.

### **Abstract**

**Aims:** To identify the causes of very low glycohemoglobin (GHb) levels in a sample of diabetic patients in southern Brazil using high-pressure liquid chromatography (HPLC).

**Methods:** Between August 1996 and December 2001 all samples from diabetic patients at a university hospital with GHb values below the reference range (4.7-6.0% HbA<sub>1c</sub>) were submitted to cellulose acetate electrophoresis. Medical records were reviewed to identify conditions that might be associated with these low values.

**Results:** Among 29,657 samples analyzed, 130 patients had GHb < 4.7%. Seventy-three patients (56%) were heterozygous for Hb S, C or D (19 black, 3 mulatto, 51 white patients). The other 57 patients (44%) without Hb variant had low hematocrit and hemoglobin values (42 patients) or other conditions such as pregnancy, lipemia, malignancy, cirrhosis, acetylsalicylic acid use and absence of diabetes (15 patients).

**Conclusions:** The presence of an Hb variant may falsely lower GHb measurements. However, anemia is also a source of negative interference. Hematological status should be considered for correct interpretation of GHb results.

## ***Introduction***

The glycohemoglobin (GHb) test is a valuable tool for monitoring blood glucose control over time, and as such it is a key issue in diabetes care and management. According to the American Diabetes Association (ADA), GHb should be measured regularly in all diabetic patients, and values should be maintained below 7% to prevent and/or decrease the risk for chronic complications [1].

GHb is formed *in vivo* by a reaction between glucose and the NH<sub>2</sub>-terminal of the hemoglobin (Hb)  $\alpha$ - or  $\beta$ - chains [2]. This irreversible non-enzymatic reaction between glucose and hemoglobin A, the main type of Hb in normal adults, occurs over the life span of the erythrocyte. The resulting HbA<sub>1c</sub> is a stable GHb containing primarily glycosylated N-terminal  $\beta$ -chains [3], and its total amount depends directly on the average glucose concentration over the 2 to 3 months before the measurement [4,5].

However, the presence of Hb variants may falsely lower GHb values. Bry et al. [6] stressed that the identification of Hb variants is important to avoid inaccurate GHb results. The prevalence of the most common Hb variants (HbS, C and D) depends on the genetic background of the population being analyzed. Although relatively rare in Caucasians, these variants are common in populations with heterogeneous ethnic backgrounds [7]. In such populations, misleadingly low GHb values have been identified by some methods, but not by others. The influence of Hb variants on GHb determination has been shown to be method-dependent, and also to be greater when ion-exchange HPLC is used [8-13]. In addition, several other factors besides the presence of genetic variants or chemically-modified derivatives of hemoglobin [13], such as drugs, anemia, uremia and alcoholism, may also falsely lower GHb results. Nevertheless, most of these data originate from method evaluation or validation protocols studies. The magnitude and impact of the

effects of these interferences in routine clinical practice have not yet been well established.

Therefore, we analyzed the possible causes of very low GHb results measured by HPLC in a sample of diabetic patients in southern Brazil.

## **Materials And Methods**

### *Samples*

From August 1996 to December 2001, 29,657 samples from diabetic patients attending the outpatient diabetic clinic at Hospital de Clínicas de Porto Alegre were collected for GHb determination. According to the last census [14], 86% of the state population are classified as white, 8.4% as mulatto, 4.0% as black and 0.9% as native, yellow or not defined (classification based on self-reporting). The patient population at this center reflects this ethnic distribution.

Based on the clinical observation of discordant results between GHb measurements and home glucose monitoring in some patients, we decided to submit all samples with GHb values below the lower limit of our reference range (4.7 to 6.0% HbA<sub>1c</sub>) to Hb electrophoresis following the protocol depicted in Figure 1. Blood was collected in evacuated test tubes containing EDTA. Samples were pretreated to eliminate the labile fraction and stored at 4 °C. The analysis was carried out within 5 days of collection [15]. All medical records were reviewed to identify other conditions or factors that might be associated with low GHb values. Ethnicity was defined by patient self-reporting registered in the medical records.

Ten samples from known non-diabetic individuals, 5 homozygous and 5 heterozygous for HbS, as identified by the Hematology Department and confirmed by Hb electrophoresis, were also analyzed for GHb. These samples were used as controls to test the ability of the GHb method to recognize and quantify Hb variants.

### *Analytical methods*

GHb was measured by HPLC (Merck - Hitachi L-9100 Glycated Hemoglobin Analyzer, Tokyo, Japan) using a CCMpack Hb-S column in high-speed mode. This cation-exchange column allows separation of HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub>, HbF, labile HbA<sub>1c</sub>, stable HbA<sub>1c</sub> and HbA<sub>0</sub>. The reference range for GHb (4.7 - 6.0 % HbA<sub>1c</sub>) was established based on 57 samples from normal individuals (44 women, 13 men, oral glucose tolerance test, WHO criteria). The laboratory at Hospital de Clínicas de Porto Alegre is regularly monitored by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) to ensure traceability to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) GHb reference [16, 17].

Intra and inter assay precision was evaluated by measuring samples with different levels of HbA<sub>1c</sub> in a same run or in different runs over 20 days. To study the effect of the hematocrit on the assay, whole blood samples (n = 5) were spiked with different amounts of their own plasma to obtain hematocrit levels ranging from 0.10 to 0.45 v/v (10 to 45%); these blood samples were then analyzed for GHb.

Hb electrophoresis was performed with cellulose acetate film and TRIS-EDTA-Borate 0.025M buffer pH 8.6 (Cellogel<sup>®</sup>, Italy), and quantification was carried out by elution and reading at 413 nm in a spectrophotometer (Hitachi 2000U, Tokyo, Japan). Samples presenting Hb variants were submitted to qualitative electrophoresis on agar gel with phosphate buffer pH 6.5 (Bacto-Agar<sup>®</sup>, US) for identification of Hb type.

Hemograms were performed by a Pentra 2000 Automated System (ABX<sup>®</sup> Diagnostic System).

*Statistical analysis*

The non-parametric Mann Whitney test was used for comparison between groups with a significance level of 5%.

*Ethical Aspects*

The study protocol was approved by the Ethics Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **Results**

The intra assay imprecision (CV) were  $< 1.5\%$  (1.05, 1.46, and 1.37 % for low, medium and high HbA<sub>1c</sub> levels, respectively) and the inter assay imprecision were  $< 3.0\%$  (2.79, 2.49, 1.46% for low, medium and high HbA<sub>1c</sub> levels, respectively). The hematocrit level did not affect assay precision since there was no difference in GHb results in a same sample with hematocrit ranging from 0.10 to 0.45 v/v (10 to 45%) in vitro.

A total of 29,657 samples were analyzed for GHb determination. Very low GHb levels were detected in 130 patients (Table 1 and Figure 2). In 73 patients, an anomalous Hb was identified by electrophoresis: 19 patients were black, 3 were mulatto, and the others were white.

In the 5 non-diabetic patients from the Hematology Division who were homozygous for HbS, HbA<sub>1c</sub> levels were equal to 0%. Their chromatograms showed a double HbA<sub>0</sub> peak that could not be quantified by the analyzer. The 5 non-diabetic patients who were heterozygous for HbS had very low GHb levels, similarly to the diabetic patients presenting HbAS, HbAC or HbAD. There were no abnormalities in the chromatograms of these patients; there were no extra peak and no cases of incomplete separation. In the one non-diabetic patient who was heterozygous for HbS and HbC a double HbA<sub>0</sub> peak that was not quantified by the analyzer was also observed.

Except for very low GHb values, none of the diabetic patients who were heterozygous for the Hb variant presented any clinical evidence suggesting the presence of this variant.

In 57 (44%) patients with GHb levels below 4.7%, no Hb variant was identified. Like the 73 patients in whom the Hb variant was identified, these patients did not present any alteration in the HPLC chromatograms. However, 42 had low hematocrit



values [0.10 – 0.38 (33) v/v (10 – 37.8 (33) %; range (median)]; reference range from 0.41 to 0.53 v/v (41 to 53%) and from 0.36 to 0.46 v/v (36 to 46%), for men and women, respectively] and hemoglobin [31 - 127 (107) g/L (3.1 – 12.7 (10.7) g/dL)]; reference range from 135 to 175 g/L (13.5 to 17.5 g/dL) and from 120 to 160 g/L (12 to 16 g/dL), for men and women, respectively]. The other 15 patients presented other clinical conditions but no anemia (Figure 2). Two patients presented gross lipemia [triglycerides > 15.8 mmol/L (600 mg/dL)]. One HIV-positive patient was receiving treatment with anti-retroviral agents, itraconazole, sulfadiazin, pirimetamin, and folic acid.

There was a significant difference between the values of GHb, Ht and Hb in patients with and without the Hb variant ( $p < 0.001$ , Table 1).

### ***Discussion***

The present study shows that the presence of anomalous Hb is a major cause of very low values of GHb [as detected by HPLC]. Among our patients presenting GHb levels below 4.7%, 56% (70% of whom were classified as white) of the results may be accounted for by the presence of the Hb variant.

These findings are not surprising if one takes into account the ethnic heterogeneity of the Brazilian population. Even in those persons identified as white in Brazil, the HbAS genotype is present in about 1%. Although according to the last national census 86% of the Brazilian population is white, it is expected that a large number of people carry the HbS gene, confirming the mixed genetic background of this population [7,14].

In cases with Hb variant, it has been suggested [18,19] that “true” HbA<sub>1c</sub> results may be obtained after appropriate correction based on the peak area for each glycosylated and non-glycosylated component separated in the chromatograms. In our case, the HPLC does not recognise Hb variant and the calculation for the glycosylated component is only related to HbA<sub>1c</sub>, not to HbS<sub>1c</sub>, C<sub>1c</sub> nor to D<sub>1c</sub>, resulting in very low GHb values. The mean amount of Hb variant in our samples were 33% (range from 21.7 to 44.1%). Therefore, we may assume that the GHb values for these heterozygous patients for Hb variant are around 33% higher. It is worth mentioning that some rare variants may have different glycosylation rates as compared with normal Hb A [18]. We recommend that laboratories measure GHb, by a method that is not affected by the interference, rather than estimate it.

Surprisingly, 44% (57 patients) of the very low GHb values we observed were not accounted for by the presence of Hb variant. All medical records were reviewed to

identify a possible cause for these low GHb values. Five patients had GHb measurements performed during the diagnosis of diabetes (WHO criteria) - with negative results - and 2 were pregnant. Malignancies, HIV or HCV infection, chronic use of aspirin, lipemia and alcoholic cirrhosis were present in 8 patients. Apart from alcoholism, lipemia and chronic ingestion of salicylates, which affect some GHb assays [13], the other conditions have not been reported to interfere with GHb measurements. We believe that the concomitant use of many drugs to treat these patients may have had a GHb-lowering effect. Other causes for this negative interference in these cases remain to be elucidated.

Still, all the conditions observed in our patients without Hb variant explain only 26.3% of these very low GHb results. Most patients who did not have anomalous Hb (73.7%) presented low hematocrit and hemoglobin values for their sex and age, suggesting that anemia could be associated with lower GHb values. Decreased red cell survival and mean erythrocyte age falsely lower GHb values [13]. Blood loss, hemolytic anemia, sickle cell anemia and chronic renal disease affect the life span of red cells and are known to be associated with underestimated GHb values [6,20]. On the other hand, iron and B<sub>12</sub> vitamin deficiency have been reported to overestimate GHb results [21,22]. The data presented herein show that different degrees of anemia are associated with very low values of GHb. This may be due to small alterations in red cell survival or velocity of GHb formation, leading to an underestimation of GHb results. Such alterations cannot be attributed to assay interference, since GHb measurements were precise (CV < 5%) in a same sample with a hematocrit ranging from 0.10 to 0.45 v/v (10 to 45%) in vitro. Furthermore, the intra and inter assay precision were acceptable for very low values of GHb (CV < 3%, mean 4.2% HbA<sub>1c</sub>). An example of a patient with

minor anemia and very low GHb is shown in Figure 3. Correction of anemia was followed by an increase in GHb. The expected value, based on fasting plasma glucose during the period analyzed, closely matched the value measured after correction of Ht and Hb levels. However, the DCCT showed that fasting plasma glucose underestimates GHb results, so that the true GHb levels for our patient with minor anemia may be higher [23].

The effect of anemia seems to be an *in vivo* effect. This effect is probably due to reduced red cell survival in these patients. If this is true, this *in vivo* effect will also affect GHb measurements by other methods and assays.

One possible limitation of this study was that it only picked up diabetic patients with GHb values below the lower limit of the reference range. However, some diabetic patients may present Hb variant, low hematocrit or another ill-defined interference and GHb values that do not agree with their home blood glucose monitoring. The interference may be more clinically relevant with poor metabolic control. In view of the fact that GHb measurement is a key issue in diabetes care and management, the detection of these patients is very important to monitor their blood glucose control over time. The laboratory should assure that their GHb results will not be misinterpreted. Physicians must be aware of the possibility of such interference in their clinical setting and should contact laboratories if discrepancies between clinical impressions and laboratory data are observed. Another limitation was the HPLC system used. Although it belongs to the first generation of dedicated HbA<sub>1c</sub> HPLC systems, it is DCCT- traceable and very precise. Modern HPLC systems are now able to identify and quantify Hb variant precisely and accurately. However, we believe that the experience reported here may be

useful for other laboratories, using different methods, to guarantee the results of their GHb measurements by controlling possible pitfalls.

In conclusion, the present results show the importance of knowledge concerning the conditions affecting GHb methods in a particular clinical setting. Besides the presence of Hb variant, anemia is also a major source of negative interference. Hematological status should always be considered to ensure the correct interpretation of GHb results.

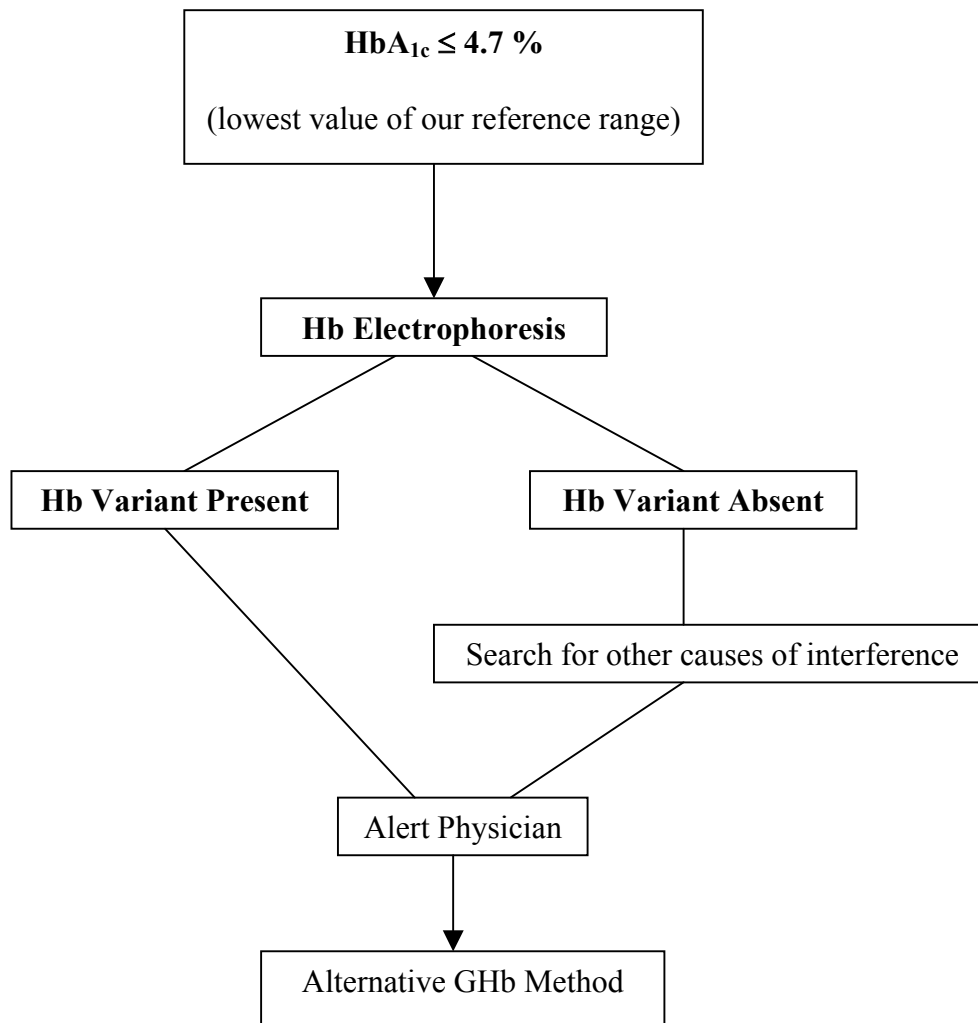
### ***Acknowledgments***

We thank J. Stiff for reviewing medical records, and the staff of the Clinical Chemistry and Hematology Units for providing GHb samples and results. This work was supported by a grant from Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Ministério de Ciência e Tecnologia (Pronex).

**Table 1:** Characteristics and results of Hb, Ht and HbA<sub>1c</sub> [range (median)] in a group of diabetic patients with very low values of GHb in southern Brazil.

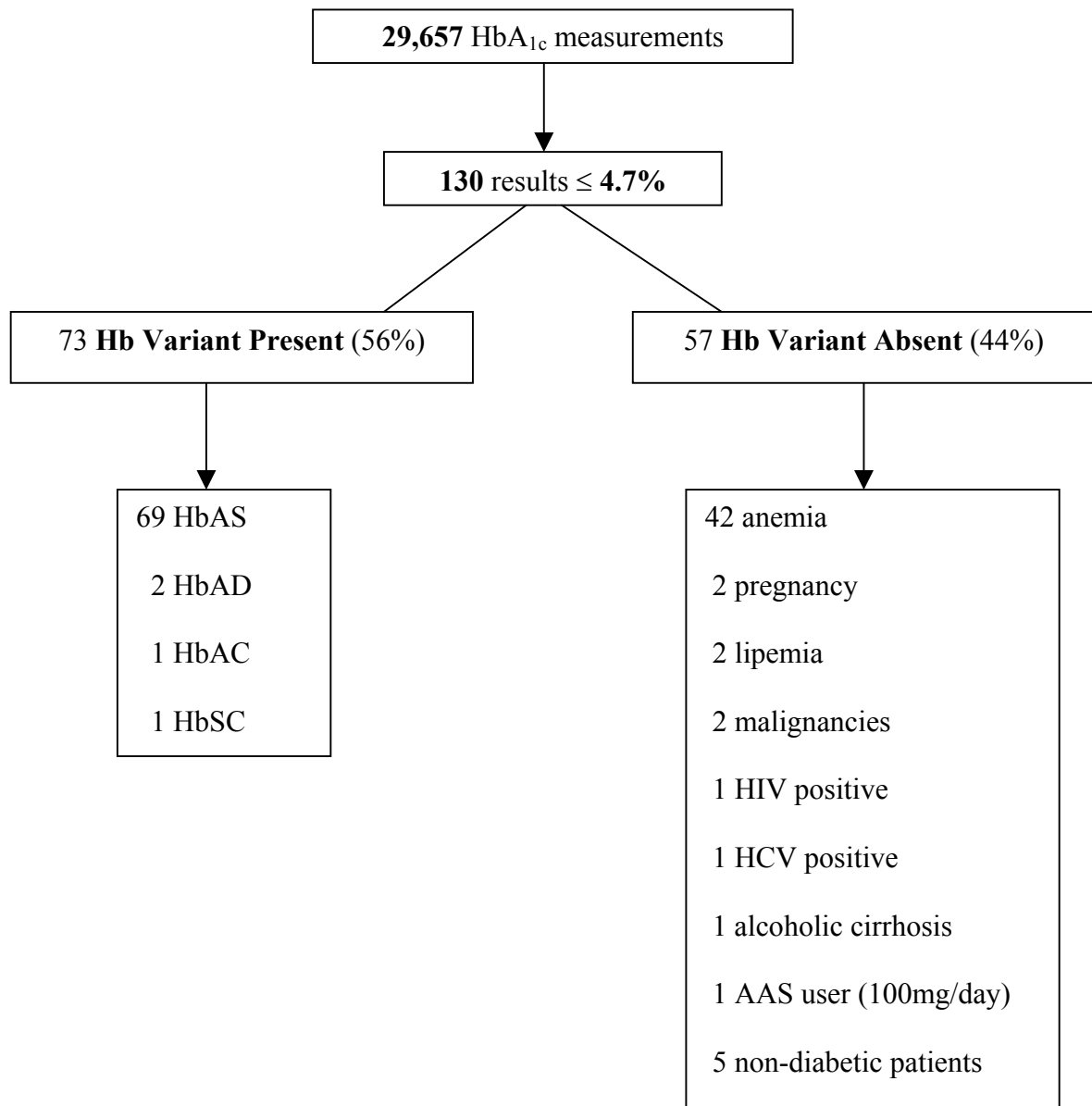
	<b>Hb variant present</b>	<b>Hb variant absent</b>
<b>N</b>	73	57
<b>Gender (male/female)</b>	16/57	32/25
<b>Age range (years)</b>	11 - 82 (55)	12 - 66 (41)
<b>Ethnicity</b>	19 blacks, 3 mulatto, 51 whites	4 blacks, 53 whites
<b>Hematocrit* (v/v)</b>	0.30 - 0.50 (0.40)	0.10 - 0.52 (0.38)
<b>(%)</b>	30.1 - 50.3 (40.6)	10.0 - 51.8 (37.8)
<b>Hemoglobin* (g/L)</b>	95 - 167 (132)	31 - 169 (119)
<b>(g/dL)</b>	9.5 - 16.7 (13.2)	3.1 - 16.9 (11.9)
<b>HbA<sub>1c</sub>* (%)</b>	2.94 - 4.70 (4.09)	3.40 - 4.70 (4.43)

\* p < 0.001.

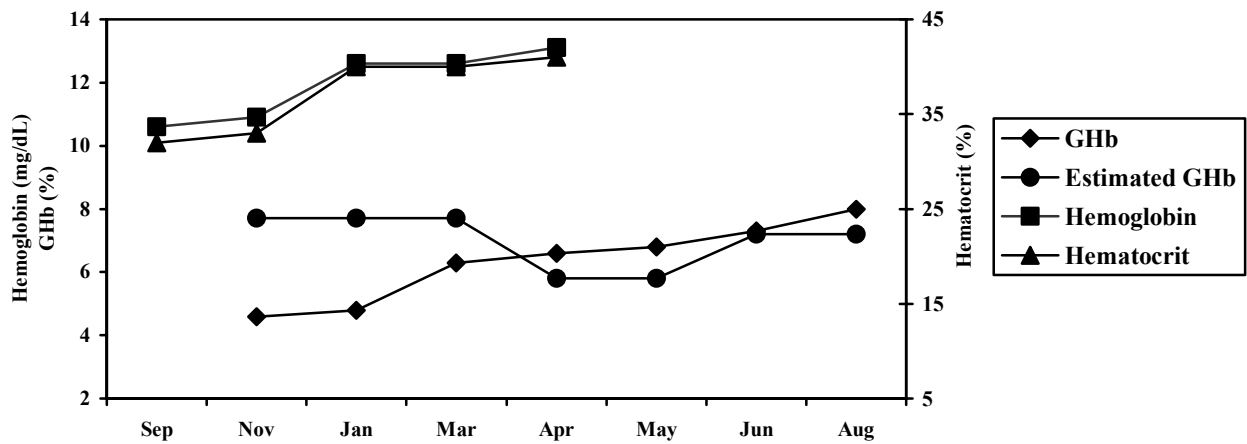


**Figure 1:** Flow diagram of research protocol used to identify conditions associated with very low GHb values.





**Figure 2:** Summary of conditions associated with very low GHb values in a group of diabetic patients in southern Brazil.



**Figure 3:** Glycohemoglobin (GHb), hemoglobin (Hb) and hematocrit (Ht) values in patient presenting very low GHb levels. The estimated value for GHb, calculated by mean plasma glucose in the period, is shown for three-month intervals. After the correction of anemia, GHb levels increased reaching the estimated value.

## References

1. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2003;**26** (Suppl 1):S106-S108.
2. Miedema K. Electrospray mass spectrometry for measurement of glycohemoglobin [Editorial]. *Clin Chem* 1997;**43**:705-707.
3. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, *et al.* What is hemoglobin A<sub>1c</sub>? An analysis of glycosylated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 1998;**44**:1951-1958.
4. Schwartz JG. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Reviews* 1995;**3**:269-287.
5. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, *et al.* The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984;**310**:341-346.
6. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;**47**:153-163.
7. Salzano FM: Incidence, effects, and management of sickle cell disease in Brazil. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1985;**7**:240-244.
8. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, *et al.* Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 1993;**39**:1717-1723.
9. Roberts WL, McCraw M, Cook CB. Effects of sickle cell trait and hemoglobin C trait on determinations of HbA<sub>1c</sub> by an immunoassay method. *Diabetes Care* 1998;**21**:983-986.

10. Schnedl WJ, Krause R, Halwachs-Baumann G, *et al.* Evaluation of HbA<sub>1c</sub> determination methods in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care* 2000; **23**:339-344.
11. Schnedl WJ, Liebming A, Roller RE, *et al.* Hemoglobin variants and determination of glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>). *Diabetes Metab Res Rev* 2001;**17**:94-98.
12. Roberts WL, De BK, Brown D, *et al.* Effects of hemoglobin C and S traits on eight glycohemoglobin methods. *Clin Chem* 2002;**48**:383-385.
13. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). University of Missouri, <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp/factors.htm>. Assessed in July 2002.
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Censo Demográfico – Características Gerais da População e Instrução – Rio Grande do Sul. Rio de Janeiro, Ministério do Planejamento e Orçamento, n. 24, p 61, 1991.
15. Camargo JL, Felisberto M, Gross JL. Effect of temperature storage on glycohemoglobin measurements [Abstract]. *Diabetes* 2002;**51**(Suppl 2): A119.
16. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, *et al.* The National Glycohemoglobin Standardization Program: a five-year progress report. *Clin Chem* 2001;**47**:1985-1992.
17. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetics on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;**329**:977-986.

18. Nakanishi T, Miyazaki A, Shimizu A, *et al.* Assessment of the effect of hemoglobin variants on routine HbA<sub>1c</sub> measurements by electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2002;**323**:89-101.
19. Blakney GB, Higgins TN, Holmes DJ. Comparison of hemoglobin A<sub>1c</sub> results by two different methods on patients with structural hemoglobin variants. *Clin Biochem* 1998;**31**:619-626.
20. Lamb E, Dawnay A. Glycated haemoglobin measurement in uraemic patients. *Ann Clin Biochem* 1992;**29**:118-120.
21. Gram-Hansen P, Eriksen J, Mourits-Andersen T, *et al.* Glycosylated haemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) in iron- and vitamin B12 deficiency. *J Intern Med* 1990;**227**:133-136.
22. Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, *et al.* Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A<sub>1c</sub> in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int* 1999;**41**:357-362.
23. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, *et al.* Defining the relationship between plasma glucose and HbA<sub>1c</sub>. *Diabetes Care* 2002;**25**:275-278.

## Capítulo IV

### ***Effect of Aspirin, and Vitamin C and E on HbA<sub>1c</sub> Assays***

Artigo submetido ao *Diabetes Care*.

## **Effect of Aspirin and Vitamins C and E on HbA<sub>1c</sub> Assays**

Joíza L Camargo MSc <sup>1</sup>

Jonathas Stiff MD <sup>2</sup>

Jorge L Gross MD <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Clinical Pathology Department and <sup>2</sup> Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Porto Alegre, RS, Brazil

*Short Running Title:* Interference in glycohemoglobin assays

\*Corresponding author: Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcellos 2350, Prédio 12, 4<sup>o</sup> andar, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil, Fax Int +55 51 33325188, E-mail: [jorgegross@terra.com.br](mailto:jorgegross@terra.com.br); [jcamargo@hcpa.ufrgs.br](mailto:jcamargo@hcpa.ufrgs.br).

### **Sinopse**

A aspirina (ASA) e vitaminas C e E podem inibir a glicação não-enzimática *in vivo*. Estes compostos podem também interferir nos métodos para determinação de HbA<sub>1c</sub>, mascarando os resultados verdadeiros. Este estudo investigou o efeito de doses usuais de ASA, vitamina C e E nos níveis de HbA<sub>1c</sub>, medidos por três métodos diferentes, dois sistemas de HPLC e um imunoenensaio, em um grupo de voluntários não - diabéticos.

Um ensaio clínico randomizado e controlado foi realizado com 27 indivíduos não - diabéticos saudáveis. Os indivíduos foram alocados, aleatoriamente, em 4 grupos, para ingerir ASA 200 mg/dia, vitamina C 1 g/dia, vitamina E 400 mg/dia, ou para um grupo controle, pelo período de 4 meses. Amostras de sangue foram coletadas no início do estudo e a intervalos mensais para análise de HbA<sub>1c</sub>. Os níveis séricos de ASA, vitamina C e E foram medidos no início e no final do estudo.

Os valores de HbA<sub>1c</sub> no grupo controle e nos grupos que ingeriram vitamina C e E não apresentaram alteração durante o período estudado, independente do método utilizado para a medida de HbA<sub>1c</sub>. Os níveis de HbA<sub>1c</sub>, determinados pelo Hitachi L-9100, aumentaram significativamente (P=0,033) após 4 meses de tratamento com ASA. Este aumento foi de apenas 0,17% HbA<sub>1c</sub>. Os níveis séricos de vitamina C, E e ASA aumentaram em todos os pacientes durante o tratamento ativo.

O tratamento com vitaminas C ou E, em doses farmacológicas, não tem nenhum impacto nos níveis de HbA<sub>1c</sub> de indivíduos não – diabéticos, quando determinados pelos métodos empregados neste estudo. ASA induz um modesto (cl clinicamente não relevante) aumento nos níveis de HbA<sub>1c</sub>.



### **Abstract**

**OBJECTIVES** – Aspirin (ASA) and vitamins C and E may inhibit non-enzymatic glycation in vivo. These compounds may also interfere with HbA<sub>1c</sub> assays, masking true results. This study investigated the effect of usual doses of ASA, vitamin C and E on GHb levels measured by three different assays, two HPLCs and one immunoassay, in a group of non-diabetic volunteers.

**RESEARCH DESIGN AND METHODS** - A randomized clinical trial was performed with 27 healthy non-diabetic individuals. Subjects were allocated to take ASA 200 mg/day, vitamin C 1g/day, and vitamin E 400 mg/day, or to a control group, for a period of 4 months. Blood samples were collected at baseline and at monthly intervals for GHb analysis. GHb was measured with two ion-exchange HPLC and one immunoassay method. Serum levels of vitamin C and E were measured in the beginning and at the end of the study.

**RESULTS** – HbA<sub>1c</sub> levels of the control, vitamin C and E groups did not change throughout the study, independently of the method used for measurement. HbA<sub>1c</sub> measured by Hitachi L-9100 HPLC increased significantly ( $P = 0.033$ ) at 4 months after ASA intake, although this increase was of only 0.17%. The serum levels of vitamin C and E increased in all patients in the respective treatment groups during the active treatment.

**CONCLUSIONS** - Treatment with vitamins C and E in pharmacological doses does not have any impact on GHb measurements in non-diabetic patients with the three methods employed. ASA induces a modest, not clinically relevant, increase in GHb levels with one of the methods.

**Key words:** *glycemic control, interference, diabetes*

## ***Introduction***

After two landmark studies – the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) – glycohemoglobin (GHb) became the reference parameter to evaluate metabolic control in diabetic patients (1,2). The American Diabetes Association (ADA) recommends that GHb levels should be measured regularly in all diabetic patients and maintained below 7% (as measured by the DCCT reference method) to prevent and/or decrease the risk for chronic complications (3). Ideally, the assay method employed to measure GHb should be traceable to DCCT values and certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) (4). Furthermore, the correct interpretation of GHb results by physicians requires knowledge of factors that may possibly interfere with GHb test results, such as intake of aspirin (acetyl salicylic acid, ASA) and vitamins C and E (4,5).

ASA is indicated for all diabetic patients above the age of 30 years and without any contra-indications to decrease the risk of myocardial infarction (6). ASA promotes acetylation of lysine residues on the  $\beta$  and  $\alpha$  chains of GHb, altering the net protein charge. This acetylated product may comigrate with the A<sub>1c</sub> fraction in GHb assays that are based on charge separation, such as ion exchange chromatography (7). ASA also inhibits in vivo non-enzymatic protein glycation through a site competition mechanism (8). Both these effects could affect HbA<sub>1c</sub> results in opposite directions.

Although the use of vitamins C and E might have a protective role in the development of diabetic microvascular complications (9), the HOPE clinical trial did not observe any effect of these vitamins on cardiovascular outcomes and nephropathy (10). Vitamins C and E have been reported to decrease protein glycation in non-diabetic and diabetic subjects (11-13), although some reports do not confirm these findings (14-

15). In addition, cross-sectional studies have shown a negative association between antioxidant intake, vitamin C and/or E, and levels of GHb (16,17).

Very few studies so far have analyzed the possible interference of ASA, vitamin C and/or E in GHb assays, with contradictory results (7,11,14,18,19). Furthermore, some of these studies did not have a control group; they also employed outdated assays to measure HbA<sub>1c</sub> levels, and were performed in vitro.

Therefore the aim of this study was to investigate the effect ASA and of vitamins C and E on GHb levels, measured by three different assays, two ion-exchange HPLCs methods and an immunoassay method, in a group of non-diabetic volunteers.

## **Research Design and Methods**

### *Study Design*

This study followed a randomized control trial design. Subjects were randomized and allocated to take ASA (Aspirin tablets 100 mg, Bayer<sup>®</sup> SA) 200 mg/day, vitamin C (Cewin<sup>®</sup>, ascorbic acid tablets 500 mg, Sanofi Synthelabo Ltda) 1 g/day, vitamin E (Ephynal<sup>®</sup>, tocopherol acetate capsules 400 mg, Roche<sup>®</sup> Pharmaceutical Products) 400 mg/day or to be part of a control group. Blood samples were collected at baseline and at monthly intervals for GHb analysis, for a period of 120 days (N=5). The randomization process was performed according to a computer generated randomization list. The necessary sample size was calculated based on the standard deviation (SD) of the reference interval for GHb at our laboratory (0.35%). A minimum of 6 patients in each group was necessary to detect a 0.5% absolute change in HbA<sub>1c</sub> ( $\alpha = 0.05$  and  $\beta = 0.02$ ) in relation to baseline levels.

### *Subjects*

Potential participants were excluded if they had contra-indications for ASA use, if they had been regularly taking vitamins C, E and/or multivitamins, and if they presented abnormal hematological status, dyslipidemia or renal disease (serum creatinine > 133  $\mu\text{mol/L}$ ). Thirty-four non-diabetic volunteers (14 men, non-diabetic status confirmed by oral glucose tolerance test and WHO criteria) were enrolled.

During the study they were instructed to eat normally, refrain to use ASA, vitamin C, E and multivitamins, and to avoid excess alcohol intake (more than 10 drinks/week). A blood sample was obtained for basal biochemistry, GHb and hematological analysis. An

aliquot of serum was immediately separated and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , in a dark tube, for posterior analysis of ASA, vitamin C and vitamin E. All subjects included in the study were white, and all signed an informed consent form. The study was approved by the Research Ethics Committee at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### *Analytical Methods*

Glucose, total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, and creatinine were analyzed by Advia 1650 (Bayer<sup>®</sup> Diagnostic). Hematological analysis was performed using a Pentra 2000 Automated System (ABX<sup>®</sup> Diagnostic System). GHb levels were measured by HPLC Variant II (BioRad Laboratories, Hercules CA), HPLC L-9100 Glycated Hemoglobin Analyzer (Merck - Hitachi, Tokyo, Japan), and Tina Quant<sup>®</sup> Hemoglobin A<sub>1c</sub> II immunoassay (Roche Diagnostics, Mannheim), on a Cobas Mira<sup>®</sup> Analyzer. During the period of this study, the Hitachi L-9100 HPLC equipment at Hospital de Clínicas de Porto Alegre was regularly monitored by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), as part of a level I laboratory certification process (4). The analytical imprecision was monitored by means of whole-blood pools, with different A<sub>1c</sub> levels, prepared from fresh whole-blood samples. Serum vitamin C and E were measured by HPLC (20,21) and serum salicylate was determined by a colorimetric assay (22).

### *Statistical Analysis*

Data are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). ANOVA with Tukey correction or paired Student's t test were used to compare groups when appropriate, at a significance level of 0.05. Within-subject variation was calculated as the coefficient of

variation (CV) of HbA<sub>1c</sub> results for the same individual, measured by the same method, throughout the study.

## Results

Twenty-seven subjects completed the study. Six subjects interrupted the treatment before the end of the third month (2 in the vitamin E group; 3 in the vitamin C group; and 1 in the ASA group). Table 1 shows the baseline characteristics of all subjects enrolled in the study. There were no differences among the 4 groups concerning age, sex, and glucose and serum lipid levels at baseline.

In patients taking vitamin C or E, there was a significant increase in serum vitamin levels after 4 months in relation to baseline levels and to the control group. Serum vitamin C levels increased by 38.5 % [39.75  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 3.97$ ) vs. 55.07  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 11.07$ );  $P = 0.0374$ ]. Vitamin E levels increased by 80.0 % [16.51  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 8.38$ ) vs. 29.72  $\mu\text{mol/L}$  ( $\pm 9.1$ );  $P = 0.0327$ ]. There was no significant difference on serum levels of salicylate in the ASA group after 4 months of treatment.

For each method, baseline HbA<sub>1c</sub> levels were similar for all groups (Table 2). HbA<sub>1c</sub> levels obtained using the Tina Quant II immunoassay were significantly higher than those obtained using the Variant II HPLC system (ANOVA,  $P < 0.001$ ).

Inter-assay variation was 2.5%, 3.89% and 4.30% for Hitachi L-9100 HPLC, BioRad Variant II HPLC and Tina Quant<sup>®</sup> II immunoassay, respectively.

The HbA<sub>1c</sub> levels of the control, vitamin C and E groups did not change throughout the study, independently of the method used for measurement. A significant difference was observed in HbA<sub>1c</sub> levels after 4 months of ASA treatment with the Hitachi L- 9100 HPLC assay. Although significant ( $P = 0.033$ ), this difference was very small (0.17 %). The other assays did not reveal any significant changes in HbA<sub>1c</sub> results after ASA treatment.

Within-subject variation of HbA<sub>1c</sub> levels, measured by the same method, was small and similar for the different groups throughout the study (Table 3).

## **Conclusions**

This randomized clinical trial showed that treatment with vitamin C or E in pharmacological doses does not significantly influence HbA<sub>1c</sub> measurements in non-diabetic patients. Although 200 mg/day of ASA induced a modest increase in HbA<sub>1c</sub> levels measured by Hitachi L-9100 HPLC, this increase was not detected by either Variant II HPLC or Tina Quant II immunoassay. Neither the HPLC methods (Hitachi L-9100, Variant II) nor the Tina Quant II immunoassay were affected by any hemoglobin derivatives formed during the chronic ingestion of vitamin C and E.

Two of the methods employed in the present study are widely used: 22.5% of the laboratories participating in the College of American Pathologist GH2-A 2003 Survey (23) use the Variant II HPLC and the Tina Quant HbA<sub>1c</sub> II immunoassay for GHb analysis.

The results from previous studies are contradictory concerning the effect of vitamin C on HbA<sub>1c</sub> measurements. Vitamin C did not affect GHb determinations by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and immunoassay in a similar study (14), but was reported to greatly affect HbA<sub>1c</sub> levels when affinity and electrophoresis assays were used in another investigation (11). Poor equipment calibration and absence of control groups could explain these discrepancies.

Similarly, the effect of vitamin E on HbA<sub>1c</sub> assays is not well established. There are several clinical and observational studies reporting the effects of vitamin E levels, after supplementation or not, on protein glycation. They consistently show that there is an inverse association between HbA<sub>1c</sub> and vitamin E levels (12,13,17). However, some studies show that the effect of vitamin E was negligible on glycemic control assessed by HbA<sub>1c</sub> levels, but was protective for renal disease and lipid oxidation (9,15). These data



suggest that the protective effect of vitamin E may result from other mechanisms rather than glycation inhibition. The HbA<sub>1c</sub> methods used in these studies were affinity chromatography and ion-exchange HPLC. The HOPE clinical trial did not observed any effect of vitamin E on cardiovascular outcomes and nephropathy (10).

The effect of ASA on HbA<sub>1c</sub> results is also unclear (7, 18,19). Most of the data on this topic originated from in vitro experiments; the available in vivo studies were performed with subjects with rheumatoid arthritis in chronic use of much higher doses of ASA (> 1g/day), or with cardiology patients with normal blood glucose.

The analysis of within-subject variation, calculated as mean of individual SDs, for each treatment group and HbA<sub>1c</sub> method, revealed only a small variation in GHb results. However, the observed within-subject variation was slightly higher than that found for normal individuals without any treatment in a different study (24). The changes in HbA<sub>1c</sub> levels observed in all groups in the present study are probably of a biological nature, rather than the result of interference, and they were expected, considering the inter-assay imprecision of the methods used.

Laboratory staff must be aware of all pitfalls to avoid adding more confusion to the clinical interpretation of HbA<sub>1c</sub> values. Moreover, GHb assays may be affected by interference in different ways. One method may suffer a negligible effect where others may be significantly affected. The effect of interference may be more clinically relevant with poor metabolic control.

In conclusion, the treatment with vitamin C and E does not have any impact on HbA<sub>1c</sub> measurements in non-diabetic patients with the method evaluated. ASA may induce a modest, although not clinically relevant, increase in HbA<sub>1c</sub> levels.

### ***Acknowledgements***

We thank the Clinical Chemistry Unit staff at Clinical Pathology Department, HCPA, for the GHb determinations, and all volunteers that participated in the clinical trial. ASA tablets were a gift from Bayer<sup>®</sup> SA. This work was supported by a grant from Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Ministério de Ciência e Tecnologia (Pronex) and by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Research Incentive Fund (FIPE).

**Table 1:** Baseline characteristics of 27 non-diabetic volunteers

	<b>Controls</b>	<b>Vitamin C</b>	<b>Vitamin E</b>	<b>ASA</b>
n	6	7	7	7
Sex (F/M)	4/2	3/4	3/2	3/4
Age (years)	27 ± 7	30 ± 8	29 ± 8	30 ± 12
Fasting glucose (mmol/L)	4.70 ± 0.51	4.40 ± 0.65	4.97 ± 0.72	4.75 ± 0.40
Glucose 2h after load (mmol/L)	4.80 ± 0.87	5.30 ± 1.31	5.08 ± 1.27	5.00 ± 1.12
Total hemoglobin (g/L)	137 ± 14	138 ± 15	128 ± 11	148 ± 11
Total cholesterol (mmol/L)	4.55 ± 0.64	5.10 ± 0.79	4.71 ± 1.16	5.15 ± 0.55
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.56 ± 0.28	1.38 ± 0.33	1.48 ± 0.36	1.46 ± 0.15
Triglycerides (mmol/L)	0.88 ± 0.43	1.53 ± 0.97	0.75 ± 0.24	0.97 ± 0.56
Serum vitamin C (μ mol/L)	45.42 ± 11.8	39.75 ± 3.97	-	-
Serum vitamin E (μ mol/L)	16.42 ± 11.4	-	16.51 ± 8.38	-

**Table 2:** HbA<sub>1c</sub> levels in non-diabetic volunteers before, during and after vitamin C, vitamin E and aspirin (ASA) treatment for 4 months.

		<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>				
		<b>Baseline</b>	<b>30 days</b>	<b>60 days</b>	<b>90 days</b>	<b>120 days</b>
<b>Controls</b>	<b>HPLC 1</b>	4.63 (± 0.24)	4.70 (± 0.46)	4.87 (± 0.20)	4.80 (± 0.24)	4.67 (± 0.30)
	<b>HPLC 2</b>	4.70 (± 0.24)	4.62 (± 0.24)	4.70 (± 0.27)	4.70 (± 0.29)	4.68 (± 0.23)
	<b>IA</b>	5.20 (± 0.39)	5.18 (± 0.29)	5.15 (± 0.21)	5.14 (± 0.17)	5.07 (± 0.23)
<b>Vitamin C</b>	<b>HPLC 1</b>	4.73 (± 0.44)	4.57 (± 0.26)	4.78 (± 0.26)	4.83 (± 0.28)	4.91 (± 0.29)
	<b>HPLC 2</b>	4.87 (± 0.17)	4.80 (± 0.25)	4.77 (± 0.25)	4.78 (± 0.25)	4.87 (± 0.24)
	<b>IA</b>	5.29 (± 0.26)	5.27 (± 0.29)	5.10 (± 0.16)	5.17 (± 0.34)	5.19 (± 0.41)
<b>Vitamin E</b>	<b>HPLC 1</b>	4.61 (± 0.20)	4.74 (± 0.21)	4.96 (± 0.27)	4.90 (± 0.25)	4.73 (± 0.34)
	<b>HPLC 2</b>	4.94 (± 0.14)	4.92 (± 0.23)	5.01 (± 0.27)	5.04 (± 0.33)	5.06 (± 0.25)
	<b>IA</b>	5.44 (± 0.44)	5.53 (± 0.47)	5.44 (± 0.67)	5.35 (± 0.29)	5.48 (± 0.54)
<b>ASA</b>	<b>HPLC 1</b>	4.57 (± 0.17)	4.60 (± 0.17)	4.80 (± 0.39)	4.65 (± 0.23)	4.74 (± 0.21)
	<b>HPLC 2*</b>	4.84 (± 0.24)	4.74 (± 0.17)	4.77 (± 0.14)	4.93 (± 0.06)	4.94 (± 0.10)
	<b>IA</b>	5.14 (± 0.30)	5.10 (± 0.30)	5.13 (± 0.32)	5.13 (± 0.32)	5.33 (± 0.40)

\*p = 0.033 for 30 vs. 120 days. HPLC 1 - Variant II BioRad; HPLC 2 - Hitachi L9100; IA - immunoassay

Tina Quant II. Results are expressed as mean (± SD).

**Table 3:** Within-subject variation, calculated as mean of individual SDs, in HbA<sub>1c</sub> levels in non-diabetic individuals during treatment with vitamins C and E and aspirin (ASA).

	<b>HbA<sub>1c</sub> SD (%CV)</b>		
	<b>HPLC 1</b>	<b>HPLC 2</b>	<b>IA</b>
<b>Controls</b>	0.07 (1.5)	0.20 (4.2)	0.16 (3.1)
<b>Vitamin C</b>	0.18 (3.7)	0.25 (5.3)	0.12 (2.3)
<b>Vitamin E</b>	0.18 (3.6)	0.20 (4.2)	0.15 (2.7)
<b>ASA</b>	0.13 (2.7)	0.24 (5.1)	0.16 (3.1)

HPLC 1 - Variant II BioRad; HPLC 2 - Hitachi L9100; IA - immunoassay Tina Quant II.

## References

- 1) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977-86, 1993
- 2) U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*;352:837-51, 1998
- 3) American Diabetes Association: Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 26 (Suppl 1):S106-S108, 2003
- 4) Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM and Parrot M: Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 48:436-472, 2002
- 5) National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). University of Missouri, <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp/factors.htm>. Accessed July 2002.
- 6) American Diabetes Association: Aspirin therapy in diabetes. *Diabetes Care* 26 (Suppl 1):S87-S88, 2003
- 7) Nathan D, Francis T, Palmer J: Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 29:466-69, 1983
- 8) Caballero F, Gerez E, Batlle A, Vazquez E: Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. *Chem Biol Interact* 126:215-25, 2000

- 9) Gaede P, Poulsen HE, Parving HH, Pedersen O: Double-blind, randomized study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabetic Med* 18:756-60, 2001.
- 10) The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators: Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes. *Diabetes Care* 25:1919-1927, 2002.
- 11) Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS: Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes* 41:167-173, 1992.
- 12) Paolisso G, D'Amore A, Galzerano, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, D'Onofrio F: Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. *Diabetes Care* 16:11:1433-37, 1993
- 13) Jain SK, McVie R, Jaramilo JJ, Palmer M, Smith T: Effect of modest vitamin E supplementation on blood glycated hemoglobin and triglyceride levels and red cell indices in type I diabetic patients. *J Am Coll Nutr* 15:458-61, 1996
- 14) Weykamp CW, Penders TJ, Baadenhuijsen H, Muskiet FAJ, Martina W, van der Slik W: Vitamin C and glycohemoglobin. *Clin Chem* 41:713-16, 1995
- 15) Fuller CJ, Chandalia M, Garg A, Grundy SM, Jialal I: RRR- $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation at pharmacological doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 63:753-59, 1996
- 16) Sargeant LA, Wareham NJ, Bingham S, Day NE, Luben RN, Oakes S, Welch A, Khaw K: Vitamin C and hyperglycemia in the European Prospective Investigation into Cancer - Norfolk (EPIC - Norfolk) Study. *Diabetes Care* 23:726-32, 2000

- 17) Boeing H, Weisgerber UM, Jeckel A, Rose HJ, Kroke A: Association between glycated hemoglobin and diet and other lifestyle factors in a nondiabetic population: cross-sectional evaluation of data from the Postdam cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am J Clin Nutr* 71:1115-22, 2000
- 18) Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W: Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem* 39:138-42, 1998
- 19) Koskinen LK, Korpela MM, Lahtela JT, Laippala PJ, Pikkarainen PH, Koivula TA: Effect of acetaldehyde and acetylsalicylic acid on HbA<sub>1c</sub> chromatography in the FLPC method with Mono S cation exchanger. *Clin Chim Acta* 275:53-61, 1998
- 20) Speek AJ, Schrijver J, Schreurs WHP: Fluorometric determination of total vitamin C in whole blood by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization. *J Chromatogr* 46:54-60, 1984
- 21) Lee BL, Chua SC, Ong HY, Ong CN: High Performance Liquid chromatography method for routine determination of vitamin A and E and beta-carotene in plasma. *J Chromatogr* 581:41-47, 1992
- 22) Trinder P: Rapid determination of salicylate in biological materials. *Biochem J* 57:301-303, 1954
- 23) College of American Pathologists. Glycohemoglobin survey 2003, set GH2-A. Northfield, IL: College of American Pathologist.
- 24) Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, Grotz VL, Tennil A, England J, Madsen R, Goldstein D: Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem* 48:116-118, 2002



### **Considerações Finais**

Os níveis glicêmicos são um fator determinante do desenvolvimento e progressão das complicações do DM. A glico-hemoglobina, fração HbA<sub>1c</sub>, é o parâmetro de escolha para avaliar o controle glicêmico de pacientes diabéticos. Em geral, os ensaios clínicos que avaliaram o papel do controle glicêmico no desenvolvimento das complicações diabéticas crônicas demonstraram que a cada decréscimo absoluto de 1% em HbA<sub>1c</sub>, há uma redução de 30 a 35% no risco de complicações microvasculares do DM.

A dosagem laboratorial da HbA<sub>1c</sub> é afetada por várias interferências, as quais são método - dependentes. Uma interferência pode ocorrer em uma magnitude clinicamente significativa em um método e ser mínima em outro.

Este trabalho demonstrou que a fração lábil de GHb pode contribuir de maneira significativa com o resultado final de HbA<sub>1c</sub>. Dependendo do método que está sendo utilizado, esta fração pode não ser separada adequadamente e superestimar os valores de HbA<sub>1c</sub>. Nestes casos, há a necessidade de um pré - tratamento na amostra para a eliminação desta fração antes da análise.

O armazenamento das amostras é um fator importante a ser observado. Amostras que não podem ser imediatamente analisadas podem ser mantidas sob refrigeração por 10 dias. Quando necessário, o armazenamento a longo prazo deve ser feito a – 80 °C. Amostras congeladas a –20 °C apresentam uma diminuição significativa nos valores de HbA<sub>1c</sub> já nas primeiras 24h de armazenamento.

Juntamente com as variáveis analíticas, alguns estados patológicos podem afetar as dosagens de GHb. Neste estudo, demonstramos que a presença de Hb anômalas pode

falsamente baixar os valores de GHb e está associada com os valores muito baixos de HbA<sub>1c</sub>. Adicionalmente, também demonstramos que a anemia também é uma importante fonte de interferência negativa nos resultados. Sugerimos que, para a correta interpretação dos valores de GHb, o estado hematológico do paciente seja sempre considerado. O clínico deve conhecer os estados patológicos que podem afetar os valores de HbA<sub>1c</sub> na população atendida.

Outro ponto importante na dosagem de GHb é o efeito de drogas. Neste estudo relatamos a inexistência de efeito significativo do uso crônico de aspirina, vitamina C e vitamina E nos níveis de HbA<sub>1c</sub>, medidos por 3 métodos rotineiramente utilizados pelos laboratórios clínicos, em indivíduos não - diabéticos.

O laboratório exerce um importante papel na prevenção das complicações do DM, e deve ter um rígido controle das variáveis pré, trans e pós – analíticas da dosagem de HbA<sub>1c</sub> para garantir a exatidão e reprodutibilidade dos resultados.

Os resultados de HbA<sub>1c</sub> discordantes com a história clínica do paciente devem ser sempre investigados.

**Universidade Federal do Rio Grande Do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós - Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia**

**Doutorado**

**Determinação da Glico-hemoglobina: Relação  
com a glicemia e aspectos analíticos**

**Joíza Lins Camargo**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Gross**

**Tese apresentada ao PPG em Ciências**

**Médicas: Endocrinologia para a**

**obtenção do título de doutor**

**Porto Alegre, Setembro de 2003.**

**C172d Camargo, Joíza Lins**

Determinação da glico-hemoglobina : relação com a glicemia e aspectos analíticos / Joíza Lins Camargo ; orient. Jorge Luiz Gross. – 2003.  
132 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia. Porto Alegre, BR-RS, 2003.

1. Diabetes mellitus 2. Hemoglobina A glicosilada 3. Glicemia 4. Índice glicêmico I. Gross, Jorge Luiz II. Título.

NLM: WK 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA