



INSTITUTO POLITÉCNICO  
DE VIANA DO CASTELO

Isaltina Maria França da Silva

IMPLEMENTAÇÃO DE UM MÉTODO PARA O  
DIAGNÓSTICO E CONTROLO DA DIABETES *MELLITUS*

Mestrado em Gestão da Qualidade em Laboratórios

Trabalho efectuado sob a orientação do  
Orientador Professora Doutora Joana Santos  
Co-orientadores Dra. Maria Adelina Gomes  
Professor Doutor Paulo Fernandes  
Professor Mestre Mário Barros

Janeiro de 2012

*Success or “Quality is never an accident; it is always the result of high intention, sincere effort, intelligent direction and skillful execution; it represents the wise choice of many alternatives.”*

*John Ruskin (1819 – 1900)*

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de várias pessoas às quais não posso deixar de manifestar o meu sincero e profundo agradecimento.

À minha orientadora, Prof. Doutora Joana Santos, pela motivação, orientação e por ter proporcionado sempre os meios necessários à realização deste trabalho.

À minha co-orientadora, Doutora Adelina Gomes, pelas sugestões e pelo material de apoio fornecido.

Ao Prof. Doutor Mário Barros, pela constante disponibilidade, orientação, pelo rigor estatístico no tratamento dos dados e pelos conhecimentos transmitidos.

À Doutora Anabela Silva, pela sugestão inicial do tema e a troca de impressões ao longo deste trabalho.

À Roche Diagnostics<sup>®</sup>, em especial ao Paulo Silva e à Sandra Novais pelo fornecimento de reagentes e informação disponibilizada, tornando este trabalho possível.

Ao Doutor Fernando Fonseca, director do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Póvoa de Varzim - Vila do Conde, onde foram efectuadas todas as determinações analíticas deste estudo.

Às minhas colegas de trabalho pela paciência e disponibilidade de me ajudar quando precisei.

Às minhas amigas Lila e Sílvia pela motivação que me transmitiram ao longo do trabalho.

A todos que, directamente, ou indirectamente me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito Obrigado a Todos!**

## RESUMO

A Hemoglobina A1c (HbA1c) é um parâmetro laboratorial amplamente usado na monitorização da diabetes *mellitus* e, agora com a nova recomendação da *American Diabetes Association* (ADA), no diagnóstico. Os métodos utilizados na sua determinação devem ser certificados pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), rastreáveis ao *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) e calibrados de acordo com a padronização da *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC). No entanto, é necessário que os profissionais do laboratório sejam capazes de garantir que o método utilizado possui precisão e exactidão, com a qualidade necessária para fornecer resultados de forma a satisfazer as necessidades clínicas. Tendo em conta os requisitos exigidos na norma NP EN ISO 15189 para acreditação dos laboratórios clínicos, torna-se ainda necessário, através da validação do método, avaliar as características analíticas para verificar que os parâmetros de qualidade exigidos para essas características são atingidos. O objectivo deste trabalho, prévio à implementação de um método de imunoensaio na rotina laboratorial, consistiu na avaliação do desempenho do método de imunoensaio em comparação com o método de HPLC, já existente no laboratório. A avaliação do método baseou-se nos critérios exigidos pelo *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA), para métodos de complexidade moderada, e aplicação dos resultados obtidos à ferramenta 6-sigma, para os critérios de qualidade estabelecidos pelo *College of American Pathologists* (CAP), NGSP e uso clínico esperado para 2011. Concluiu-se que o método de imunoensaio satisfaz o requisito de qualidade para certificação pelo NGSP, mas apresenta um desempenho inaceitável em relação ao critério estabelecido pelo CAP e clínico, não sendo viável a sua implementação na rotina laboratorial.

**Janeiro de 2012**

## **ABSTRACT**

The hemoglobin A1c (HbA1c) is a laboratory parameter widely used in monitoring of diabetes mellitus and, with the new American Diabetes Association (ADA) recommendation, in the diagnosis. The methods used in this assay must be certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), traceable to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) and calibrated according to the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) standardization. However, it is necessary that laboratory staff is able to ensure that the method has precision and accuracy to deliver results to meet clinical standards. Taking into account the requirements demanded in the standard NP EN ISO 15189 for accreditation of clinical laboratories, it is also necessary, through method validation, evaluate the analytical characteristics to verify that the quality parameters required for these characteristics are achieved. The aim of this work, prior to the implementation of an immunoassay method in the laboratory routine, was to assess the performance of the method compared with HPLC method, existing in the laboratory. The method evaluation was based on Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) settings, to moderate complexity methods, and the obtained results application with the 6-sigma tools for quality criteria established by the College of American Pathologists (CAP), NGSP and clinical use expected for 2011. It is concluded that the immunoassay method meets the quality requirement for certification by NGSP, but shows an unacceptable performance in relation to criteria established by the CAP and clinical, not being feasible its implementation for routine monitoring.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS .....	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	vi
ACRÓNIMOS .....	vii
SÍMBOLOS.....	x
<b>Capítulo I – Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Importância da Determinação da HbA1c para o Diagnóstico e Monitorização da Diabetes <i>Mellitus</i> .....	4
1.2 Características da HbA1c e Principais Métodos na sua Determinação .....	7
1.2.1 Biossíntese da Molécula HbA1c .....	7
1.2.2 Método para determinação da HbA1c .....	9
1.2.2.1 Cromatografia de Troca Iónica .....	9
1.2.2.2 Cromatografia de Afinidade .....	10
1.2.2.3 Imunoensaio .....	11
1.2.2.4 Método Enzimático .....	12
1.2.3 Factores que Interferem na Determinação da HbA1c.....	13
1.3 A Padronização da HbA1c .....	15
1.4 Qualidade nos resultados da HbA1c.....	20
1.5 Acreditação dos Métodos de Acordo com a NP EN ISO 15189.....	24
1.5.1 Determinação da Incerteza .....	26
1.5.2 Rastreabilidade .....	28
1.6 Validação do Método .....	29
1.6.1 Estabelecer o Processo de Validação .....	32
1.6.2 Selecção do Método para Validação .....	34
1.6.3 Validação do Desempenho do Método .....	35
1.6.3.1 Linearidade e Gama de Trabalho .....	37
1.6.3.2 Precisão.....	37
1.6.3.3 Exactidão.....	38

1.6.3.3.1 Veracidade, Tendência ou Bias.....	39
1.6.3.4 Especificidade e Selectividade Analítica.....	39
1.6.3.5 Sensibilidade Analítica.....	39
1.6.3.6 Limite de detecção e Limite de Quantificação .....	39
1.6.3.7 Intervalo de Referência para Valores Normais .....	40
1.6.4 Erro Total .....	40
1.6.5 Aceitabilidade do Método utilizando a Ferramenta 6-Sigma.....	43
1.7 Objectivos .....	44
<b>Capítulo II - Procedimento Experimental.....</b>	<b>45</b>
2. Material e Métodos.....	45
2.1 Método de HPLC.....	45
2.1.1 Equipamento.....	46
2.1.2 Reagentes .....	46
2.1.3 Calibradores e controlos .....	46
2.2 Método de Imunoensaio.....	47
2.2.1 Equipamento.....	48
2.2.2 Reagentes .....	48
2.2.3 Calibrador e Controlos .....	48
2.2.4 Interferências .....	49
2.3 Amostras .....	49
2.4 Metodologia para a Validação do Método.....	49
2.4.1 Determinação da Linearidade e Gama de Trabalho .....	50
2.4.2 Determinação da Precisão.....	51
2.4.3 Determinação da Exactidão .....	52
2.4.4 Avaliação do Desempenho do Método .....	52
2.5 Análise Estatística dos Dados.....	53
2.5.1 Determinação da linearidade .....	53
2.5.2 Determinação da Precisão.....	54
2.5.3 Determinação da Exactidão .....	58

<b>Capítulo III - Apresentação e Discussão dos Resultados</b> .....	62
3.1. Resultados do Estudo da Linearidade .....	62
3.1.1 Método HPLC .....	62
3.1.2. Método Imunoensaio .....	64
3.2 Resultados do Estudo da Precisão .....	68
3.2.1 Método HPLC .....	69
3.2.2 Método Imunoensaio .....	71
3.2.3 Comparação da Precisão dos Métodos .....	73
3.3 Resultados do Estudo da Exactidão .....	74
3.3.1. Teste <i>t</i> para amostras emparelhadas .....	76
3.3.2. Regressão Linear.....	77
3.4. Elaboração do gráfico de decisão para o requisito da qualidade CAP (ETa de 7%) e NGSP (ETa de 10%) .....	79
<b>Capítulo IV- Conclusão</b> .....	81
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Valores de HbA1c e o risco relativo de complicações microvasculares (DCCT). .....	3
Figura 2: Processo de glicação não enzimática das proteínas.....	8
Figura 3: Cromatografia de troca iónica. ....	9
Figura 4: Cromatografia de afinidade. ....	11
Figura 5: Imunoensaio.....	12
Figura 6: Processo da rede NGSP. ....	16
Figura 7: Cadeia de rastreabilidade do método.....	29
Figura 8: Ciclo PDCA. ....	30
Figura 9: Diferentes critérios de qualidade. ....	31
Figura 10: Etapas para a implementação de um método.....	33
Figura 11: Representação do erro total.....	41
Figura 12: Representação dos diferentes tipos de erro.....	42

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Dados e resultados obtidos no estudo da linearidade do método HPLC .....	62
Tabela 2: Resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste <i>F</i> do estudo de linearidade do método de HPLC. ....	63
Tabela 3: Dados e resultados obtidos no estudo da linearidade do método de imunoensaio. ....	64
Tabela 4: Resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste <i>F</i> do estudo de linearidade do método de imunoensaio. ....	65
Tabela 5: Novos resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste <i>F</i> , após eliminação de D5 do estudo de linearidade do método de imunoensaio. ....	66
Tabela 6: Dados e resultados obtidos no segundo estudo da linearidade do método de imunoensaio.....	67
Tabela 7: Resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste <i>F</i> no segundo estudo de linearidade do método de imunoensaio.....	68
Tabela 8: Dados obtidos no estudo da precisão do método de HPLC em % HbA1c. ....	69
Tabela 9: Resultados obtidos no estudo da precisão do método HPLC. ....	70
Tabela 10: Dados obtidos no estudo da precisão do método de imunoensaio. ...	71
Tabela 11: resultados obtidos no estudo da precisão do método de imunoensaio. ....	72
Tabela 12: Valores das amostras obtidos pelos dois métodos (%HbA1c). ....	75
Tabela 13: Resultado do teste <i>t</i> para amostras emparelhadas. ....	76
Tabela 14: Resultados da regressão linear no estudo da exactidão. ....	78

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gráfico de dispersão - valores esperados <i>versus</i> valores observados do estudo de linearidade do método de HPLC .....	63
Gráfico 2: Gráfico de dispersão - valores esperados <i>versus</i> valores observados do estudo de linearidade do método de imunoensaio. ....	65
Gráfico 3: Gráfico de dispersão - valores esperados <i>versus</i> valores observados no segundo estudo de linearidade do método de imunoensaio.....	67
Gráfico 4: Diferença entre os resultados do método imunoensaio e o método HPLC. ....	76
Gráfico 5: Comparação dos resultados do método teste <i>versus</i> os resultados método comparativo. ....	77
Gráfico 6: Carta de decisão do método para o critério de qualidade do CAP .....	79
Gráfico 7: Carta de decisão do método para o critério de qualidade do NGSP ...	80

## ACRÓNIMOS

AACC - *American Association for Clinical Chemistry*

ADA - *American Diabetes Association*

AGEs - Produtos Finais da Glicação Avançada

AGJ - Anomalia da Glicemia de Jejum

Anti-GAD – *Glutamic acid decarboxylase*

CAP - *College of American Pathologists*

C.f.a.s - *Calibrator for automated systems*

CLIA - *Clinical Laboratory Improvement Amendments*

CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CPRL - Laboratório Central de Referência Primário

CQ – Controlo da qualidade

CQE - Controlo da qualidade externo

CQI - Controlo da qualidade interno

CV - Coeficiente de variação

CVa - Coeficiente de variação analítico

CVi - Coeficiente de variação intra - individual

CVg - Coeficiente de variação inter - individual

DCCT - *Diabetes Control and Complications Trial*

DP- Desvio padrão

DPM - Defeitos por milhão

Ea - Erro aleatório

Es - Erro sistemático

ET- Erro total

ETa - Erro total admissível

FDA - *Food and Drug Administration*

FID - Federação Internacional da Diabetes

Glyco I - *Glyco control level I*

Glyco II - *Glyco control level II*

GUM - *Guide to the Expression of Uncertainty of Measurement*

HBCN – *HbA1c control N*

HBCP – *HbA1c control P*

Hgb - Molécula de Hemoglobina

HbA1c - Hemoglobina A1c

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IADSPG - *International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups*

IFCC - *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

NGSP - *National Glycohemoglobin Standardization Program*

OMS - Organização Mundial Saúde

PDCA - Plan-do-Check

PIB - Produto Interno Bruto

PNAEQ - Programa Nacional da Avaliação Externa da Qualidade

PRLs - Laboratórios de Referência Primários

PTGO - Prova de tolerância à glicose oral

RCV - Valor de Referência da Alteração

SI - Sistema Internacional

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SRLs - Laboratórios de Referência Secundários

TDG -Tolerância Diminuída à Glicose

UKPDS - *United Kingdom Prospective Diabetes Study*

# VIM - Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia

## SÍMBOLOS

$B_c$  - *bias* crítico

$\bar{d}$  - média das diferenças

$DP_{wr}$  - desvio padrão intra-ensaio

$DP^2_{wr}$  - estimativa da variância intra-ensaio

$DP_{md}$  - desvio padrão da média diária

$DP^2_{md}$  - estimativa da variância diária

$DP_T$  - desvio padrão total

$Ds^2$  - diferença das variâncias

*g.l.* - graus de liberdade

*i* – número de amostras

*l* - número total de dias

$m_0$  - ordenada na origem

$m_1$  - declive

$m_2$  - declive do polinómio de segundo grau

*N* - número de duplicados por corrida

*r* - coeficiente de correlação

$S_d$  - desvio padrão das diferenças

$s_{m0}$  - desvio-padrão da ordenada na origem

$s_{m1}$  - desvio-padrão do declive do polinómio de primeiro grau

$s_{m2}$  - desvio-padrão do polinómio de segundo grau

$s_{x/y}$  - desvio-padrão residual do polinómio de primeiro grau

$s_{y2}$  - desvio-padrão residual do polinómio de segundo grau

*x* - valor da concentração do polinómio de primeiro grau

$x^2$  - valor da concentração do polinómio de segundo grau

$xi_1$  - primeiro resultado no dia *i*

$xi_2$  - segundo resultado no dia *i*

$\bar{x}_i$  - média dos resultados do dia *i*

$\bar{x} \dots$  - média de todos os resultados ao longo dos dias

$X_c$  - nível crítico de decisão médica

*y* - valor da concentração dada pelo equipamento

## Capítulo I – Introdução

O termo diabetes *mellitus* descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por uma hiperglicemia crônica, com distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas, resultantes de deficiências na secreção e/ ou acção da insulina (OMS, 1999).

Neste âmbito, existem quatro tipos de diabetes de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1999):

- Diabetes *mellitus* insulino-dependente ou tipo I é caracterizada pela presença de anticorpos *Glutamic acid decarboxylase* (anti-GAD), anticorpos contra as células dos ilhéus ou contra insulina e que identificam o processo auto-imune, que conduz à destruição das células  $\beta$  pelo que se denomina por diabetes tipo I auto-imune. Em alguns casos não é possível demonstrar a existência do processo imunológico, passando a ser denominada por diabetes tipo I idiopática. A diabetes tipo I corresponde a 5-10% de todos os casos de diabetes e é, em regra mais comum na infância e adolescência;
- Diabetes não insulino - dependente ou tipo II é a forma mais comum e é caracterizada por distúrbios na acção e secreção da insulina, podendo qualquer uma delas ser predominante. Corresponde a 90% de todos os casos de diabetes e está muitas vezes associada a obesidade principalmente abdominal, a hipertensão arterial e dislipidemia. É clinicamente silenciosa e, na maioria dos casos, é diagnosticada por exames de rotina;
- Diabetes gestacional refere-se à intolerância aos hidratos de carbono, que resulta em hiperglicemia de gravidade variável e tem início ou é reconhecida durante a gravidez;

- Outros tipos específicos de diabetes correspondem a situações em que a diabetes é consequência de um processo etiopatogénico, identificado como: defeitos genéticos das células  $\beta$ , defeitos genéticos na acção da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias diversas, diabetes induzida por químicos ou fármacos.

É uma doença que tem graves complicações a nível cardiovascular e renal podendo levar a amputações dos membros ou à cegueira e é a quarta causa de morte na maior parte dos países desenvolvidos. Segundo a Federação Internacional da Diabetes (FID), existiam em 2007 cerca de 246 milhões de pessoas com diabetes, prevendo cerca de 380 milhões para 2025 ([www.idf.org](http://www.idf.org), 2011).

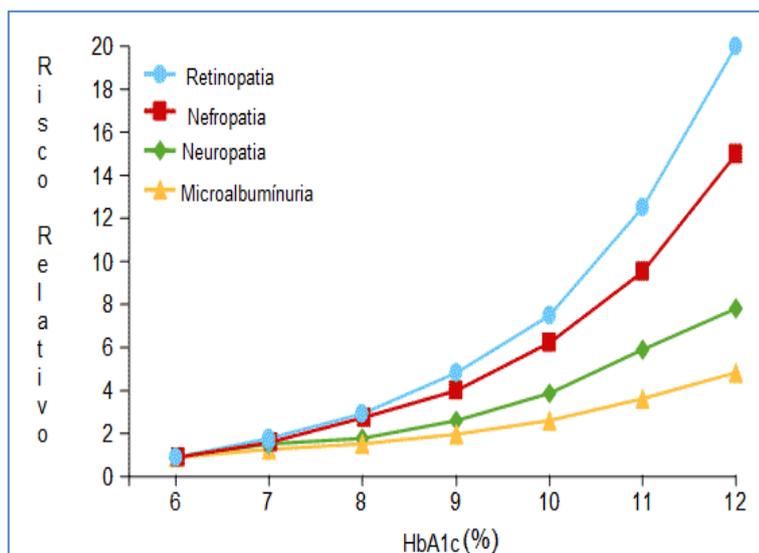
De acordo com os dados apresentados no relatório de 2010 do Observatório Nacional da Diabetes, em Portugal existem 983 mil indivíduos com diabetes, dos quais 44% não estão diagnosticados, sendo a taxa de prevalência de 12,3%. Em 2009 foram detectados 571 novos casos de diabetes por cada 100000 habitantes. O custo total da diabetes em 2009 é de 1500 milhões de euros, o que representa 0,9% do Produto Interno Bruto (PIB) português e 9% da Despesa em Saúde no mesmo ano.

Os números são preocupantes e alertam para a enorme importância da prevenção e diagnóstico precoce da diabetes, do controlo rigoroso da doença e da educação terapêutica, como forma de redução do impacto das complicações nas pessoas com diabetes, levando a uma melhoria da qualidade de vida, mantendo a sustentabilidade do Serviço Nacional de Saúde (SNS) (Pina CB, 2010).

O diagnóstico precoce da doença é essencial, visto que evidências epidemiológicas revelam que a diabetes tipo II e as complicações associadas à doença aparecem cerca de 4 a 7 anos antes do diagnóstico clínico (Sacks DB *et al*, 2011). Durante décadas, o diagnóstico da diabetes *mellitus* assentou exclusivamente em valores de glicemia em jejum, ao acaso ou após a prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 100 gramas e posteriormente 75 gramas de glicose.

A partir de 2010, a *American Diabetes Association* (ADA) recomenda a determinação da Hemoglobina A1c (HbA1c) para o diagnóstico da diabetes. Neste mesmo ano, foram estabelecidos novos critérios de diagnóstico da diabetes gestacional, pela *Internacional Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups* (IADSPG) (Saraiva J. *et al.*, 2010).

A HbA1c é amplamente usada na monitorização dos doentes diabéticos, porque, reflecte os níveis de glicose plasmática dos últimos 2 a 3 meses e estudos importantes realizados pelo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (Fig.1), em 1993, e pelo *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), em 1998, demonstraram a relação entre o controlo da glicemia e as complicações dos diabéticos, baseando-se na determinação da HbA1c (Henriches, 2009).



**Figura 1: Valores de HbA1c e o risco relativo de complicações microvasculares (DCCT).**

(Adaptado de Neto *et al.*, 2009)

A HbA1c passa a ser uma ferramenta imprescindível no diagnóstico e monitorização da diabetes *mellitus*, de forma a prevenir complicações crónicas da doença e prolongar a qualidade de vida dos doentes.

## **1.1 Importância da Determinação da HbA1c para o Diagnóstico e Monitorização da Diabetes *Mellitus***

A determinação da HbA1c apresenta várias vantagens em relação à glicemia em jejum: melhor índice de exposição glicémica; correlação semelhante em relação ao risco de complicações crónicas; menor variabilidade biológica; menor instabilidade pré-analítica; padronização semelhante ou superior; útil na monitorização crónica da eficácia do tratamento; maior conveniência dado que não é necessário jejum.

No entanto, também apresenta desvantagens, como: custo superior; menor disponibilidade em algumas partes do mundo; correlação incompleta, em alguns indivíduos, entre a HbA1c e a glicemia média (Saraiva J. *et al.*, 2010).

Assim, a HbA1c passou a ser cada vez mais utilizada pela comunidade médica na monitorização e, agora com a nova recomendação da ADA, no diagnóstico da doença, o valor da HbA1c estabelecido para o diagnóstico é superior ou igual a 6,5% baseado na relação com a prevalência de retinopatia, tal como os valores estabelecidos para a glicemia em jejum e PTGO (ADA, 2010).

Perante esta nova recomendação, a Direcção Geral de Saúde emitiu a Circular Normativa 002/2011, a 14/01/2011, em que define os critérios para o diagnóstico da diabetes com base nos seguintes parâmetros e valores:

- Glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dl (ou  $\geq 7,0$  mmol/l); ou
- Sintomas clássicos + glicemia ocasional  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l); ou
- Glicemia  $\geq 200$  mg/dl (ou  $\geq 11,1$  mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose; ou
- HbA1c  $\geq 6,5\%$ .

Refere ainda que é aconselhável usar um só parâmetro para o diagnóstico da diabetes. Mas, se houver a determinação simultânea da glicemia em jejum e da HbA1c e se ambas forem valores de diagnóstico, este fica confirmado, mas, se um valor for discordante, o parâmetro anormal deve ser repetido, passadas duas semanas.

Esta circular também define os parâmetros para o diagnóstico da hiperglicemia intermédia ou identificação de categorias de risco aumentado para a diabetes, com base nos seguintes valores:

- Anomalia da Glicemia de Jejum (AGJ): glicemia de jejum  $\geq 110$  e  $<126$  mg/dl (ou  $\geq 6,1$  e  $<7,0$  mmol/l);
- Tolerância Diminuída à Glicose (TDG): glicemia às 2 horas na PTGO  $\geq 140$  e  $<200$  mg/dl (ou  $\geq 7,8$  e  $<11,1$  mmol/l).

A hiperglicemia intermédia é um estado em que os indivíduos apresentam níveis de glicose no sangue superiores ao normal, mas não são suficientemente elevados para serem classificados como diabetes (Sociedade Portuguesa de Diabetologia, 2011).

Para esta condição, a ADA define o intervalo de HbA1c de 5,7-6,4% como categoria de risco aumentado para desenvolver diabetes. Os indivíduos que apresentarem valores dentro deste intervalo devem ser informados do risco aumentado de virem a desenvolver diabetes e doença cardiovascular, e aconselhados acerca de estratégias de prevenção efectivas (ADA, 2010).

O diagnóstico da diabetes gestacional, segundo a Circular Normativa 007/2011 envolve duas fases distintas: a determinação da glicemia em jejum após a primeira consulta de vigilância pré-natal, e a realização da PTGO entre as 24 e 28 semanas de gestação. O diagnóstico é feito com base nos seguintes valores de glicemia plasmática em jejum:

- $<92$  mg/dl (5.1 mmol/l) – valor normal, mas implica a realização, entre as 24-28 semanas de gestação, de PTGO com sobrecarga de 75g de glicose;
- $\geq 92$  mg/dl (5.1 mmol/l)  $<126$  mg/dl (7mmol/l) – diagnóstico de diabetes gestacional não sendo necessário a realização da PTGO;
- $\geq 126$  mg/dl (7 mmol/l), ou  $>200$  mg/dl (11.1 mmol/l) no doseamento da glicose ocasional, ou HbA1c  $\geq 6.5\%$  - indica a existência de uma diabetes provavelmente anterior à gravidez.

A mesma circular refere que a determinação da HbA1c não deverá ser incluída entre os exames que se realizam na vigilância da gravidez de baixo risco. Mas caso exista um valor de HbA1c superior ou igual a 6,5%, deve ser interpretado como critério de diagnóstico de provável diabetes prévia.

Relativamente às mulheres diabéticas férteis em idade de concepção, devem ter um valor de HbA1c inferior a 6,5%, ou inferior a 7,0% se sob insulino-terapia, desencorajando activamente as mulheres com valores de HbA1c superior a 8% de engravidarem enquanto o valor não diminuir (Brito CP, 2010). É recomendado que, durante a gravidez, estas pacientes tenham um valor de HbA1c inferior a 6%. O controlo rigoroso dos valores de HbA1c durante a gravidez diminui o risco de malformações congénitas e complicações pós-parto (Sacks DB *et al.*, 2011).

Na monitorização dos doentes diabéticos, a ADA recomenda um valor alvo de HbA1c inferior a 7% para adultos não gestantes, e valores mais altos para crianças e adolescentes. As metas de HbA1c devem ser individualizadas de acordo com o benefício a longo prazo nas complicações tardias da doença, em relação ao risco aumentado de hipoglicemia devido a terapia intensiva. A ADA sugere ainda que a frequência na determinação da HbA1c deve depender da situação clínica, do regime de tratamento utilizado ou da decisão do médico. Na opinião de outros especialistas, a determinação da HbA1c deve ser realizada duas vezes por ano em pacientes com valores estáveis que cumprem a meta estabelecida para o tratamento, e trimestralmente em pacientes em que a terapia foi alterada, ou que não estão de acordo com o objectivo definido (Sacks DB *et al.*, 2011).

A interpretação adequada dos resultados da HbA1c exige que os prestadores dos cuidados de saúde compreendam a relação entre os valores de HbA1c e a concentração da glicose média no sangue, a cinética da HbA1c, as limitações do ensaio utilizado e os factores que podem interferir no seu doseamento (Goldstein DE *et al.*, 2004).

## 1.2 Características da HbA1c e Principais Métodos na sua Determinação

### 1.2.1 Biossíntese da Molécula HbA1c

A HbA1c é um componente menor da hemoglobina: esta é uma proteína constituída por um complexo de quatro cadeias polipeptídicas (globulinas), cada uma contendo um grupo heme que confere à molécula a sua cor. No centro da molécula heme existe um átomo de ferro II ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

Cerca de 96% da hemoglobina de um adulto normal é HbA, constituída por duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$ , 2,5% é HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2 \delta_2$ ) e 0,5% é HbF ( $\alpha_2 \gamma_2$ ). A síntese destas hemoglobinas é controlada geneticamente, em que as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  são codificadas por genes diferentes (Henriches, 2009).

Por sua vez, a HbA é constituída maioritariamente por HbA0 e só 6% é HbA1, sendo esta subdividida em 4 fracções: HbA1a1, HbA1a2, HbA1b e HbA1c. A HbA1c é formada nos glóbulos vermelhos por um processo de glicação, que envolve uma ligação não enzimática, irreversível da glicose com o aminoácido valina N-terminal da cadeia  $\beta$  da HbA (Bem AF, 2006).

As outras fracções da HbA1 originam-se através da ligação do aminoácido valina N-terminal da cadeia  $\beta$  com outros carboidratos: HbA1a1 (frutose 1,6 fosfato); HbA1a2 (frutose 6 fosfato); HbA1b (ácido pirúvico) (Bem AF, 2006).

No entanto, a molécula de hemoglobina pode sofrer uma mutação de um dos aminoácidos da cadeia  $\beta$  e formar as chamadas hemoglobinas variantes. As mais frequentes são a HbS, HbE, HbC e HbD e todas elas possuem apenas um aminoácido diferente na cadeia  $\beta$  (Little R.R. *et al.*, 2009).

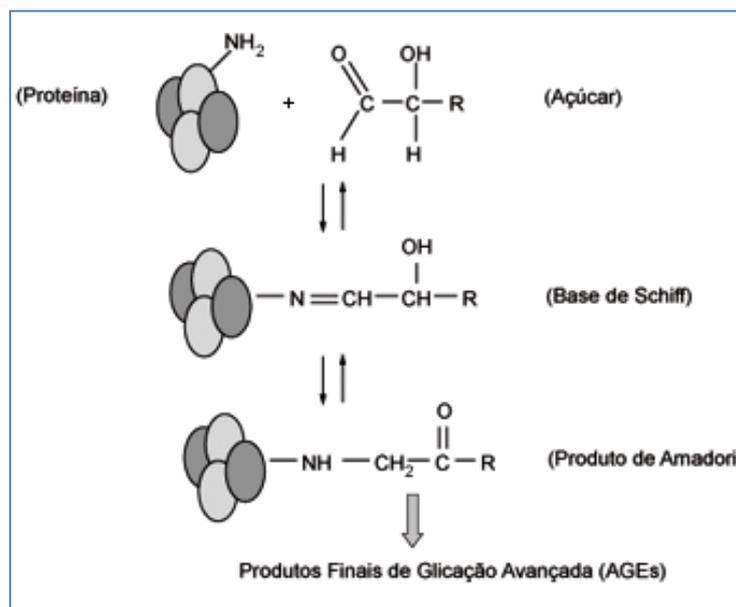
Deste modo, a HbS substitui o aminoácido valina por ácido glutâmico, na posição 6 da cadeia  $\beta$ , a HbC substitui o aminoácido valina por lisina, na mesma posição da HbS, a HbE substitui o ácido glutâmico por lisina, na posição 26, e a HbD substitui a glutamina por ácido glutâmico, na posição 121 da cadeia  $\beta$  (Little R.R. *et al.*, 2009).

O processo de glicação consiste na ligação do grupo aldeído da glicose com o grupo aminoácido livre da hemoglobina, formando a base de Schiff's, também denominada de aldimina, uma forma lábil e reversível, que, para alguns métodos

de determinação da HbA1c, pode ser uma fonte de interferência. Esta molécula pode dissociar-se ou formar uma cetoamina, composto irreversível denominado de rearranjo Amadori ou HbA1c (Fig.2).

A extensão da formação da HbA1c vai depender da concentração de glicose no plasma, da temperatura, pH, concentrações de iões e duração da exposição. Alguns destes factores podem ser considerados estáveis em meio fisiológico (Henriches, 2009).

Este processo ocorre, aproximadamente, em mais dez locais da molécula da hemoglobina, para formar outras glicohemoglobinas além da HbA1c, que corresponde a 60% de todas glicohemoglobinas (Bem AF, 2006).



**Figura 2: Processo de glicação não enzimática das proteínas.**

(Adaptado de Lapolla *et al.*, 2004)

Os produtos Amadori formados possuem grupos carbonilos reactivos, que se condensam com grupos aminas primários e dão origem aos produtos de glicação avançada (AGEs). Os AGEs são os principais causadores das complicações diabéticas, porque são capazes de modificar irreversivelmente as propriedades químicas e funcionais das mais diversas estruturas biológicas (Barbosa JHP *et al.*, 2008).

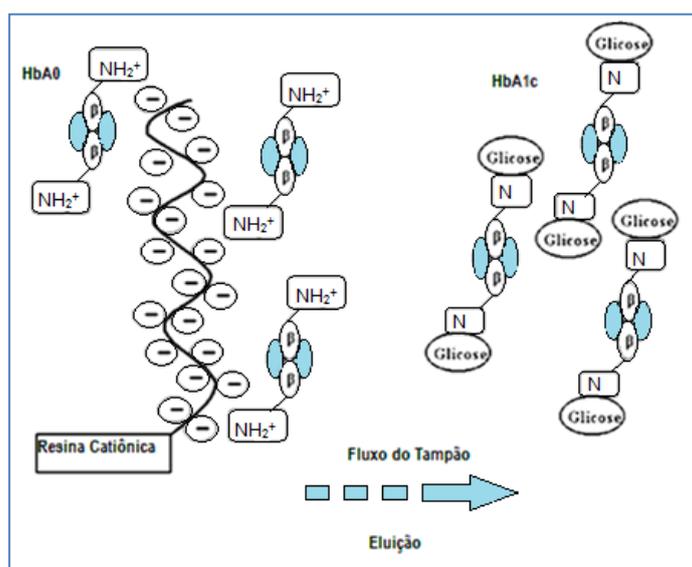
## 1.2.2 Método para determinação da HbA1c

Existem diferentes princípios analíticos para a determinação da HbA1c e, conseqüentemente, existe um grande número de métodos e ensaios disponíveis no mercado.

Os métodos são baseados nas características físicas, químicas ou imunológicas da molécula da HbA1c. Os métodos mais comuns são: cromatografia por troca iônica; cromatografia de afinidade utilizando ácido borônico, imunoenaios e enzimáticos (Henrichs, 2009).

### 1.2.2.1 Cromatografia de Troca Iônica

Estes métodos baseiam-se na separação da hemoglobina glicada da hemoglobina não glicada, através das suas cargas. A hemoglobina não glicada apresenta carga positiva, o que leva a uma maior interação com a coluna de carga negativa na cromatografia catiónica. Com o fluxo do tampão adequado sobre a resina, permite eluir a fracção glicada (HbA1c), separando-a da não glicada (Fig.3).



**Figura 3: Cromatografia de Troca Iônica.**

(Adaptado de Carmago and Gross, 2004)

Esta metodologia está disponível em minicolunas cromatográficas ou em sofisticados sistemas denominados de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), os quais podem apresentar-se completamente automatizados.

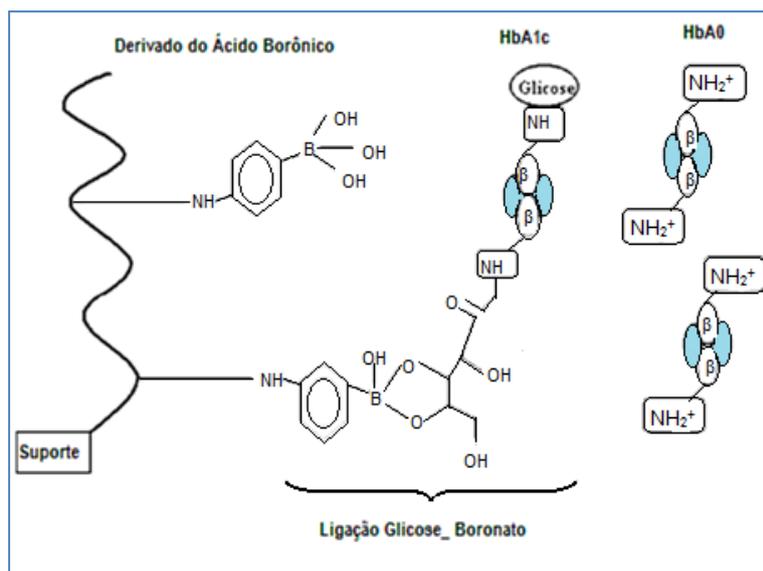
As minicolunas cromatográficas invadiram os laboratórios clínicos na década de 80, por serem baratas, mas, como eram dependentes da temperatura e pH, apresentavam problemas de calibração e baixa reprodutibilidade, e foram substituídos por sistemas de HPLC (Camargo JL *et al.*, 2004).

O HPLC apresenta um elevado nível de desempenho e fundamentalmente consegue satisfazer os requisitos clínicos, não sofrendo interferência da base de Schiff ou da hemoglobina carbamylada, motivos que levaram a que fosse considerado como Método de Referência.

As limitações são: a capacidade (por exemplo, as amostras são analisadas uma a uma e, frequentemente, só consegue processar um máximo de cem amostras), e ser um instrumento autónomo em que a única finalidade é a determinação da HbA1c e outras hemoglobinas quando programado para esse fim (Weykamp C, 2009).

#### **1.2.2.2 Cromatografia de Afinidade**

A cromatografia de afinidade utiliza derivados de ácido borónico, por exemplo o ácido m-aminofenilborónico, que está fixado numa resina. O ácido borónico reage com o grupo 1,2 cis-diol da hemoglobina ligada à molécula da glicose, levando à separação da fracção glicada da não-glicada, ficando a HbA1c retida na coluna, enquanto a fracção não-glicada é eluída pelo fluxo de um tampão (Fig.4) (Camargo JL *et al.*, 2004).



**Figura 4: Cromatografia de Afinidade.**

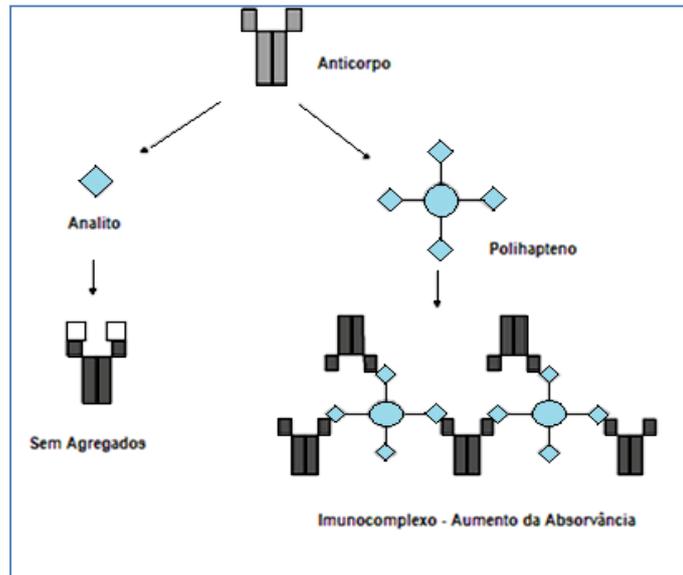
(Adaptado de Carmago and Gross, 2004)

### 1.2.2.3 Imunoensaio

Os imunoensaios utilizam anticorpos direccionados à fracção N-terminal da hemoglobina glicada. A grande vantagem destes ensaios é poderem ser facilmente introduzidos na rotina laboratorial porque são aplicados a autoanalisadores bioquímicos, e de não serem afectados por problemas relacionados com a carga eléctrica da molécula. Os ensaios disponíveis no mercado podem utilizar a imunoturbidimetria ou imunoaglutinação (Fig.5) (Camargo JL *et al.*, 2004).

A desvantagem é possuírem uma curva de calibração não linear, o que requer a calibração em vários pontos da curva, a estabilidade limitada dos reagentes, que requer calibrações frequentes e, por fim, o valor da HbA1c depender da relação com o valor da hemoglobina total, que é medido por um princípio diferente, sendo uma fonte de incerteza no resultado.

O grande desafio para os testes imunoquímicos é atingir um coeficiente de variação (CV) inferior a 2%, valor alcançado pelos melhores equipamentos utilizando a metodologia de HPLC. Este coeficiente de variação torna-se necessário para um melhor uso clínico dos valores de HbA1c (Weykamp C, 2009).



**Figura 5: Imunoensaio.**

(Adaptado de Carmago and Gross, 2004)

#### 1.2.2.4 Método Enzimático

O método enzimático utiliza proteases para digerir a hemoglobina, produzindo frutossil-aminoácido. Pela acção de uma oxidase, este composto produz peróxido de hidrogénio, que reage com cromogénios na presença de peroxidase. A hemoglobina total é medida espectrofotometricamente e o resultado é dado como uma relação GHb/Hb total (Camargo JL *et al.*, 2004).

O teste de proficiência do *College of American Pathologists* (CAP), de acordo com os dados obtidos, a partir do *National Glycohemoglobin Program Standardization* (NGSP), revela que nos Estados Unidos aproximadamente 60% dos laboratórios usam testes imunoquímicos, 30% usam HPLCs e menos de 10% usam um método com base na cromatografia de afinidade.

O programa externo de qualidade europeu, realizado pelo laboratório de referência europeu, mostra que, na Europa, cerca de 60% dos laboratórios usam HPLCs, 35% testes imunoquímicos e apenas alguns laboratórios usam cromatografia de afinidade (Weykamp C, 2009). Em Portugal, de acordo com Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), em 2010, 74%

dos laboratórios participantes usavam HPLCs, 22% utilizavam imunoturbidimetria e, aproximadamente 4% usavam cromatografia de troca iónica.

Na minha opinião, estes dados revelam que a maioria dos laboratórios europeus utilizam o método de referência HPLC, em contrapartida os Estados Unidos optam por ensaios imunoquímicos, devido à automatização, permitindo uma diminuição dos custos e do tempo de resposta dos resultados.

### **1.2.3 Factores que Interferem na Determinação da HbA1c**

O laboratório, ao seleccionar o método para a determinação da HbA1c, deve ter conhecimento dos potenciais interferentes e deve informar os médicos que requisitam este doseamento, porque a interpretação adequada dos resultados do teste exige uma compreensão do método de ensaio, incluindo as suas interferências conhecidas (Sacks DB, 2002).

Os principais interferentes que podem afectar os resultados da HbA1c, segundo Netto AP *et al.* (2009), são:

- **Hemoglobinas Variantes ou Modificadas**

- Pacientes portadores de variantes heterozigóticas da hemoglobina (por exemplo: hemoglobinas C, S, E, D, F, Graz, Sherwood Forest, Padova) podem levar a resultados falsamente elevados ou diminuídos, dependendo da metodologia aplicada. Alguns métodos, baseados na cromatografia por troca iónica, podem identificar a presença de alguns tipos de variantes de hemoglobina, enquanto métodos que utilizam o princípio de imunoensaio não são capazes de detectar a presença dessas variantes de hemoglobina;

- Para pacientes portadores de hemoglobinopatias homozigóticas, a determinação da HbA1c não é aplicável independentemente do método utilizado pela ausência de HbA sendo necessário, nestes casos, a utilização de testes alternativos;

- Presença de hemoglobina quimicamente modificada, no caso de doentes urémicos, que produzem um composto denominado de hemoglobina carbamida resultante da ligação da ureia à hemoglobina. Doentes que tomam quantidades elevadas de ácido acetilsalicílico, que produzem hemoglobina acetilada. Ambas podem interferir e produzir resultados falsamente elevados.

- **Diminuição da Sobrevivência dos Eritrócitos**

- Doenças que provocam redução da sobrevivência dos eritrócitos ou diminuição do seu período de vida (por exemplo: recuperação de uma perda de sangue aguda, anemia hemolítica) levam a uma diminuição dos valores de HbA1c independentemente da metodologia aplicada.

- **Outros Factores**

- A presença de grandes quantidades de vitamina C e E poderá levar a resultados falsamente baixos por inibirem a glicação da hemoglobina;

- A anemia por carência de ferro, vitamina B12 ou folatos, pode levar a resultados aumentados;

- Hipertrigliceridemia, hiperbilirrubinemia, uremia, alcoolismo crónico, ingestão crónica de opiáceos podem interferir em alguns métodos, produzindo resultados falsamente elevados.

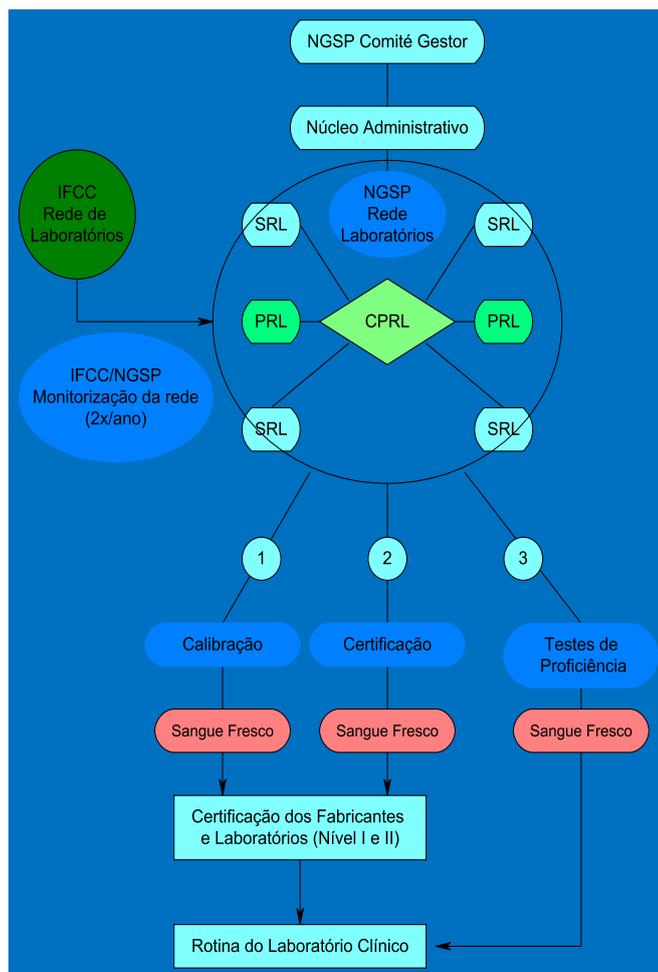
### 1.3 A Padronização da HbA1c

A existência de vários métodos para a determinação da HbA1c implicava que, quando se utilizavam métodos diferentes, os resultados não podiam ser comparados entre si nem com os valores propostos pelos estudos do DCCT e UKPDS, o que dificultava o uso clínico do teste da HbA1c (Guimarães J, 2006).

Contudo, vários estudos demonstraram vantagens e viabilidade na padronização dos ensaios para a determinação da HbA1c, conduzindo a um impacto positivo no tratamento dos doentes diabéticos. Assim, a *American Association for Clinical Chemistry* (AACC) estabeleceu em 1993 uma subcomissão para a padronização da HbA1c, denominada de NGSP, com o objectivo de desenvolver um plano para permitir que todos laboratórios clínicos individuais pudessem relacionar os resultados dos seus ensaios com os resultados dos estudos efectuados pelo DCCT, onde foram estabelecidas relações com o valor da HbA1c, glicose média e os riscos para o desenvolvimento de complicações crónicas (Little RR *et al.*, 2001). O NGSP é um programa nacional dos Estados Unidos para a padronização da HbA1c (Fig.6), composto por um comité gestor, uma rede de laboratórios certificados, e um laboratório central de referência primário (CPRL), que dá apoio aos três laboratórios de referência primários (PRLs) e aos sete laboratórios de referência secundários (SRLs).

O CPRL realiza as determinações de HbA1c, por HPLC usando a resina Bio-Rex 70 e seguindo o método protocolar do CPRL, e ajusta a calibração inicial pelo programa de calibração baseado no *set-point* usado pelo DCCT.

Os PRLs e os SRLs vão utilizar o calibrador preparado pelo CPRL para calibrar os seus aparelhos. Os PRLs utilizam o mesmo método e servem como laboratórios de apoio ao CPRL, para garantir que este cumpra as necessidades do programa. Os SRLs utilizam métodos comerciais de alta precisão, baseados em diferentes princípios, trabalham directamente com os fabricantes, para ajudá-los na padronização dos seus métodos e no fornecimento de dados de comparação para a certificação de rastreabilidade ao DCCT.



**Figura 6: Processo da Rede NGSP.**

(Adaptado <http://www.ngsp.org/protocol.asp>, 2011)

O processo de certificação do NGSP é igual para os fabricantes e laboratórios, mas, para os laboratórios, existem dois níveis de certificação. Para os fabricantes e laboratórios de nível II obterem a certificação, a diferença dos resultados dos seus métodos e os resultados do método utilizado pelo SRL não devem exceder o intervalo  $\pm 0,75\%$  de HbA1c para um nível de confiança de 95%. Para os laboratórios de nível I o critério é mais exigente e a diferença entre os seus resultados e o SRL devem estar entre o intervalo de  $\pm 0,70\%$  de HbA1c.

Os SRLs são monitorizados mensalmente pelo CPRL, e a rede NGSP é monitorizada, duas vezes por ano, pela rede de laboratórios da *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC), através de comparações de amostras.

A eficácia do programa nacional NGSP, na harmonização dos resultados de HbA1c, é avaliada pelos testes de proficiência realizados pelo CAP duas vezes por ano. Os dados obtidos permitem avaliar a eficácia do programa de padronização, através da estimativa do *bias* (de cada laboratório, de cada aparelho, de cada tipo método, incluindo todos os métodos), da comparação entre laboratórios e métodos e através do coeficiente de variação de todos os laboratórios (www.ngsp.org, 2011).

Desde a formação do NGSP em 1996, tem-se verificado um aumento do número de métodos e laboratórios certificados. Segundo o *site* do NGSP, no início de 2011, existiam aproximadamente 100 métodos e 100 laboratórios certificados, o que reflecte a necessidade contínua dos laboratórios e fabricantes, em alcançarem os critérios clínicos (Little RR, 2011a).

Existem mais dois programas nacionais para a padronização da HbA1c, o programa japonês e o programa sueco, que se iniciaram em 1990. Os três programas utilizam aparelhos de HPLC, mas, como todos são diferentes, produzem resultados diferentes e, conseqüentemente, os três sistemas nacionais de referência têm valores de referência diferentes. O método de referência NGSP é o menos específico dos três, a seguir é o japonês e, por último, o mais específico é o sueco.

Conseqüentemente, o valor máximo de HbA1c para uma população de não diabéticos é maior para o NGSP (6%), intermédia para o Japão (5,5%) e menor para a Suécia (5,0%).

Nenhum destes programas reflecte o valor verdadeiro da HbA1c, e as diferenças dificultam comparações internacionais. Para ultrapassar este problema, a IFCC estabeleceu, em 1995, um grupo de trabalho para a padronização mundial da HbA1c, para desenvolver um sistema de medição de referência, dentro do conceito de rastreabilidade metrológica (Weykamp C, 2009).

Este grupo desenvolveu dois métodos de referência, para medir especificamente a HbA1c, baseando-se na clivagem da hemoglobina em peptídeos específicos por uma enzima proteolítica, posteriormente os peptídeos glicosados e os não glicosados são separados por HPLC, e quantificados por espectrofotometria de massa ou electroforese capilar. Os métodos são calibrados com misturas puras de HbA1c e

HbA0 (material de referência primário). Os valores são depois atribuídos ao material de referência secundário, que servirá para calibrar os aparelhos dos fabricantes.

Os laboratórios pertencentes a esta rede participam, duas vezes por ano, em estudos comparativos para renovar a aprovação pelo IFCC, de acordo com os critérios estabelecidos pelo programa.

Os resultados fornecidos pela IFCC são baseados na precisão dos métodos. Os resultados do NGSP, podem ser relacionados com resultados clínicos e objectivos para o tratamento da diabetes. Os da IFCC são consistentemente 1,5 - 2% mais baixos em toda a gama de valores em relação aos do NGSP.

Os resultados do NGSP são expressos em percentagem, e os do IFCC em mmol HbA1c / molHb, e para que os resultados sejam comparáveis, foi desenvolvida uma equação:

$$NGSP = (0,09148 \times IFCC) + 2,152$$

E, com esta relação os resultados IFCC, também podem ser relacionados com os resultados clinicamente significativos do DCCT e UKPDS.

A Directiva Europeia 98/79/CE relativa aos dispositivos médicos de diagnóstico *in-vitro* de 1998, estipula que todos os produtos vendidos na Europa devem ser rastreáveis ao método de referência IFCC ([www.ngsp.org](http://www.ngsp.org), 2010).

Em contrapartida, a ADA recomenda que a determinação da HbA1c deve ser realizada por métodos de ensaio certificados pelo NGSP e rastreáveis ao método de referência DCCT (ADA, 2010).

A padronização mundial da HbA1c, segundo a declaração consenso, publicada em 2007 e revista em 2011, recomenda que todos os países forneçam os resultados em ambas unidades, isto é, segundo NGSP/DCCT (%) e IFCC (mmol/mol). Muitos países já decidiram mudar para as unidades do sistema internacional (SI) IFCC, depois de um período intercalar, em que os resultados são expressos nas duas unidades, mas vários países ainda não decidiram em que unidades vão reportar os seus resultados (Little RR, 2011a).

Segundo Marshall SM (2010) as principais vantagens da padronização da HbA1c são:

- Fornecer um resultado verdadeiro, que é padronizado para um valor absoluto;
- Os resultados não sofrem alterações ao longo do tempo em relação aos resultados do DCCT;
- A relação entre os valores DCCT permanecerá constante ao longo do tempo;
- A padronização dos relatórios de HbA1c agora é possível;
- Melhoria da conversão dos resultados da investigação;
- A possibilidade de utilizar os valores da HbA1c no diagnóstico da diabetes *mellitus*;
- O programa de educação vai melhorar o conhecimento da importância e interpretação da HbA1c.

As desvantagens da padronização com a transição das unidades de medida para mmol/ mol são as seguintes:

- Necessidade de adaptação dos instrumentos de medida e computadores;
- Alguns métodos não podem ser programados, para fornecerem dois resultados em % e mmol/mol;
- Diferentes valores podem gerar confusão, na educação e cuidados de saúde, sendo necessários programas para garantir uma transição suave.

## 1.4 Qualidade nos resultados da HbA1c

Uma vez que existe rastreabilidade dos resultados da HbA1c, obtidos por métodos comerciais com o sistema de medição de referência, é importante agora definir as metas de qualidade para o desempenho dos métodos.

De acordo com o consenso de Estocolmo em 1999, com a participação da OMS, IFCC, *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) e representantes de 27 países, com o objectivo de estabelecer especificações globais da qualidade para laboratórios clínicos, resultou uma hierarquia de modelos para estabelecer as especificações:

1. Impacto do desempenho analítico em função do cenário clínico específico;
2. Impacto do desempenho analítico em função de um cenário clínico geral
  - Especificações gerais da qualidade, baseadas na variação biológica,
  - Especificações gerais da qualidade baseadas em opiniões médicas;
3. Directrizes de sociedades científicas
  - Recomendações de grupos especialistas nacionais e internacionais,
  - Recomendações de especialistas ou comités institucionais;
4. Limites de entidades reguladoras, organizadores para a avaliação externa da qualidade
  - Especificações da qualidade definidas por regulamentos do governo (*Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA), Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)),
  - Especificações da qualidade definidas por entidades organizadoras de programas de avaliação externa da qualidade;
5. Estado da arte
  - Dados do Controlo de Qualidade Externo (CQE) ou de testes de aptidão,
  - Publicações individuais publicadas sobre metodologias.

Assim, quando disponível e apropriado para a finalidade prevista, os primeiros modelos devem ser preferidos aos restantes. O modelo clínico é o mais importante, porque a interpretação médica dos resultados vai determinar a

qualidade que devemos exigir para um método. O uso clínico pode ser mais exigente do que as outras metas, mas pode ser menos exigente do que os objectivos biológicos (Westgard S, 2011a).

Como foi referido anteriormente, os doentes diabéticos devem manter os níveis de HbA1c inferiores ou igual a 7% HbA1c, e a ADA recomenda que a determinação da HbA1c deve ser feita duas vezes por ano, para pacientes com valores estáveis e quatro vezes por ano, em pacientes com alterações na terapia.

Do ponto de vista analítico, a diferença entre duas determinações de HbA1c em amostras biológicas de um mesmo indivíduo, colhida em dias diferentes pode ser avaliada pelo coeficiente de variação analítico (CVa) do método utilizado, e do coeficiente de variação biológico intra-individual (CVi), que podem ser combinados no valor de referência da alteração (RCV) (Westgard S, 2011b).

O RCV é a diferença crítica entre uma série de resultados de um paciente, podendo ser considerada significativamente diferente, para um intervalo confiança de 95%. É calculado pela seguinte fórmula:

$$RCV = \sqrt{2} \times 1,96 \times \sqrt{[(CVa)^2 + (CVi)^2]}$$

Recentemente, concluiu-se que uma diferença de 0,5% HbA1c para um nível de 7% provoca alterações significativas no controlo dos doentes diabéticos, e essa alteração não pode ser consequência da imprecisão do método utilizado, que deve ter um RCV inferior a 7,1% ( $[0,5/7,0] \times 100 = 7,1\%$ ) (Lenters-Westra E, 2011). Foi publicado um estudo por Erna Lenters-Westra *et al* em Abril de 2011, em que o objectivo foi avaliar a imprecisão de múltiplos métodos (Bio-Rad, Arkray/Menarini, Roche, Tosoh e outros) e relacionar com o RCV. Este estudo avaliou a capacidade dos métodos para detectar uma diferença crítica entre dois resultados de uma amostra de um paciente, e se esta era igual ou menor ao que é considerado uma alteração clinicamente significativa nos resultados.

Neste estudo, 41,9% dos laboratórios que usavam imunoensaios, tinham coeficiente de variação analítico superior a 3%, e mais de 22% dos laboratórios

não conseguiram distinguir entre um resultado de 7,5% de um resultado anterior de 7%.

O que significa que, um em cinco laboratórios, utilizando diferentes métodos para a determinação da HbA1c, não estão de acordo com os critérios clínicos. Isto pode levar a consequências na monitorização dos doentes com diabetes, visto que a FID recomenda a iniciação da terapia com insulina a partir 7,5% HbA1c, e a ADA recomenda que a alteração da medição deve ser iniciada a partir de 7,0% HbA1c.

Neste estudo, chegou-se à conclusão que os métodos devem ter um coeficiente de variação analítico inferior a 2,4%, para poderem detectar alterações de 0,5% HbA1c. Também, foi demonstrado que o coeficiente de variação biológico intra-individual utilizado de 1%, segundo os autores, é o mais apropriado, porque um coeficiente de variação biológico intra-individual de 3,4% (*database Ricós et al., 2010*), implicava que o coeficiente de variação analítico não teria muito impacto no cálculo do RCV, o que significaria que as diferenças entre os resultados de uma mesma amostra dependeriam mais da variabilidade biológica do que da variabilidade analítica, o que seria pouco improvável (*Lenters-Westra et al., 2011*). Consecutivamente, na hierarquia atrás mencionada, temos o uso da variabilidade biológica para estabelecer os limites da variação analítica de um método. Desta forma, o desempenho aceitável de um método deve ter um:

- $CV_a < 0,50$  variabilidade biológica intra-individual ( $CV_i$ );
- $Bias < 0,25 [(CV_i)^2 + \text{variabilidade biológica inter-individual } (CV_g)^2]^{1/2}$

Segundo a base de dados de Ricós *et al*, os valores para a variabilidade biológica da HbA1c são  $CV_i = 3,4\%$  e  $CV_g = 5,1\%$ , embora outros estudos realizados em indivíduos saudáveis, revelem um coeficiente de variação intra-individual para a HbA1c aproximadamente entre 1,8-1,9%, valores mais baixos que os mencionados anteriormente, verifica-se a necessidade de mais estudos para fornecerem informação mais robusta acerca da variabilidade biológica da HbA1c (*Braga F et al., 2010*).

Seguidamente, temos os requisitos da qualidade para a certificação do NGSP e para o teste de proficiência CAP, que foram actualizados este ano. O processo do NGSP para a certificação dos fabricantes e laboratórios fez uma estimativa do erro total (ET) calculado a partir da média do *bias* observado entre os resultados dos participantes e os resultados do método de referência, e ainda o desvio padrão das diferenças das amostras emparelhadas ( $ET = bias \pm 1,96 \times DP_{diff}$ ), e concluiu que o método para ser certificado tem de ter um  $ET \leq \pm 0,75\%$  HbA1c, isto significa que o erro total admissível (ETa) é igual a 10,7% para o objectivo de tratamento de 7% HbA1c.

O erro total admissível para o teste de proficiência do CAP é de 7%, isto é, que para uma concentração de 7% HbA1c dá 0,49% HbA1c, sendo um critério mais exigente do que o critério para a certificação (Little RR *et al.*, 2011a).

Existem duas situações que devem ser consideradas: a primeira envolve determinações consecutivas para avaliar uma alteração nos resultados dos pacientes, e a segunda situação é avaliação do significado de um valor do paciente *versus* o valor alvo de 7%.

A primeira situação, abordada anteriormente, leva a concluir que o coeficiente de variação analítico menor que 2,4% é suficiente para detectar importantes alterações clínicas. Nesta situação, o *bias* do método não é considerado, porque é anulado pela diferença de duas determinações consecutivas.

Contudo, na segunda situação, o *bias* e o coeficiente de variação analítico devem ser considerados, isto é, para o cálculo do erro total do método. Para um método com 0,0% de *bias*, é exigido um coeficiente de variação analítico de 3,5% para um intervalo de 95%, para que um resultado verdadeiro de 7% esteja entre 6,5-7,5% ( $ET = 7\%$  do CAP). Se existir um *bias* de 0,2%, então o coeficiente de variação analítico deve ser 2,3% (Westgard JO, 2011).

De acordo com os dados do teste de proficiência de 2010 do CAP, apenas dois métodos apresentaram coeficiente de variação analítico inferior ou igual a 2%, para as amostras com valores alvo de 5,2%, 8,7% e 6,3% HbA1c. Foi também verificado que aproximadamente 94% dos laboratórios usam métodos que apresentam coeficientes de variação analíticos entre laboratórios inferiores a 5%

HbA1c% e que o *bias* atingiu valores mais altos do que nos anos anteriores entre 0,4 e 0,6% HbA1c (www.ngsp.org, 2011).

Perante os dados anteriores, os profissionais do laboratório devem estar atentos à variabilidade analítica dos métodos, para a determinação da HbA1c. Embora se tenha verificado, nos últimos cinco anos, uma melhoria no desempenho dos métodos analíticos, todos os métodos ainda não concorrem com os métodos de referência primários, o que contribui para existência de *bias* nos estudos epidemiológicos e, conseqüentemente, a uma classificação errada dos pacientes no diagnóstico da diabetes *mellitus* (Schindhelm RK, 2010).

### **1.5 Acreditação dos Métodos de Acordo com a NP EN ISO 15189**

A determinação da HbA1c tem um enorme potencial no diagnóstico e monitorização da diabetes *mellitus*, mas só se garantirmos em primeiro lugar que o método possui a precisão e exactidão, com a qualidade necessária para fornecer resultados de forma a satisfazer as necessidades clínicas.

Segundo o coordenador do grupo de trabalho do NGSP, se a determinação da HbA1c for realizada num laboratório acreditado com um método preciso e exacto, os médicos podem ter 95% de certeza que uma diferença menor ou igual 0,5% HbA1c, entre determinações sucessivas do mesmo paciente, representa uma mudança estatisticamente significativa na terapêutica do doente (Little RR *et al.*, 2011b).

De facto, a acreditação de um laboratório é a evidência de competência. Um laboratório com ensaios acreditados possui comprovadamente métodos devidamente validados e verificados, que satisfazem os requisitos de qualidade exigidos.

O principal objectivo da validação é avaliar as características analíticas e o desempenho do método, tendo a certeza que os requisitos de qualidade exigidos para essas características são atingidos. Num laboratório clínico, os resultados podem definitivamente, e às vezes fatalmente, influenciar a saúde, a qualidade de vida e até mesmo a vida do paciente. É o dever dos profissionais do laboratório fornecer resultados com qualidade (Friedecký B, 2004).

Assim, a validação do método é uma parte essencial das boas práticas laboratoriais, visto que resultados confiáveis só poderão ser fornecidos se conhecermos bem os pontos fortes e fracos do método (www.nmschembio.org.uk, 2008).

A acreditação dos laboratórios clínicos é fundamentada na norma internacional NP EN ISO 15189, publicada em 2003 e revista em 2007, que indica os requisitos particulares da qualidade e competência para os laboratórios clínicos. É baseada nas normas NP EN ISO 9001 e na NP EN ISO/IEC 17025, sendo que esta última indica os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, em que dá ênfase a conceitos como veracidade e incerteza, em que a recomendação para o cálculo da incerteza é utilizar a metodologia do *Guide to the Expression of Uncertainty of Measurement* (GUM). Assim, na elaboração da NP EN ISO 15189 os conceitos e terminologia do Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM) aplicados na NP EN ISO/IEC 17025 – como, veracidade, exactidão, precisão e quantificação da incerteza - foram também aplicados aos laboratórios *clínicos* (Westgard JO, 2008).

Os requisitos particulares referentes à norma, para a qualidade e competência dos laboratórios clínicos importantes para este trabalho, são os seguintes:

5.5.4. *“As especificações de desempenho para cada procedimento utilizado num exame devem corresponder à utilização pretendida para aquele procedimento.”*

5.6.1. *“O laboratório deve conceber sistemas de controlo da qualidade interno que permitam verificar que se obtém a qualidade dos resultados pretendida.”*

5.6.2. *“O laboratório deve determinar a incerteza dos resultados, quando relevante e possível.”*

5.6.3. *“Deve ser concebido um programa de calibração dos sistemas de medição e verificação da veracidade aplicado de forma a garantir que as medições sejam rastreáveis às unidades SI ou por referência a uma constante natural ou outra referência estabelecida.”*

5.6.4. “O laboratório deve participar em comparações interlaboratoriais tais como organizadas no enquadramento de programas de avaliação externa da qualidade. A gestão do laboratório deve monitorizar os resultados das avaliações externas da qualidade e participar na implementação das acções correctivas quando os critérios de controlo não forem cumpridos.”

O ponto 5.5.4. identifica a importância da validação do desempenho do método, para o uso pretendido, para verificação de que atinge os objectivos da qualidade estabelecidos.

Os pontos 5.6.1. e 5.6.4. dão ênfase ao Controlo da Qualidade Interno (CQI) e Controlo da Qualidade Externo, que devem estar relacionados com a qualidade pretendida.

Os pontos 5.6.2. e 5.6.3. podem ser aplicados sem definição de objectivos da qualidade, ou seja, estes são os requisitos para documentar certas características (incerteza e rastreabilidade), que estão relacionadas com o desempenho de um método (por exemplo, a precisão, veracidade) (Westgard JO, 2010a).

### **1.5.1 Determinação da Incerteza**

A incerteza de uma medição fornece uma estimativa quantitativa da qualidade de um resultado do teste, tornando-se num elemento central de um sistema de qualidade para os laboratórios de calibração e ensaios. Várias organizações internacionais de metrologia desenvolveram o GUM para fornecer aos laboratórios a metodologia para a expressão da incerteza de uma medição.

Posteriormente, as normas internacionais NP EN ISO/IEC 17025 e ISO 15189 têm exigido aos laboratórios o cumprimento deste requisito e referido o GUM como a metodologia apropriada.

A implementação da incerteza de medição oferece aos laboratórios clínicos um valor acrescido aos seus serviços de diagnóstico, visto que vai permitir aos clínicos uma maior compreensão das limitações dos testes, principalmente nos níveis críticos de decisão médica (White G.H *et al.*, 2004).

A incerteza, segundo o VIM, é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores, que podem, com razoabilidade, ser atribuídos ao mensurando.

Segundo a norma NP EN ISO 15189, *“Todos os componentes importantes da incerteza devem ser tidos em conta. As fontes que contribuem para a incerteza podem incluir a colheita, preparação da amostra, selecção de alíquotas, calibradores, materiais de referência, volume inicial de amostra, equipamento utilizado, condições ambientais, condições da amostra e mudanças do operador.”*

Deste modo, a determinação da incerteza num laboratório clínico requer o conhecimento das principais fontes de incerteza da fase pré-analítica, analítica e pós-analítica, que podem afectar os resultados do ensaio. Embora seja importante identificar e minimizar estas fontes de incerteza da fase pré e pós-analítica, estas não afectam a incerteza inerente ao processo do teste e, portanto, são excluídas do cálculo da incerteza da medição.

Assim, a incerteza da medição, para o procedimento do teste, é a soma das incertezas associadas ao procedimento operacional do método; quando existe uma estimativa da incerteza para o valor do calibrador, esta também deve ser incluída (White GH *et al.*, 2004).

Na prática, a incerteza de uma medição é calculada a partir da precisão observada sendo esta a componente essencial da incerteza total, visto que a dispersão dos resultados em torno de valores de decisão médica é para os clientes do laboratório a maior incerteza, porque pode afectar a interpretação dos resultados. É expressa em desvio padrão ou por coeficiente de variação, ao qual deve ser multiplicado  $\pm 1,96$ , baseado no intervalo de confiança de 95%. No entanto, o valor do *bias* que representa a diferença entre o resultado (média de resultados), obtido através da medição, e o seu verdadeiro valor deverá ser incluído no cálculo da incerteza apenas quando se utilizam métodos em que os resultados do teste são interpretados com base em valores de referência, que tenham sido determinados por um método diferente (Westgard JO, 2010a).

De acordo com a OGC004, *“aceitando-se haver situações em que a quantificação rigorosa dessas componentes seja impossível e, portanto sejam feitas apenas estimativas aproximadas (precisão total dos métodos, determinação do erro total)”*.

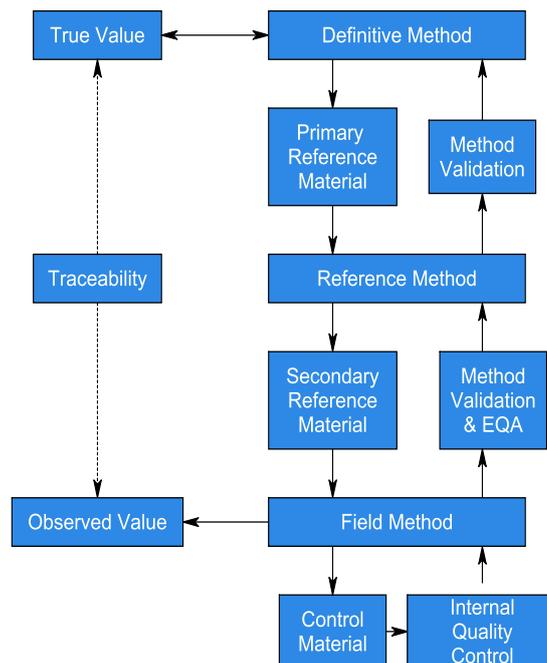
*“Em alternativa, pode-se fazer uma estimativa global das principais componentes, com base na experiência, dados da validação, de comparações interlaboratoriais e de controlo da qualidade.”*

Para os laboratórios clínicos a aplicação do cálculo da incerteza da medição é um tema de grande preocupação e debate sobre a sua pertinência e utilidade, visto que, os seus profissionais estão familiarizados com o cálculo do erro total que oferece o conhecimento necessário do desempenho do método e permite avaliar se este é adequado à utilização pretendida.

O papel fundamental dos laboratórios clínicos é produzir resultados precisos e exactos, apropriados para serem aplicados à finalidade clínica. Para determinar, se um método é adequado à utilização pretendida, o laboratório deve estabelecer objectivos na avaliação do método, para poder comparar com objectivos analíticos internacionalmente aceites, o que é o caso do Colesterol e da HbA1c.

### **1.5.2 Rastreabilidade**

Rastreabilidade é a propriedade do resultado de uma medição, ou do valor de um padrão, pela qual ele pode ser relacionado com determinadas referências, geralmente padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia ininterrupta de comparações, todas com incertezas associadas (Eurachem, 1998). Esta cadeia ininterrupta de comparações (Fig.7) faz uso de uma estrutura hierárquica de métodos e materiais de referência, que podem ser usados para estabelecer a exactidão ou veracidade de um procedimento de medição analítica. No nível mais alto, existem os métodos definitivos e materiais de referência primários, o próximo nível fornece métodos de referência e materiais de referência secundários e, finalmente, existem métodos de rotina e materiais de calibração. Assim, a cadeia de rastreabilidade prevê uma série de relações entre diferentes métodos de referência e materiais, de forma a relacionar os resultados de um método de rotina com o valor verdadeiro.



**Figura 7: Cadeia de Rastreabilidade do Método.**

(Adaptado de Westgard JO, 2008)

Para a HbA1c, existem dois métodos definitivos estabelecidos pelo IFCC, três métodos de referência nacional (Suécia, Japão, Estados Unidos), e uma rede de laboratórios de referência, que validam materiais de referência e monitorizam o desempenho dos métodos de referência nacionais: estes, por sua vez, são utilizados para monitorizar os métodos de rotina e materiais de calibração.

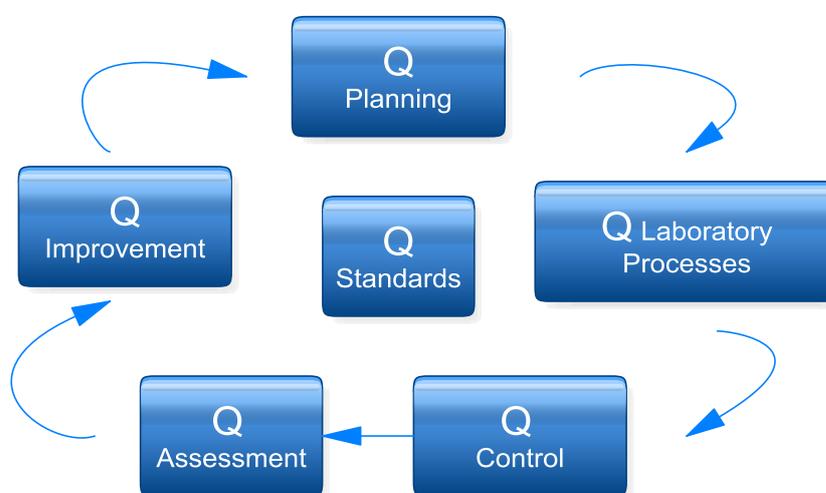
Nos Estados Unidos, esta função é desempenhada pelo NGSP, que certifica a rastreabilidade dos métodos de rotina, assim, cada método de rotina é comparado e avaliado, em relação ao método de referência nacional, e é calibrado para garantir que os resultados dos vários métodos sejam comparáveis ao método de referência nacional (Westgard JO, 2010a).

## 1.6 Validação do Método

Segundo a norma NP ISO EN 15189, “O laboratório deve utilizar unicamente procedimentos validados para confirmar que os procedimentos de exame (fase analítica) são adequados à utilização pretendida.”

Conforme a OGC004, “O facto de se utilizar um procedimento publicado em bulas, manuais existentes/competentes, textos de revisão pelos pares ou revistas internacionais, nacionais, ou regionais não dispensa a validação do mesmo...”

A validação do método é um processo laboratorial, que deve ser cuidadosamente planeado, de forma a ir ao encontro das necessidades dos clientes do laboratório. O ciclo PDCA (*Plan-do-Check-Act*) fornece os componentes necessários, para o processo de validação (Fig.8).



**Figura 8: Ciclo PDCA.**

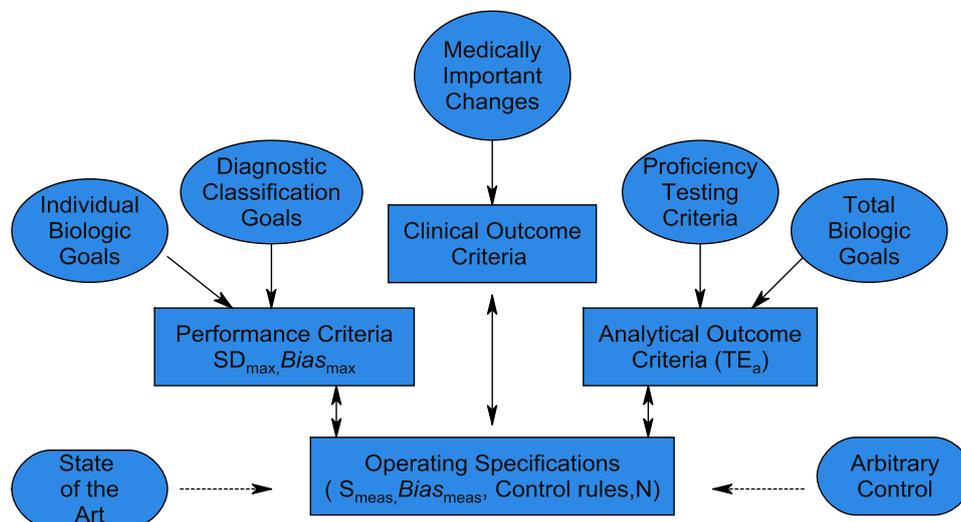
(Adaptado Westgard JO, 2008)

- No Planeamento da Qualidade, temos a selecção/ avaliação dos métodos analíticos;
- Na Qualidade dos Processos Laboratoriais, existem os protocolos para a validação do método, juntamente com as ferramentas estatísticas para a análise dos dados;
- No Controlo da Qualidade, encontramos os procedimentos para o controlo de qualidade estatístico, que servem para monitorizar e validar o processo, através uso de regras de controlo;

- Na Avaliação da Qualidade, temos ferramentas, que permitem a avaliação do desempenho do método, por exemplo, o Controlo de Qualidade Externo e a ferramenta Seis Sigma;
- A Melhoria da Qualidade fornece mecanismos para determinar possíveis causas para o desempenho insatisfatório do método, e como eliminá-las. Neste caso, deve realizar-se novo planeamento dos processos, de forma a alcançar os requisitos exigidos. Caso não seja possível, seleccionar um novo método para validar, ou continuar com o método já implementado na rotina laboratorial.

Todo o processo está centrado em padrões, que representam os requisitos de qualidade dos ensaios. Existem diferentes requisitos de qualidade necessários para gerir as diferentes componentes do processo.

A figura seguinte demonstra a relação entre os diferentes tipos de recomendação e os diferentes critérios da qualidade (Fig.9).



**Figura 9: Diferentes Critérios de Qualidade.**

(Adaptado Westgard JO, 2008)

Os diferentes critérios de qualidade, segundo Westgard JO (2008), são:

- Os critérios clínicos ou intervalos de decisão médica, que são definidos pelas *guidelines* para tratamento médico, vão reflectir alterações médicas importantes nos resultados fornecidos pelo laboratório (por exemplo: UKPDS, DCCT);
- Os critérios analíticos são definidos pelo CQE e pela variação biológica intra-individual (objectivos biológicos totais), através do ETa do método (por exemplo: CAP);
- Os critérios de desempenho são baseados na precisão e exactidão do método, e podem ser definidos em objectivos analíticos separados, como CV e *bias* permitido para o bom desempenho (por exemplo: NGSP).

Todos os critérios da qualidade são convertidos em especificações do processo analítico, que descrevem a precisão, *bias* permitidos e regras de controlo de qualidade necessárias, para detectar erros importantes do processo, e tendo em conta os factores pré-analíticos.

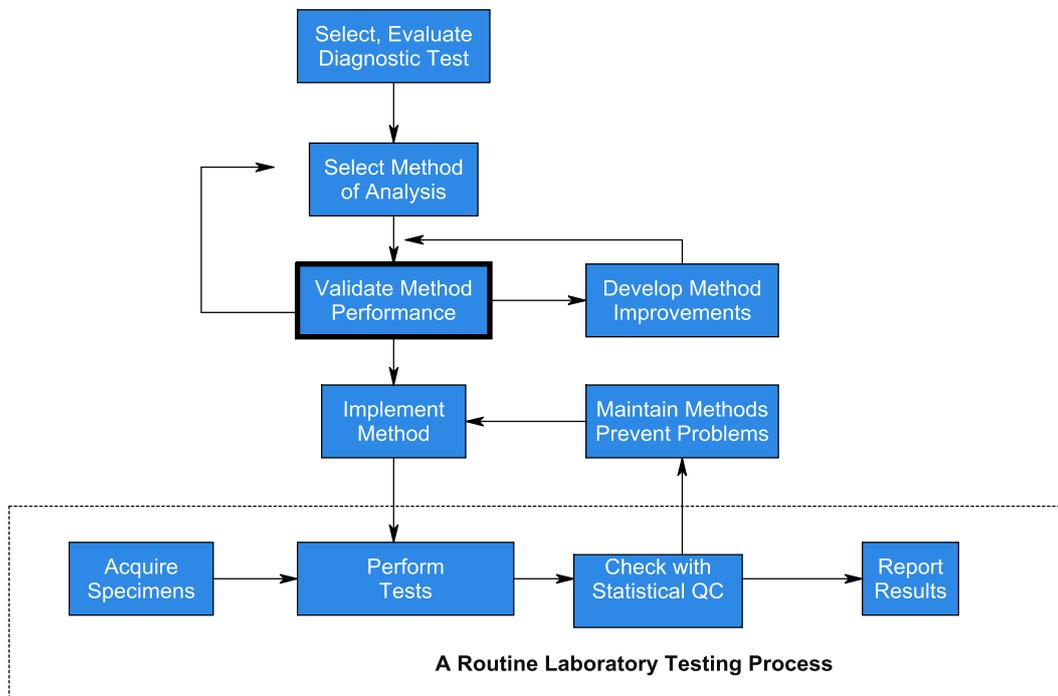
Os laboratórios devem utilizar estes critérios, relacionando o desempenho do método com o ETa, e avaliar se o desempenho do método é satisfatório para a utilização pretendida.

O estado da arte do desempenho analítico estabelece as especificações de operação para a precisão e exactidão do método. O controlo arbitrário é efectuado em vez das práticas de controlo da qualidade, dado que é baseado na prática profissional (Westgard JO, 2008).

### **1.6.1 Estabelecer o Processo de Validação**

A figura seguinte ilustra, perfeitamente, como este processo de validação se relaciona com a rotina de um laboratório, desde a entrada de amostra, execução

do teste, verificação do controlo da qualidade estatístico e a emissão dos resultados (Fig.10).



**Figura 10: Etapas para a Implementação de um Método.**

(Adaptado Westgard JO, 2008)

Para que um método faça parte da rotina laboratorial, existem outras actividades que devem ser realizadas, de forma a validar o desempenho do método. Se o desempenho do método não obedecer aos requisitos da qualidade exigidos, então os profissionais do laboratório devem tentar melhorar o desempenho, o que é difícil nos dias de hoje devido à grande automatização dos aparelhos, sendo mais fácil escolher novo método (o que por vezes implica um novo equipamento) e começar novamente com todo o processo de validação. (Westgard JO, 2008) O processo de validação do método segundo *National Measurement System* (2008) enquadra-se nas seguintes situações:

- Introdução de um novo método, novo *Kit* de diagnóstico, ou na aplicação de novo equipamento de medida no laboratório;

- Alterações feitas num método existente (por exemplo: quando a utilização do método é ampliado para outra finalidade, ou quando o controlo da qualidade demonstra que o método está com problemas);
- Substituição de um método por outro (para demonstrar a equivalência entre dois métodos, isto é, do novo método com o método de referência).

### **1.6.2 Selecção do Método para Validação**

O objectivo da selecção do método é escolher aquele que atende ou excede todos os requisitos estabelecidos pelo laboratório. Este processo de selecção consiste na definição dos requisitos, que vão ao encontro da necessidade clínica ou de uma melhoria da qualidade dos resultados fornecidos, através da pesquisa de informações acerca do método.

As características importantes na selecção de um método segundo Murphy PG (2008) dividem-se em três categorias:

- Características não analíticas do método – factores que determinam onde o método é prático para a situação do laboratório (ex: custo do teste, tipo de amostras, volume de amostra, tempo de resposta, espaço, ....);
- Características metodológicas do método – factores que, em princípio, vão contribuir para o bom desempenho do método (ex: o método é recomendado pelo IFCC ou é um método de referência; padronização e calibração do material primário de referência, reacção química ....);
- Características do desempenho - factores que demonstram o desempenho actual atingido pelo método (ex: precisão, exactidão, interferências, intervalo de referência....).

### 1.6.3 Validação do Desempenho do Método

Segundo a NP EN ISO 15189, “As validações devem ser tão extensivas quanto necessário de forma a responder às necessidades de uma determinada aplicação”.

De acordo com OGC004, “Para efectuar a validação do método pode ser necessário e conveniente realizar alguns (ou todos) dos estudos abaixo indicados: Avaliação indirecta, por evidência das suas características:

- estudo dos parâmetros característicos do método (por exemplo: linearidade, exactidão, precisão, repetibilidade, reprodutibilidade, limites de detecção) para conhecer a qualidade dos seus resultados

Avaliação directa, por comparação com referências

- comparação com métodos de referência;
- comparação com padrões ou materiais de referência certificados;
- ensaios interlaboratoriais.”

Nos Estados Unidos, a extensão da validação do método depende da sua complexidade. Em 1993, a CLIA editou a *Final Rule*, que divide os métodos em *Waived Tests* e *Non-Waived Tests*, e obriga todos os laboratórios a validar todos os métodos *Non-Waived* (métodos com moderada e alta complexidade), que foram introduzidos após 24 de Abril de 2003.

Nos *Waived Tests*, a CLIA requer que os métodos sejam realizados apenas de acordo com as directrizes do fabricante.

Para os métodos *Non-Waived*, aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e não modificados que é o caso da maior parte dos métodos existentes no laboratório, este deve verificar os seguintes parâmetros:

- Exactidão
- Precisão
- Escala de resultados reportável (gama de trabalho)
- Intervalo de referência para valores normais

Para os métodos *Non-Waived* modificados ou desenvolvidos em laboratório, este deve verificar:

- Exactidão
- Precisão
- Sensibilidade analítica (limite de detecção)
- Especificidade analítica (interferência, recuperação)
- Escala de resultados reportável (gama de trabalho)
- Intervalos de referência (valores normais)
- Qualquer outra característica requisitada

Na União Europeia, os métodos são divididos em quatro grupos com diferentes níveis de exigência na validação, segundo Friedecký B (2004):

- Testes Qualitativos com certificado de conformidade CE, em que o único requisito é utilizar o teste de acordo com o procedimento operacional do fabricante e que tenha um programa de controlo de qualidade interno;
- Testes Quantitativos com certificado de conformidade CE, a cuja categoria pertencem a maioria dos testes laboratoriais e é requerido que estes sejam usados para a utilização pretendida declarada pelo fabricante, que o procedimento especificado pelo fabricante não seja alterado em qualquer circunstância, o laboratório deve interpretar os resultados, de acordo com recomendações internacionais (se aplicável), e, em vez de realizar uma validação extensiva, deve apenas realizar a verificação de dois parâmetros, a precisão e a quantificação do *bias*, visto que estas são as características necessárias para a determinação da incerteza;
- Teste quantitativo em que o procedimento foi modificado, em cujo caso deve verificar-se a precisão e o *bias* (e depois a determinação da incerteza) do método, antes e depois das modificações, para provar que o método não sofreu alterações significativas das suas características analíticas. E

os resultados de comparações interlaboratoriais e do controlo de qualidade externo devem estar documentados, para provar que a modificação não alterou a conformidade do teste;

- Testes quantitativos desenvolvidos pelo laboratório são o grupo onde é requerido a validação de um maior número de parâmetros: precisão, exactidão (*bias*), linearidade/gama de trabalho, limite de detecção e quantificação, interferências, comparação com outro método.

#### **1.6.3.1 Linearidade e Gama de Trabalho**

A linearidade de um método analítico é a capacidade que este tem para fornecer resultados directamente proporcionais à concentração do analito numa amostra dentro de uma determinada gama de concentrações.

A gama de trabalho corresponde à gama de concentrações do analito na qual o método pode ser aplicado, isto é, para a qual o método apresenta resposta linear (DOQ-CGCRE-008, 2010).

#### **1.6.3.2 Precisão**

A precisão é a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. A precisão é, portanto, uma medida da variação dos resultados de medições repetidas, cujas variações ocorrem de forma imprevisível, para valores acima ou abaixo do valor médio, efeito provocado pelo erro aleatório (Ea).

A precisão é avaliada através da repetição de medições independentes em amostras idênticas e é geralmente expressa como o desvio-padrão (DP) relativo aos resultados, variância ou CV em percentagem, convindo referir que, geralmente varia com a gama de concentrações.

Dependendo dos factores que se variem, existem várias metodologias para avaliar a precisão, entre as quais: repetibilidade, reprodutibilidade, precisão intermédia, comparação da precisão entre métodos, entre outras.

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efectuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como: o mesmo laboratório, o mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo, portanto a repetibilidade dá-nos uma indicação da variação entre medições de uma mesma amostra num curto prazo de tempo e é, normalmente usada para estimar a precisão intra-ensaio.

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como: diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos em épocas diferentes e é, normalmente, conhecida como precisão inter-ensaio (Relacre, 2000).

Se um laboratório pretende validar um método para seu uso próprio, deve considerar avaliar a precisão intermédia (também conhecida como reprodutibilidade no laboratório). Isto implica fazer medições repetidas em dias diferentes, sob diferentes condições que representam o uso do método na rotina laboratorial ([www.nmschembio.org.uk](http://www.nmschembio.org.uk), 2008).

### **1.6.3.3 Exactidão**

A exactidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceite como verdadeiro.

A exactidão é uma propriedade de um único resultado e é influenciado por ambos os erros aleatórios e sistemáticos. Permite uma estimativa da proximidade de um resultado com o valor verdadeiro e, portanto, inclui o efeito de precisão e tendência ([www.nmschembio.org.uk](http://www.nmschembio.org.uk), 2008).

#### **1.6.3.3.1 Veracidade, Tendência ou Bias**

Veracidade, segundo a norma ISO 3534-2, é a diferença entre a melhor estimativa dos resultados do ensaio e o valor aceite como referência. O *bias* é simplesmente a diferença entre a média de um conjunto de medições e o valor verdadeiro (valor de referência). É afectado por erros sistemáticos (Es) que influenciam o valor da média. Pode ser expresso em percentagem (%).

#### **1.6.3.4 Especificidade e Selectividade Analítica**

É importante estabelecer durante a validação que o método de ensaio mede apenas aquilo que se pretende medir. Em outras palavras, o método deve ser livre de interferências que possam conduzir a um resultado incorrecto. A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes. O método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias de que a grandeza de medida provém apenas do analito (www.nmschembio.org.uk, 2008).

#### **1.6.3.5 Sensibilidade Analítica**

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada (www.nmschembio.org.uk, 2008).

#### **1.6.3.6 Limite de detecção e Limite de Quantificação**

Em muitas situações, é útil conhecermos a capacidade de um método para detectar e / ou quantificar a mínima concentração do analito presente numa amostra com um razoável grau de certeza. Assim, o limite de detecção é a

concentração mínima do analito que o método consegue detectar com um determinado nível de confiança, e o limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de incerteza ([www.nmschembio.org.uk](http://www.nmschembio.org.uk), 2008).

#### **1.6.3.7 Intervalo de Referência para Valores Normais**

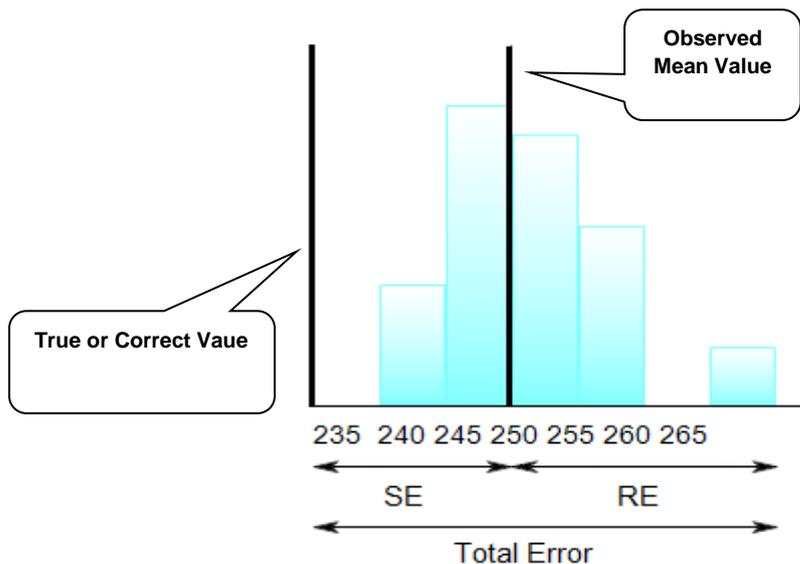
Segundo OMS, IFCC e CLSI, definem o valor de referência como o resultado obtido pela observação ou determinação quantitativa de um analito num indivíduo seleccionado, com base em critérios bem definidos (Ferreira CE *et al.*, 2008).

O laboratório pode utilizar o intervalo de referência para valores normais do fabricante, desde que este seja apropriado para a população de pacientes do laboratório (ou seja, um intervalo normal, que reflecte o tipo de amostra e variáveis demográficas, como, idade e sexo, conforme o caso). Se o fabricante não fornecer os valores de referência apropriados para a população de utentes do laboratório, este pode usar intervalos de referência publicados. No entanto, o laboratório deve avaliar um número adequado de amostras para verificar o intervalo de valores normais fornecido pelo fabricante ou, conforme o caso, os valores de referência publicados (Strathmann F, 2011).

#### **1.6.4 Erro Total**

O segredo da validação está na avaliação dos erros analíticos inerentes ao método através do uso de ferramentas estatísticas apropriadas.

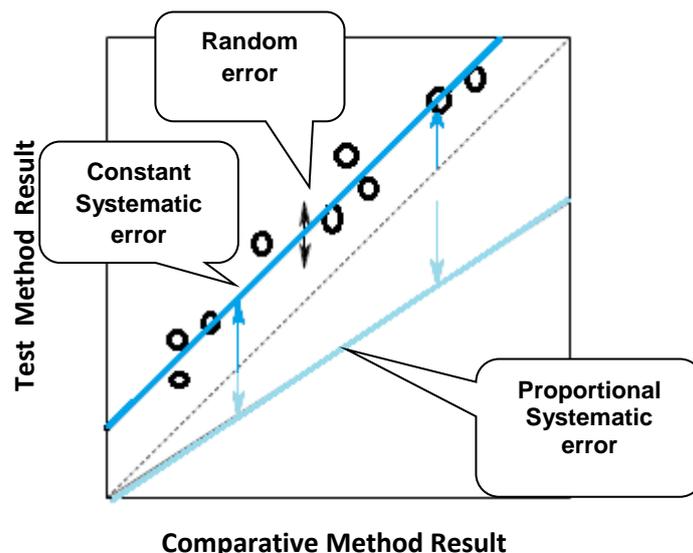
O erro total representa o erro que pode ocorrer num resultado do teste devido à imprecisão (erro aleatório) e inexactidão (erro sistemático) do método. É definido pela seguinte equação:  $ET = \%bias + (1,96 \times CV)$ , onde o *bias* é a estimativa do erro sistemático, e o CV é a estimativa do erro aleatório e o valor 1,96 representa o nível de confiança desejado (Fig.11).



**Figura 11: Representação do Erro Total.**

(Adaptado Westgard JO, 2008)

- Erros aleatórios ( $E_a$ ) são erros de natureza imprevisível e são responsáveis pelas variações nas medições realizadas devido a causas que não se conhecem exactamente. Estão presentes em qualquer medição e, devido à sua natureza, não podem ser corrigidos. Contudo, o efeito pode ser reduzido aumentando o número de repetições e calculando o valor médio. A dimensão do erro aleatório vai determinar a precisão dos resultados.
- Erros sistemáticos ( $E_s$ ) podem ser constantes ou proporcionais, levam a que os resultados sejam diferentes do valor real, ocorrem quando há falhas no método utilizado, defeito dos instrumentos de medição e reagentes, deficiência na actuação do próprio operador; se forem descobertos, podem ser corrigidos ou eliminados. A magnitude do erro sistemático vai determinar o *bias* existente nos resultados de medição (Fig.12).



**Figura 12: Representação dos Diferentes Tipos de Erro.**

(Adaptado de Westgard JO, 2008)

O *bias* e o coeficiente de variação podem ser determinados a partir de estudos de validação do método: o *bias* a partir da experiência de comparação de métodos; e o coeficiente de variação, a partir da experiência de replicação.

O que se pretende com o erro total do método é descrever o erro máximo que pode ocorrer num resultado de um teste, de forma a não afectar a interpretação dos resultados em termos de decisão médica e comprometer a saúde dos pacientes. Nos estudos de validação do método, o erro total é uma medida de qualidade que pode ser comparada com a qualidade analítica pretendida para o método que se pretende validar, que pode ser definida por erro total admissível.

O erro total admissível para um determinado analito pode ser definido com base na variabilidade biológica, variabilidade analítica e utilidade médica.

O passo seguinte é julgar a aceitabilidade do método para aplicação na rotina laboratorial, em que se recomenda uma ferramenta gráfica denominada de Carta de Decisão, com base no erro total admissível, desvio padrão ou coeficiente de variação e *bias* aceitável incorporando o critério 6-Sigma (Westgard JO, 2008).

### 1.6.5 Aceitabilidade do Método utilizando a Ferramenta 6-Sigma

A validação de um método envolve estudos, que geram muitos dados, que são tratados estatisticamente, fornecendo mais dados e gráficos, que são muitas vezes difíceis de interpretar e de chegar a uma conclusão definitiva sobre o desempenho do método. Uma forma simples é usar os dados estatísticos recolhidos (*CV*, *bias*) durante o estudo, mais o critério de qualidade previamente estabelecido (*ETa*) para o método, e usar no cálculo da métrica sigma. Assim, podemos avaliar o desempenho do método na escala seis sigma, através da elaboração gráfica da carta de decisão do método ou pela seguinte equação:

$$\text{Métrica Sigma} = (ETa - bias) / CV$$

Um método com desempenho 5 sigma ou superior, pode ser facilmente monitorizado pelo Controlo da Qualidade (CQ) para detectar erros clinicamente importantes, apresenta baixo risco de produzir resultados errados, que podem causar danos para os pacientes.

Um procedimento analítico, com desempenho entre os 4 e 5 sigma, apresenta maior risco para fornecer resultados errados, mas, quando gerido adequadamente, com regras de controlo da qualidade mais exigentes e seguindo as orientações do fabricante, consegue fornecer resultados com qualidade. Já um método com desempenho inferior a 4 sigma apresenta alto risco para produzir resultados errados clinicamente significantes, difíceis de controlar na rotina, sendo o ideal tentar melhorar o desempenho do método ou até mesmo substituir por um método capaz de fornecer resultados com a qualidade pretendida ([www.westgard.com](http://www.westgard.com), 2009; Coskun A, 2010).

## 1.7 Objectivos

O objectivo deste estudo é a implementação do método de imunoensaio para a determinação da HbA1c na rotina laboratorial. Este trabalho consiste na avaliação do desempenho de um método de imunoensaio para a determinação da HbA1c em comparação com o método de HPLC já existente no laboratório.

A avaliação do desempenho consistiu na determinação dos critérios exigidos pela CLIA para validação de métodos *Non-Waived*, visto que o método de imunoensaio foi aprovado pela FDA a 13/02/2007 e classificado pela CLIA como um método *Non-Waived* e no cálculo da métrica sigma para os critérios da qualidade estabelecidos em 2011 definidos pelo CAP, NGSP e critério clínico.

## **Capítulo II - Procedimento Experimental**

A parte prática deste trabalho decorreu no Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Póvoa de Varzim - Vila do Conde, onde estão inseridos os equipamentos usados neste estudo. Os métodos usados por estes equipamentos para a determinação da HbA1c são certificados pelo NGSP, rastreáveis à referência do DCCT e calibrados de acordo com a padronização do IFCC.

Os métodos foram devidamente calibrados e controlados de forma a monitorizar o desempenho dos mesmos, para que os resultados obtidos estivessem dentro do controlo estatístico. De salientar que foram realizadas as manutenções necessárias para o bom funcionamento dos equipamentos.

Foram estabelecidos procedimentos e metodologias para a validação do método de imunoensaio, de forma a satisfazer os requisitos exigidos pela NP EN ISO 15189. Por fim, reuniu-se toda a informação recolhida, bem como a descrição do trabalho efectuado, apresentação de resultados e respectivo tratamento que permitiram as conclusões deste estudo.

### **2. Material e Métodos**

#### **2.1 Método de HPLC**

Segundo a bula da A. Menarini Diagnostics<sup>®</sup> (Firenze, Itália), a amostra de sangue total é hemolisada pelo analisador automático com adição de um tampão tetrafosfato pH 6.0, depois é transferida para a coluna passando por um pré-filtro para remover impurezas e restos celulares do hemolisado. Na coluna, as fracções são separadas por interacções electrostáticas com o gel da coluna, que é constituído por “pérolas” de copolímeros de ácido metacrílico e éster de metacrilato e com adição de três fosfatos pela seguinte ordem: A, C, B e A novamente.

O eluente A elui as fracções da Hb com uma carga inferior à da HbA0, o eluente B elui a HbS e HbC numa fracção única e o eluente C elui a HbA0 e a HbA2 numa fracção única. A sequência das fracções eluidas é a seguinte: HbA1a, HbA1b, HbA1c, HbA0, HbS e HbC, que são medidas por um fotómetro a uma absorvância principal de 415 nm, tendo como referência os 500 nm, sendo depois os dados processados e expressos em percentagem.

### **2.1.1 Equipamento**

ADAMS A1c HA – 8160 (ARKRAY®, Kyoto, Japan) é um analisador automático para a determinação da HbA1c e outras hemoglobinas em que o princípio de medição é a cromatografia de troca catiónica em fase invertida e o método de detecção é colorimetria. São necessários apenas 4µl de amostra de sangue colhida em EDTA que é hemolisada automaticamente pelo aparelho. A medição de uma amostra dura 2,9 minutos e é capaz de executar 100 medições contínuas.

### **2.1.2 Reagentes**

- Eluente A
- Eluente B
- Eluente C
- Eluente D

### **2.1.3 Calibradores e controlos**

- *HbA1c Calibrator 1*
- *HbA1c Calibrator 2*
- *Glyco Hb Control Level I (Glyco I)* – controlo liofilizado cuja concentração se encontra no intervalo normal ou no limiar normal - patológico. O valor alvo é de 6,0% HbA1c e o intervalo de referência vai de 5% a 7%.

- *Glyco Hb Control Level II* (Glyco II) - controlo liofilizado cuja concentração se encontra normalmente no intervalo patológico. O valor alvo é de 11,3% HbA1c e o intervalo de referência vai de 10,3% a 12,3%.

## 2.2 Método de Imunoensaio

De acordo com a bula fornecida pela Roche Diagnostics® (Mannheim, Alemanha), a amostra de sangue total anticoagulada é hemolisada automaticamente no analisador Cobas Integra 400®*plus* com o reagente *Hemolyzing Gen.2*. Este reagente contém um detergente para eliminar a interferência dos leucócitos (sem lisar os leucócitos). Não é necessário proceder ao pré-tratamento da amostra para remover a HbA1c lábil.

Todas as variantes de hemoglobina que são glicadas no terminal-N da cadeia beta e que apresentam regiões reconhecíveis por anticorpos idênticas às da HbA1c são determinadas com este ensaio. A determinação da HbA1c baseia-se no imunoensaio de inibição turbidimétrica de sangue total hemolisado.

A HbA1c da amostra reage com o anticorpo anti-HbA1c presente no reagente 1 (R1) e forma complexos antigénio-anticorpo solúveis. Esta reacção só acontece uma vez, visto que o local do anticorpo HbA1c específico só está presente uma vez na molécula de HbA1c.

Os polihaptenos (R2) reagem com o excesso de anticorpos anti-HbA1c, formando um complexo anticorpo-polihapteno insolúvel, que pode ser determinado turbidimetricamente.

A hemoglobina libertada na amostra hemolisada é convertida num derivado com um espectro de absorvância característico. Este espectro é medido bicromaticamente durante a fase de pré-incubação (amostra mais R1) da reacção imunológica descrita anteriormente. Por isso, não é necessária a utilização de um reagente Hgb adicional. O resultado final é expresso sob a forma de percentagem de HbA1c e é calculado a partir do rácio de HbA1c/Hgb da seguinte forma:

- De acordo com o IFCC:  $\text{HbA1c (\%)} = (\text{HbA1c/Hgb}) \times 100$
- De acordo com o DCCT/NGSP:  $\text{HbA1c (\%)} = (\text{HbA1c/Hgb}) \times 87,6 \times 2,27$

### 2.2.1 Equipamento

O Cobas Integra 400<sup>®</sup>*plus* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) é um sistema integrado avançado para testes de química clínica e diagnóstico, constituído por três sistemas de medição separados, que suportam quatro princípios de medição: polarimetria de fluorescência, fotometria de absorvância, turbidimetria e potenciometria selectiva de iões.

### 2.2.2 Reagentes

- *Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.2 – Whole Blood Application* constituído por dois reagentes: R1 - Reagente de anticorpos e R2 – Reagente de polihapteno.
- *Hemolyzing Reagent Gen.2.*

### 2.2.3 Calibrador e Controlos

- *Calibrator for automated systems (C.f.a.s) HbA1c.*
- *HbA1c Control N (HBCN)* – controlo liofilizado cuja concentração se encontra no intervalo normal ou no limiar normal - patológico. O valor alvo é de 5,81% HbA1c e o intervalo de referência vai de 4,76 % a 6,86 %.
- *HbA1c Control P (HBCP)* - controlo liofilizado cuja concentração se encontra normalmente no intervalo patológico. O valor alvo é de 12,2 % HbA1c e o intervalo de referência vai de 10,1% a 14,3%.

#### 2.2.4 Interferências

- Icterícia: Nenhuma interferência significativa até ao índice I de 60.
- Lipemia: Nenhuma interferência significativa até ao índice L de 500.
- Glicemia: Sem interferência significativa até um nível de glicose de 1000 mg/dl.

#### 2.3 Amostras

As amostras de sangue foram obtidas por punção venosa, para um tubo de hemograma que contém anticoagulante EDTA, e foram conservadas a 2-8°C durante 4 a 5 dias. Verificou-se que as amostras seleccionadas apresentavam índices de icterícia, lipemia e valores de glicose inferiores aos descritos como interferentes no método de imunoensaio.

#### 2.4 Metodologia para a Validação do Método

Segundo o CLIA, o laboratório deve verificar a linearidade, precisão, exactidão e valores de referência dos métodos *Non-Waived*. No caso da HbA1c, não é necessária a verificação dos valores de referência, visto que estes não são usados, dando lugar aos valores críticos de decisão médica que são conhecidos internacionalmente (Westgard JO, 2010b).

Por este motivo, neste estudo foram realizadas três experiências segundo os protocolos CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): *EP6 – P2 Evaluation of Linearity of Quantitative Analytical Methods* para determinação da gama de trabalho; *EP5-A Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices* para a determinação do coeficiente de variação; e *EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples* para determinação do *bias*.

As experiências de linearidade e precisão foram realizadas nos dois equipamentos, visto não haver dados de CQI e verificação da gama de trabalho,

arquivados sobre o método de HPLC, que, embora seja considerado método de referência, é necessário a comprovação do bom desempenho, para ser utilizado como método de comparação, e foram realizados três CQE neste equipamento, durante o estudo, para a determinação do *bias*.

A estimativa do *bias* do método a validar foi calculada por comparação com o método de referência, utilizando amostras de pacientes.

Por fim, o desempenho do método de imunoenensaio foi avaliado segundo a metodologia 6-sigma utilizando os dados obtidos nas experiências para os critérios definidos pelo NGSP e CAP para 2011.

#### 2.4.1 Determinação da Linearidade e Gama de Trabalho

Para avaliação da linearidade e para estabelecer a gama de trabalho do método, utilizaram-se inicialmente cinco concentrações (requisito mínimo exigido pelo EP6-P2) e verificou-se ser insuficiente para descrever a linearidade do método, tornando-se necessário aumentar o número de concentrações para sete.

Assim, na primeira avaliação da linearidade, foram seleccionadas duas amostras: uma amostra com concentração de 5,1% HbA1c, que foi identificada por (D1), e outra amostra com concentração de 14,9% HbA1c (D5). A partir destas amostras foram preparadas diluições, de forma a obter concentrações intermédias procedendo-se da seguinte forma:

- 600  $\mu$ l de **D1** e 200  $\mu$ l de **D5** obtendo-se **D2** (3 partes de **D1** mais 1 parte de **D5**)
- 400  $\mu$ l de **D1** e 400  $\mu$ l de **D5** obtendo-se **D3** (2 partes de **D1** mais 2 partes de **D5**)
- 200  $\mu$ l de **D1** e 600  $\mu$ l de **D5** obtendo-se **D4** (1 parte de **D1** mais 3 partes de **D5**)

De seguida, calculou-se a concentração de cada diluição através da seguinte equação:

$$\text{Concentração} = (C_1 \times V_1 + C_2 \times V_2) / (V_1 + V_2)$$

Em que, a concentração de D1 é C1 e o volume da parte de D1 é V1; e a concentração de D7 é C7 e o volume da parte de C7 é V7. Assim, a concentração de D2=7,5%, D3=10,0% e D4=12,4%.

Analisaram-se as diluições de D1 a D5 em duplicado, de forma a obter um valor médio.

Na segunda avaliação da linearidade, foi escolhida uma amostra com concentração de 5,4% HbA1c (D1) e outra amostra com concentração de 9,5% HbA1c (D7). A partir destas amostras, foram preparadas diluições, procedendo-se da seguinte forma:

- 640  $\mu$ l de **D1** e 160  $\mu$ l de **D7** obtendo-se **D2** (4 partes de **D1** mais 1 parte de **D7**)
- 600  $\mu$ l de **D1** e 200  $\mu$ l de **D7** obtendo-se **D3** (3 partes de **D1** mais 1 parte de **D7**)
- 480  $\mu$ l de **D1** e 320  $\mu$ l de **D7** obtendo-se **D4** (3 partes de **D1** mais 2 partes de **D7**)
- 400  $\mu$ l de **D1** e 400  $\mu$ l de **D7** obtendo-se **D5** (2 partes de **D1** mais 2 partes de **D7**)
- 200  $\mu$ l de **D1** e 600  $\mu$ l de **D7** obtendo-se **D6** (1 parte de **D1** mais 3 partes de **D7**)

Através da equação anterior, calcularam-se os valores das diluições, obtendo-se os seguintes resultados: D2=6,2%, D3=6,4%, D4=7,0%, D5=7,5%, D6=8,5%. Analisaram-se as diluições em duplicado em ambos equipamentos. A sequência analítica foi aleatória em ambas situações para detectar a presença significativa de *carry-over*. Os dados foram registados numa folha de trabalho elaborada para esse fim (EP6-P2, 2002; Westgard JO, 2008).

#### **2.4.2 Determinação da Precisão**

O estudo da precisão foi realizado nos dois equipamentos, teve a duração de 20 dias e foram utilizados dois controlos de níveis diferentes, fornecidos pelas respectivas casas comerciais. Assim, na avaliação da precisão do método de imunoensaio foram analisados os controlos HBCN e HBCP com valores alvo de 5,81% HbA1c e 12,2% HbA1c. E, para o método de HPLC, foram analisados os controlos Glyco I e Glyco II com valores alvo de 6,0% HbA1c e 11,3% HbA1c.

Analisaram-se os controlos em duplicado, numa única corrida, e registaram-se os dados numa folha de trabalho (EP5-A, 1999).

#### **2.4.3 Determinação da Exactidão**

O estudo da exactidão teve a duração de 20 dias e processaram-se 101 amostras. A selecção das amostras foi feita com base no protocolo do NGSP para a comparação de métodos: 20% das amostras possuem valores de HbA1c no intervalo de 4,0-5,5%, 30% das amostras no intervalo de 5,5-7,0%, 30% amostras no intervalo de 7,0-8,5% e 20% amostras no intervalo de 8,5-10% ([www.ngsp.com](http://www.ngsp.com), 2011). A determinação da HbA1c nas amostras foi realizada, primeiro, pelo método de HPLC e, depois, pelo método de imunoensaio, em que o intervalo entre as duas determinações não excedeu as duas horas. Segundo o documento EP9-A2, as determinações das amostras devem ser realizadas em duplicado. Porque a concretização desta situação seria dispendiosa para o serviço optou-se por efectuar apenas uma determinação de cada amostra.

#### **2.4.4 Avaliação do Desempenho do Método**

A elaboração da carta de decisão, segundo a metodologia 6 sigma, é uma forma simples de julgar o método, com base nos requisitos de qualidade definidos. Elaboraram-se dois gráficos: um para o critério definido pelo NGSP ( $ETa = 10\%$ ) e outro para o critério do CAP ( $ETa = 7\%$ ). Neles, no eixo do YY, temos a “exactidão” aceite (*bias* em %), a escala vai de 0 até ao nível do requisito de qualidade estabelecido (%); no eixo do XX, temos a “precisão” aceite (CV%) e a escala vai de 0 a 5%. De seguida, são desenhadas linhas que têm origem no requisito estabelecido (eixo yy) e destino no (eixo xx), isto é, 2-sigma ( $ETa / 2DS$ ); 3-Sigma ( $ETa / 3DS$ ); 4-Sigma ( $ETa / 4DS$ ); 5-sigma ( $ETa / 5DS$ ) e 6-sigma ( $ETa / 6DS$ ). Depois, coloca-se, no eixo do yy, o *bias*% obtido na determinação da exactidão e, no eixo do xx, o respectivo CV% obtido na determinação da precisão, traçam-se linhas de forma que se encontrem no gráfico e temos o ponto operativo. E, por fim,

julgou-se o método com a base na localização do ponto operativo (Westgard JO, 2008).

## 2.5 Análise Estatística dos Dados

A análise estatística dos dados foi efectuada usando o *Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Corporation) Software*.

### 2.5.1 Determinação da linearidade

A linearidade foi avaliada através da regressão polinomial de primeiro e segundo grau, utilizando as expressões abaixo referidas, em que também foram calculados os respectivos desvios padrões: desvio-padrão da ordenada na origem ( $s_{m0}$ ), desvio-padrão do declive do polinómio de primeiro grau ( $s_{m1}$ ), desvio-padrão do polinómio de segundo grau ( $s_{m2}$ ), desvio-padrão residual do polinómio de primeiro grau ( $s_{xy}$ ) e desvio-padrão residual do polinómio de segundo grau ( $s_{y2}$ ).

Polinómio de primeiro grau:  $y = m_0 + m_1 x$

Polinómio de segundo grau:  $y = m_0 + m_1 x + m_2 x^2$

Em que:

$y$  - valor da concentração dada pelo equipamento

$x$  - valor da concentração do polinómio de primeiro grau

$m_0$  - ordenada na origem

$m_1$  - declive

$m_2$  - declive do polinómio de segundo grau

$x^2$  - valor da concentração do polinómio de segundo grau

Depois, calculou-se a diferença das variâncias ( $Ds^2$ ) através da seguinte equação:

$$Ds^2 = (N - 2)s_{x/y}^2 - (N - 3)s_{y^2}^2$$

Em que  $N$  é o número de diluições.

Depois de obtido o valor de  $Ds^2$ , procedeu-se ao cálculo do teste  $F$ , segundo a seguinte equação:

$$F = \frac{Ds^2}{s_{y^2}^2}$$

Se o valor de  $F$  calculado for inferior ao  $F$  tabelado, então considera-se que não existe diferença significativa entre os dois polinómios, e podemos concluir que existe linearidade para o conjunto de valores. Caso não se verifique a linearidade para o conjunto de valores, devem-se avaliar as possíveis causas e eliminá-las para repetir o estudo. Se o comportamento não linear dos valores se mantiver, deve-se reduzir a gama de trabalho por eliminação de um (ou mais) dos valores extremos até o teste indicar linearidade.

### 2.5.2 Determinação da Precisão

A avaliação da precisão foi realizada segundo o protocolo CLSI EP5-A, que consiste na determinação da precisão total, através do cálculo das várias componentes que afectam a variabilidade de um método, durante um longo período de tempo. Essas componentes são: precisão intra-corrída (dentro da corrida – *within-run*), precisão inter-corrída (entre corridas – *between-run*), precisão inter-dia (entre os dias – *between-day*), sendo a precisão intra-corrída (repetibilidade) e a total (reprodutibilidade) consideradas as mais importantes no estudo da precisão de um método.

Como, neste estudo, se optou por uma única corrida dos controlos em duplicado apenas foi possível calcular-se a precisão intra-corrída e precisão total de acordo

com o apêndice C do referido protocolo, em que os cálculos foram realizados separadamente para cada concentração.

As equações utilizadas foram as seguintes:

Para a determinação do desvio padrão intra-ensaio ( $DP_{wr}$ ):

$$DP_{wr} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (xi_1 - xi_2)^2}{2I}}$$

Em que:

$I$  - número total de dias

$xi_1$  - primeiro resultado no dia  $i$

$xi_2$  - segundo resultado no dia  $i$

Para a determinação do desvio padrão total do método procedeu-se ainda ao cálculo do desvio padrão da média diária ( $DP_{md}$ ) através da seguinte equação:

$$DP_{md} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\bar{x}_i - \bar{x} \dots)^2}{I - 1}}$$

Em que:

$I$  - número total de dias

$\bar{x}_i$  - média dos resultados do dia  $i$

$\bar{x} \dots$  - média de todos os resultados ao longo dos dias

Obtidos os valores das equações anteriores, calculou-se a precisão total:

$$DP_T = \sqrt{DP_{md}^2 + \frac{N-1}{N} \times DP_{wr}^2}$$

Em que:

$N$  - nº de duplicados por corrida

$DP_{wr}^2$  - estimativa da variância intra-ensaio

$DP_{md}^2$  - estimativa da variância média diária

Os valores da precisão total para cada nível de concentração foram comparados relativamente a cada método, para avaliar se existiam diferenças estatisticamente significativas nos valores da precisão total entre concentrações. Sendo necessário o cálculo do número de graus de liberdade (*g.l.*) para cada nível de concentração, utiliza-se a seguinte fórmula:

$$g.l. = \frac{((N-1) \times ME + MD)^2}{\frac{(N-1)ME^2}{I} + \frac{MD^2}{I-1}}$$

Em que:

$ME - DP_{wr}^2$

$MD - N \times DP_{md}^2$

$I$  - número de dias

$N$  - número de duplicados por corrida

Depois de obtido o número de g.l. para cada concentração, procedeu-se ao cálculo do teste  $F$ , em que a variância maior fica no numerador e a menor no denominador. O valor do  $F$  calculado é comparado com o  $F$  tabelado para  $n-1$  graus de liberdade para o numerador e denominador para um nível de confiança de 95%.

$$F = \frac{DT_1^2}{DT_2^2}$$

Se o valor de  $F$  calculado for menor que o  $F$  tabelado, então pode-se considerar que não existem diferenças significativas entre as duas precisões e pode calcular-se uma precisão total para o método através da seguinte fórmula:

$$DP_T = \sqrt{\frac{(DT_1^2 \times g.l._1) + (DT_2^2 \times g.l._2)}{g.l._1 + g.l._2}}$$

De seguida, deve calcular-se o coeficiente de variação para cada concentração, utilizando o desvio da precisão total obtido pela equação anterior.

Se o valor do  $F$  calculado for maior que o  $F$  tabelado, então existem diferenças significativas entre as duas precisões, não podendo ser calculado o desvio padrão total para o método.

### **Comparação da precisão entre métodos**

Para avaliar se dois métodos têm diferenças significativas entre si, devemos proceder ao teste  $F$ , através do cálculo da razão entre as variâncias dos dois métodos ( $SA_1$  e  $SB_1$ ) para cada concentração.

$$F = \frac{SA_1}{SB_1} \text{ em que } SA_1 > SB_1$$

O valor de  $F$  calculado é comparado com o  $F$  tabelado para  $n-1$  graus de liberdade para o numerador e para o denominador para um nível de confiança de 95%. Se o valor de  $F$  calculado for menor do que  $F$  tabelado, então considera-se que não existem diferenças significativas entre os métodos. Se o valor de  $F$  calculado for maior do que o  $F$  tabelado, então podemos considerar que existem diferenças significativas entre os métodos.

### 2.5.3 Determinação da Exactidão

Os resultados obtidos pelos dois métodos foram analisados para identificar possíveis valores aberrantes, procedendo-se da seguinte forma:

Calcularam-se as diferenças absolutas ( $E_i$ ) entre os resultados de ambos os métodos ( $x_i, y_i$ ) e sua média ( $E_m$ ):

$$E_i = |y_i - x_i|$$

$$E_m = \frac{1}{n} \sum_1^N E_i$$

Em que:

$i$  – é o nº de amostra

$n$  – o nº total de amostras

Calculou-se o valor limite  $4 \times E_m$ , e comparou-se cada  $E_i$  com este valor limite e marcaram-se os pontos que ultrapassavam esse limite.

De seguida, calcularam-se as diferenças absolutas relativas ( $ER_i$ ) entre os resultados de ambos os métodos e a sua média ( $ER_m$ ):

$$ER_i = \frac{|y_i - x_i|}{(y_i + x_i)/2}$$

$$ER_m = \frac{1}{n} \sum_1^N ER_i$$

Procedeu-se ao cálculo do valor limite relativo  $4 \times ER_m$ , e comparou-se esse valor com cada  $ER_i$  e marcaram-se todos os pontos que o excediam. Os pares de resultados que excederam ambos os limites, foram considerados valores aberrantes e foram eliminados (Morillo ME et al.,2010).

### **Teste $t$ para Amostras Emparelhadas**

Procedeu-se inicialmente ao teste  $t$  para amostras emparelhadas, para avaliar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os dois métodos. Este método é aconselhado quando se compara amostras de materiais com valores de concentração muito diferente. Calculou-se a diferença entre cada par de valores obtidos pelos dois métodos, mantendo o sinal algébrico ( $x_i - y_i$ ), em seguida a média das diferenças ou *bias* tendo em conta o sinal algébrico ( $\bar{d}$ ) e o desvio padrão das diferenças ( $Sd$ ).

O valor de  $t$  é calculado pela equação seguinte:

$$t = \frac{\bar{d}}{Sd \times \sqrt{1/N}}$$

Compara-se o valor de  $t$  com o valor de  $t$  tabelado para um nível de confiança 95 % e para  $n-1$  graus de liberdade. Se o valor  $t$  calculado for menor do que o  $t$  tabelado, então não existem diferenças para o conjunto de amostras e a presença de um erro sistemático não é estatisticamente significativa. Se o valor de  $t$  calculado for maior que  $t$  tabelado, então existem diferenças entre os dois conjuntos de amostras e a presença de erro sistemático é estatisticamente significativo.

## Regressão Linear

O teste de regressão linear permite avaliar a concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos, através da seguinte equação:

$$y = m_0 + m_1x$$

Em que:

$m_0$  – ordenada na origem

$m_1$  – declive

$x$  – os valores do método de referência

$y$  – os valores do método a avaliar

Calculou-se o coeficiente de correlação ( $r$ ) e, se  $r$  for maior ou igual a 0,975, o intervalo de valores pode ser considerado adequado e pode utilizar-se a regressão linear para calcular a ordenada na origem e o declive. Se  $r$  for menor que 0,975, é necessário obter mais dados de forma a aumentar o intervalo de valores (Morillo ME et al.,2010).

De seguida, examinaram-se os valores de declive e ordenada na origem para um intervalo de confiança de 95%. Se o intervalo de confiança associado à ordenada na origem,  $m_0 \pm s_{m0} \times t$ , contiver o valor zero e se o intervalo de confiança associado ao declive,  $m_1 \pm s_{m1} \times t$ , contiver o valor um, então pode concluir-se que o método a avaliar proporciona valores que não são significativamente diferentes do método de referência.

No caso do intervalo associado à origem não contiver o valor zero, então o método a avaliar apresenta um erro sistemático constante.

Mas, se o intervalo associado ao declive não contiver o valor um, então o método a avaliar apresenta um erro sistemático proporcional.

O erro sistemático ou *bias* para os níveis críticos de decisão médica pode ser calculado pela seguinte equação:

$$B_c = m_0 + (m_1 - 1) \times X_c$$

Em que:

$B_c$  – bias crítico

$X_c$  – nível crítico de decisão médica

## Capítulo III - Apresentação e Discussão dos Resultados

### 3.1. Resultados do Estudo da Linearidade

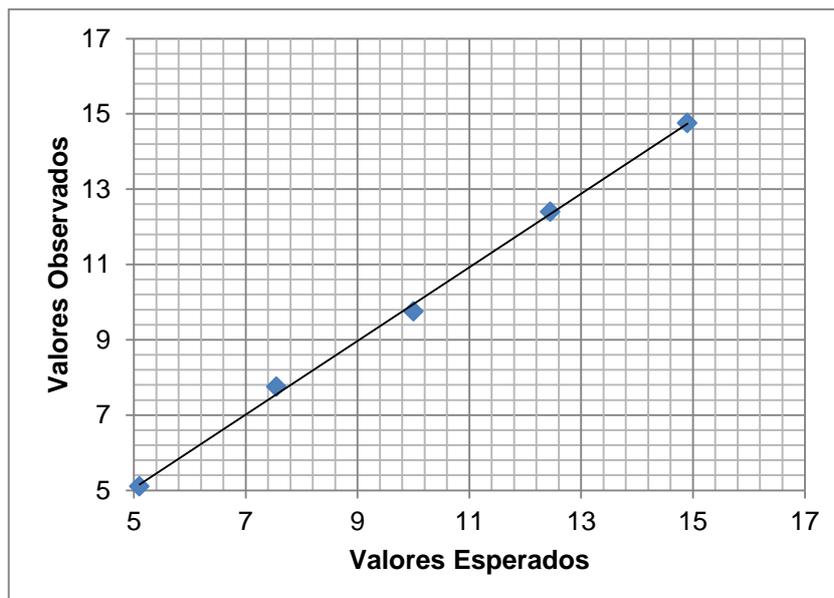
O estudo da linearidade foi realizado em duas fases: numa primeira fase do estudo, optou-se por verificar a linearidade em cinco pontos da curva de calibração para ambos os métodos e, como se verificou existir pouca credibilidade estatística para o método de imunoensaio, optou-se, numa segunda fase, por aumentar o número de pontos de cinco para sete, na tentativa de confirmar a linearidade do método.

#### 3.1.1 Método HPLC

A linearidade do método de HPLC foi estudada no intervalo 5,1% a 14,9%. Na Tabela 1, são apresentados os valores esperados para as diferentes concentrações e resultados obtidos. A análise do Gráfico 1 demonstra uma grande proximidade dos valores com a recta de regressão, o que permite prever linearidade para o intervalo de valores.

**Tabela 1: Dados e resultados obtidos no estudo da linearidade do método HPLC.**

	Valores Esperados	1º Resultado	2º Resultado	Média
D1	5,1	5,1	5,1	5,10
D2	7,5	7,8	7,7	7,75
D3	10,0	9,8	9,7	9,75
D4	12,4	12,4	12,4	12,40
D5	14,9	14,8	14,7	14,75



**Gráfico 1: Gráfico de dispersão - valores esperados versus valores observados do estudo de linearidade do método de HPLC.**

Contudo, é necessário o tratamento estatístico dos dados para comprovar a linearidade do método. Tal como referido no ponto 2.5.1, procedeu-se à regressão polinomial de primeiro e segundo grau, e ao teste  $F$ , em que o  $F$  calculado é comparado com o valor tabelado da distribuição  $F$  de Snedecor / Fischer para  $n - 3$  graus de liberdade. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 2: Resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste  $F$  do estudo de linearidade do método de HPLC.**

Função Linear ( $y = m_0 + m_1x$ )				Função Quadrática ( $y = m_0 + m_1x + m_2x^2$ )			
$m_0$	0,17	$s_{m0}$	0,22	$m_0$	0,22	$s_{m0}$	0,85
$m_1$	0,977	$s_{m1}$	0,221	$m_1$	0,96	$s_{m1}$	0,96
				$m_2$	0,0005	$s_{m2}$	0,009
$s_{y/x}$	0,16			$s_{y/x}$	0,20		
$r^2$	0,99			$r^2$	0,99		
$g.l.$	3			$g.l.$	2		
$F$ calculado = 0,0042							
$F$ tabelado = 18,5							

Como o valor de  $F$  calculado é menor que o  $F$  tabelado, pode considerar-se que não existem diferenças significativas e podemos afirmar que existe linearidade para o conjunto de valores e que a gama de trabalho é de 5,1% - 14,9% HbA1c. Contudo, o número de pares de valores analisados ( $n = 5$ ) é pequeno, fazendo com que o valor de  $F$  tabelado seja relativamente elevado, no entanto, o valor de  $F$  calculado é tão pequeno que manter-se-á a mesma decisão de linearidade.

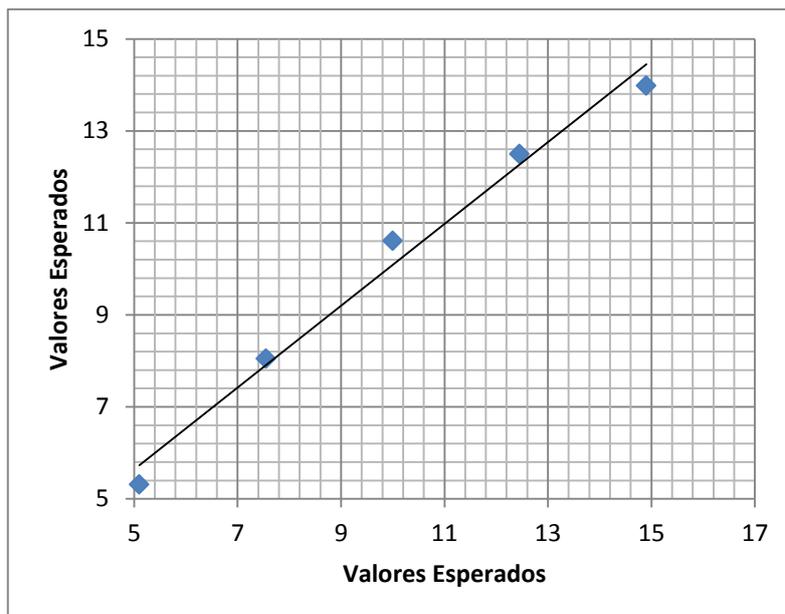
### 3.1.2. Método Imunoensaio

#### 1º Estudo

A linearidade do método de imunoensaio também foi estudada no intervalo 5,1% a 14,9%. Na Tabela 3, são apresentados os valores esperados para as diferentes concentrações e resultados obtidos.

**Tabela 3: Dados e resultados obtidos no estudo da linearidade do método de imunoensaio.**

	Valores Esperados	1º Resultado	2º Resultado	Média
<b>D1</b>	5,1	5,24	5,38	5,31
<b>D2</b>	7,5	7,93	8,16	8,05
<b>D3</b>	10,0	10,46	10,75	10,61
<b>D4</b>	12,4	12,63	12,36	12,50
<b>D5</b>	14,9	13,99	13,97	13,98



**Gráfico 2: Gráfico de dispersão - valores esperados versus valores observados do estudo de linearidade do método de imunoenensaio.**

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a regressão polinomial de primeiro e segundo grau e teste  $F$ .

**Tabela 4: Resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste  $F$  do estudo de linearidade do método de imunoenensaio.**

Função Linear ( $y = m_0 + m_1x$ )				Função Quadrática ( $y = m_0 + m_1x + m_2x^2$ )			
$m_0$	1,19	$s_{m0}$	0,67	$m_0$	- 2,12	$s_{m0}$	0,34
$m_1$	0,88	$s_{m1}$	0,06	$m_1$	1,64	$s_{m1}$	0,07
				$m_2$	- 0,037	$s_{m2}$	0,003
$s_{y/x}$	0,49			$s_{y/x}$	0,08		
$r^2$	0,98			$r^2$	0,99		
<b>g.l.</b>	<b>3</b>			<b>g.l.</b>	<b>2</b>		
<b><math>F</math> calculado = 106,01</b>							
<b><math>F</math> tabelado = 18,5</b>							

Como  $F$  calculado é maior que o  $F$  tabelado, existem diferenças significativas e por este motivo, optou-se por reduzir a gama de trabalho, isto é, eliminando um dos pontos extremos (D5), e proceder a uma nova análise estatística. Desta forma, obtivemos os resultados expressos na seguinte tabela:

**Tabela 5: Novos resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste  $F$ , após eliminação de D5 do estudo de linearidade do método de imunoensaio.**

Função Linear ( $y = m_0 + m_1x$ )				Função Quadrática ( $y = m_0 + m_1x + m_2x^2$ )			
$m_0$	0,47	$s_{m0}$	0,518	$m_0$	- 1,96	$s_{m0}$	0,66
$m_1$	0,98	$s_{m1}$	0,056	$m_1$	1,60	$s_{m1}$	0,16
				$m_2$	- 0,035	$s_{m2}$	- 0,03
$s_{y/x}$	0,308			$s_{y/x}$	0,11		
$r^2$	0,99			$r^2$	0,99		
<b>g.l.</b>	2			<b>g.l.</b>	1		
<b><math>F</math> calculado = 14,57</b>							
<b><math>F</math> tabelado = 161,4</b>							

Como  $F$  calculado é menor que o  $F$  tabelado considera-se que não existem diferenças significativas, mas o valor de  $F$  tabelado é muito alto (devido à eliminação de um par de valores) o que sugere pouca credibilidade em afirmarmos que a recta é linear no intervalo de 5,1% a 12,45%. A solução foi realizar um segundo estudo aumentando o número de diluições de cinco para sete em que o intervalo estudado foi de 5,4% a 9,5 % de HbA1c, os dados obtidos estão expressos na Tabela 6, confirmando-se a existência de linearidade nesta gama de trabalho.

## 2º Estudo

Tabela 6: Dados e resultados obtidos no segundo estudo da linearidade do método de imunoenensaio.

	Valores Esperados	1º Resultado	2º Resultado	Média
D1	5,4	5,69	5,31	5,50
D2	6,2	5,96	6,28	6,12
D3	6,4	6,40	6,67	6,54
D4	7,0	7,34	8,2	7,77
D5	7,5	7,97	7,9	7,94
D6	8,5	8,21	8,78	8,50
D7	9,5	9,72	9,44	9,58

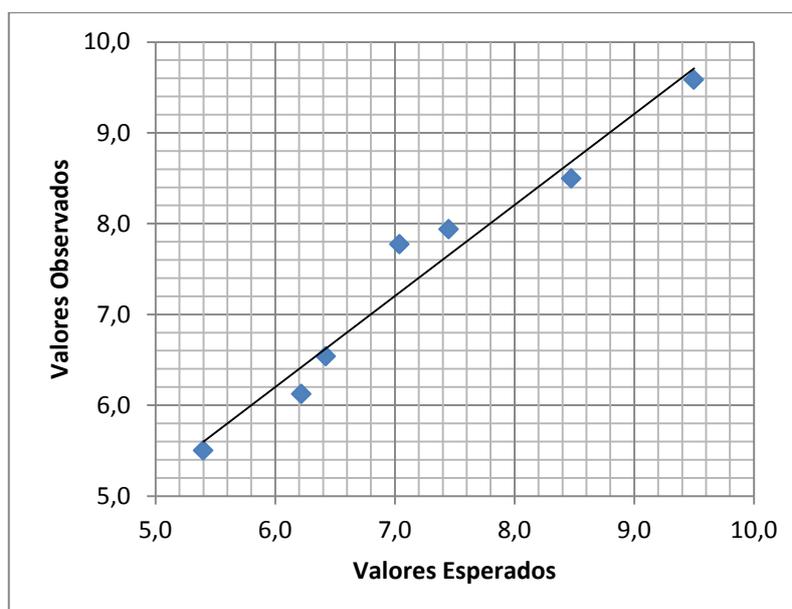


Gráfico 3: Gráfico de dispersão - valores esperados *versus* valores observados no segundo estudo de linearidade do método de imunoenensaio.

Procedeu-se à regressão polinomial de primeiro e segundo grau e ao teste  $F$ , cujos resultados estão expressos na Tabela 7.

**Tabela 7: Resultados obtidos da regressão polinomial de 1º e 2º grau e teste  $F$  no segundo estudo de linearidade do método de imunoensaio.**

Função Linear ( $y = m_0 + m_1x$ )				Função Quadrática ( $y = m_0 + m_1x + m_2x^2$ )			
$m_0$	0,18	$s_{m0}$	0,68	$m_0$	- 4,54	$s_{m0}$	3,92
$m_1$	1,00	$s_{m1}$	0,09	$m_1$	2,30	$s_{m1}$	1,06
				$m_2$	- 0,08	$s_{m2}$	0,07
$s_{y/x}$	0,32			$s_{y/x}$	0,30		
$r^2$	0,95			$r^2$	0,96		
$g.l.$	5			$g.l.$	4		
$F$ calculado = 1,50							
$F$ tabelado = 7,70							

Como o  $F$  calculado é menor que o  $F$  tabelado, considera-se que não existem diferenças significativas e podemos afirmar que existe linearidade para o conjunto de valores e a gama de trabalho para este método será de 5,4% - 9,5% HbA1c. Tendo sido feito o mesmo estudo para o método de HPLC, que já tinha sido provado a linearidade para o intervalo 5,1% a 14,9% em cinco pontos, também se verificou a linearidade para o intervalo acima referido em 7 pontos ( $F$  calculado = 0,26).

### 3.2 Resultados do Estudo da Precisão

Neste estudo com os dados obtidos, procedeu-se ao cálculo da precisão intra-corrída e precisão total conforme as fórmulas descritas no ponto 2.5.2. Por fim, as precisões totais dos dois métodos para as diferentes concentrações de HbA1c, foram comparadas através do teste estatístico mais adequado para este fim, o teste  $F$ .

### 3.2.1 Método HPLC

Na Tabela 8, estão apresentados os resultados dos dois controles, que foram analisados em duplicado durante vinte dias.

Tabela 8: Dados obtidos no estudo da precisão do método de HPLC em % HbA1c.

Dias	Controlo Glyco I 1º Resultado	Controlo Glyco I 2º Resultado	Controlo Glyco II 1º Resultado	Controlo Glyco II 2º Resultado
14-01-2011	6,0	6,0	11,5	11,3
19-01-2011	5,9	5,8	11,4	11,1
21-01-2011	5,9	5,9	11,4	11,3
26-01-2011	6,1	6,0	11,5	11,5
28-01-2011	6,0	5,9	11,7	11,3
02-02-2011	6,0	6,0	11,5	11,4
04-02-2011	6,0	5,9	10,7	10,6
	-	-	11,3	11,6
09-02-2011	6,0	5,9	11,6	11,4
11-02-2011	6,0	6,0	11,5	11,5
16-02-2011	5,9	6,1	11,5	11,9
18-02-2011	6,0	6,0	11,5	11,5
23-02-2011	6,1	5,8	11,7	11,1
25-02-2011	6,0	5,9	11,5	11,4
02-03-2011	6,0	5,9	11,5	11,4
04-03-2011	6,1	6,1	11,7	11,6
09-03-2011	6,0	5,9	11,6	11,6
23-03-2011	6,0	5,9	11,4	11,3
25-03-2011	6,0	6,0	11,5	11,4
30-03-2011	6,0	6,0	11,5	11,5
14-01-2011	6,0	6,1	11,6	11,4

Os valores da precisão intra-corrida ( $DP_{WR}$ ), precisão total ( $DPT$ ) e respectivos CV para cada concentração estão apresentados na Tabela 9, assim como a comparação de precisões entre concentrações através do teste  $F$ .

**Tabela 9: Resultados obtidos no estudo da precisão do método HPLC.**

<b>Controlo Glyco I</b>		<b>Controlo Glyco II</b>	
<b>Média</b>	5,97	<b>Média</b>	11,47
<b><math>DP_{WR}</math></b>	0,075	<b><math>DP_{WR}</math></b>	0,16
<b><math>DP_{MD}</math></b>	0,057	<b><math>DP_{MD}</math></b>	0,10
<b><math>DPT1</math></b>	0,076	<b><math>DPT2</math></b>	0,15
<b>CV</b>	1,28	<b>CV</b>	1,33
<b>GL</b>	39	<b>GL</b>	39
<b><math>F</math> calculado = 3,98</b>			
<b><math>F</math> tabelado = 1,71</b>			

Como o valor de  $F$  calculado é maior do que  $F$  tabelado, considera-se que existem diferenças significativas entre as duas precisões e não podemos calcular uma precisão total para os dois níveis.

### 3.2.2 Método Imunoensaio

Na Tabela 10, estão apresentados os resultados dos dois controlos, que foram analisados em duplicado durante vinte dias.

Tabela 10: Dados obtidos no estudo da precisão do método de imunoensaio.

Dias	Controlo HBCN 1º Resultado	Controlo HBCN 2º Resultado	Controlo HBCP 1º Resultado	Controlo HBCP 2º Resultado
14-01-2011	5,91	5,74	12,74	12,16
19-01-2011	5,50	5,61	12,12	12,34
21-01-2011	5,77	5,63	12,29	12,32
26-01-2011	5,58	5,66	12,25	12,24
28-01-2011	5,74	5,76	12,48	12,45
02-02-2011	5,85	5,80	12,49	12,40
04-02-2011	5,85	5,98	12,32	12,61
09-02-2011	5,98	5,98	12,52	12,20
11-02-2011	5,85	5,68	12,51	12,25
16-02-2011	5,57	5,92	12,41	12,46
18-02-2011	5,72	5,66	12,26	12,47
23-02-2011	5,45	6,00	12,47	12,62
25-02-2011	5,83	5,84	12,48	12,50
02-03-2011	5,90	6,12	12,51	12,58
04-03-2011	5,75	5,89	12,49	12,47
09-03-2011	5,94	5,99	12,52	12,50
23-03-2011	5,51	5,51	12,51	12,44
25-03-2011	5,63	5,52	12,24	12,60
30-03-2011	5,54	5,51	12,51	12,50
14-01-2011	5,51	5,53	12,38	12,38

Na Tabela 11, estão apresentados os valores da precisão intra-corrída, precisão total e respectivos coeficientes de variação para cada concentração e também a comparação de precisões entre concentrações através do teste *F*.

**Tabela 11: Resultados obtidos no estudo da precisão do método de imunoenensaio.**

Controlo HBCN		Controlo HBCP	
<b>Média</b>	5,74	<b>Média</b>	12,42
<b>DP<sub>WR</sub></b>	0,125	<b>DP<sub>WR</sub></b>	0,146
<b>DP<sub>MD</sub></b>	0,157	<b>DP<sub>MD</sub></b>	0,153
<b>DPT1</b>	0,180	<b>DPT2</b>	0,137
<b>CV</b>	3,14	<b>CV</b>	1,10
<b>GL</b>	30	<b>GL</b>	38
<b>F calculado = 1,73</b>			
<b>F tabelado = 1,77</b>			

Como o valor de  $F$  calculado é menor do que o de  $F$  tabelado, considera-se que não existem diferenças significativas entre as duas precisões.

No entanto, os trabalhos de precisão e linearidade foram realizados em simultâneo e, por este motivo, o controlo HBCP com valor alvo de 12,2% não devia ter sido escolhido, visto que a linearidade do método recomenda um controlo menor ou igual que 9,5% HbA1c, o que não foi feito por ausência de informação relativa à linearidade.

A avaliação de parâmetros de qualidade (como a homogeneidade de variâncias) é mais importante na gama de concentração, que permite decidir e diferenciar o diagnóstico e realizar alterações importantes no tratamento. É recomendável o estudo de controlos ou conjunto de amostras de referência com valores de HbA1c entre 6,5% e 9% HbA1c (Westgard JO, 2010d).

Caso houvesse linearidade no intervalo de valores atrás mencionado, a precisão total para o método seria de 0,15, o coeficiente de variação (HBCN) seria de 2,74 e o coeficiente de variação (HBCP) seria de 1,26.

### 3.2.3 Comparação da Precisão dos Métodos

Para avaliar se existem diferenças significativas entre os dois métodos em termos de precisão, recorreu-se ao teste  $F$  como referido no ponto 2.5.2, em que seria aconselhável a comparação de  $DPT_1$  e  $DPT_2$  para os dois níveis de concentração apresentados nas Tabelas 9 e 11. No entanto, a comparação das precisões dos dois métodos para valores mais altos de HbA1c não é aplicável, visto que o valor alvo do controlo HBCP utilizado no método de imunoensaio é de 12,2%, valor que ultrapassa o intervalo de linearidade estudado para o método. Se tivesse sido verificada esta condição, obter-se-ia o valor de  $F$  calculado de 1,25 por referência ao valor de  $F$  tabelado de 1,72, e como o valor de  $F$  calculado é menor que o  $F$  tabelado, considerava-se que não existiam diferenças significativas entre os dois métodos para essa gama de concentração.

Contudo, os valores de precisão mais relevantes para este estudo foram os observados nos controlos com níveis mais baixos de HbA1c, pois representam melhor os valores críticos de decisão médica (Westgard JO, 2010c). Como tal, comparou-se a precisão dos dois métodos para valores baixos de HbA1c e obteve-se um valor de  $F$  calculado de 5,61 sendo o valor de  $F$  tabelado de 1,76.

Como o valor de  $F$  calculado é maior do que  $F$  tabelado, considere-se que existem diferenças significativas entre os dois métodos. Este facto, não seria alterado se aplicássemos o valor de precisão total de 0,15 para o método de imunoensaio, valor calculado se houvesse linearidade para o valor alvo de 12,2 em que o valor de  $F$  tabelado de 4,22 sendo o  $F$  tabelado de 1,76. Em qualquer dos casos, verifica-se que não há homogeneidade das variâncias o que significa que a precisão do método de HPLC é melhor do que o método de imunoensaio.

Se um paciente tiver 6,5% de HbA1c e se cada método indicar exactamente este valor, então o resultado do método HPLC deverá ser apresentado como  $6,50 \pm 0,15$  ( $6,50 \pm 1,95 \times DPT1$ ) para garantir que 95% de probabilidade deste intervalo inclui o valor verdadeiro; o resultado do método de imunoensaio deverá ser apresentado como  $6,50 \pm 0,35$  para o mesmo nível de probabilidade. Com estes

resultados torna-se mais insegura a tomada de decisões em relação ao estado do paciente quando se usa o método de imunoensaio do que quando se usa o método de HPLC.

Num paciente com um valor verdadeiro de 7% de HbA1c, pelo método de HPLC, há 95% de probabilidade do valor verdadeiro estar num intervalo entre 6,85 e 7,15% de HbA1c e, pelo método de imunoensaio, há 95% de probabilidades de o valor verdadeiro estar num intervalo entre 6,65 e 7,35% de HbA1c.

De acordo com o requisito de qualidade clínico, um método deve ser capaz de detectar uma alteração de 0,5% de HbA1c, e esta não pode ser consequência da imprecisão do método. Como tal, o método para um valor crítico de 7% de HbA1c deve ter um RCV menor que 7,1%, o que não se verifica para o método de imunoensaio que possui um RCV de 9,1%, em relação ao método de HPLC, que apresenta um RCV de 4,5%.

### **3.3 Resultados do Estudo da Exactidão**

Um dos parâmetros importantes na validação de um método para implementação na rotina de um laboratório consiste na comparação dos resultados obtidos, a partir desse método, com os resultados obtidos pelo método considerado como referência. O objectivo principal é estudar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos, isto é, avaliar a exactidão do novo método relativamente ao de referência e determinação do *bias* para várias concentrações, através da utilização do método de regressão linear. Contudo, procedeu-se inicialmente ao teste *t* para amostras emparelhadas, para avaliar se existiam diferenças significativas entre os métodos. Os resultados das amostras obtidas por ambos os métodos estão expressos na Tabela 12.

Tabela 12: Valores das amostras obtidos pelos dois métodos (% HbA1c).

Amostra	Método HPLC	Método Imuno.	Amostra	Método HPLC	Método Imun.	Amostra	Método HPLC	Método Imuno.
1	7,2	7,04	35	5,4	5,33	69	8,3	8,48
2	5,1	5,20	36	9,4	9,21	70	7,7	7,63
3	6,9	6,89	37	9,4	9,29	71	5,2	5,46
4	7,7	7,99	38	5,6	5,6	72	6,3	6,61
5	6,9	8,52	39	8,1	8,21	73	7,3	7,09
6	6,9	7,11	40	7,0	7,08	74	6,1	6,54
7	5,5	5,66	41	5,9	6,00	75	5,2	5,33
8	9,1	8,84	42	9,0	9,10	76	7,5	7,59
9	5,5	5,55	43	6,5	6,50	77	7,1	7,04
10	7,1	7,14	44	9,1	9,30	78	7,6	7,87
11	7,7	7,92	45	6,3	6,80	79	6,1	6,36
12	7,1	7,22	46	7,5	7,40	80	6,4	6,43
13	5,9	5,89	47	5,4	5,51	81	5,3	5,52
14	7,5	7,66	48	7,0	6,94	82	6,2	6,50
15	4,8	5,15	49	8,3	8,48	83	7,4	7,41
16	6,7	7,13	50	6,9	6,99	84	6,5	6,68
17	8,0	8,15	51	6,8	6,91	85	7,8	7,60
18	5,8	5,76	52	8,2	8,29	86	7,6	7,61
19	8,0	8,02	53	6,7	6,60	87	5,0	5,40
20	5,5	5,55	54	6,3	6,47	88	6,0	6,22
21	7,0	7,10	55	5,2	5,66	89	6,6	6,87
22	5,1	5,47	56	9,2	9,37	90	8,3	8,61
23	6,8	6,83	57	6,5	6,71	91	6,3	6,67
24	7,2	7,08	58	5,2	5,53	92	8,4	8,57
25	5,1	5,26	59	6,4	6,48	93	7,5	7,75
26	7,7	7,67	60	7,1	7,29	94	6,3	6,42
27	7,4	7,34	61	6,5	6,72	95	5,1	5,50
28	8,5	8,67	62	7,0	7,26	96	7,6	7,52
29	8,0	8,38	63	7,6	7,82	97	6,3	6,58
30	6,0	6,13	64	9,2	9,16	98	8,1	8,07
31	7,2	7,31	65	8,0	8,48	99	6,0	6,15
32	6,0	6,31	66	6,5	6,87	100	8,1	8,16
33	7,7	7,65	67	6,6	6,62	101	5,3	5,60
34	9,1	9,07	68	6,5	6,63			

Os resultados obtidos foram analisados com o intuito de identificar valores aberrantes, que poderão influenciar os resultados finais deste estudo; para tal, recorreu-se às regras descritas no ponto 2.5.3, identificou-se um valor aberrante (6,9; 8,52), sendo este eliminado do conjunto de valores.

### 3.3.1. Teste $t$ para amostras emparelhadas

Inicialmente, procedeu-se ao teste  $t$  para amostras emparelhadas descrito no ponto 2.5.3, para avaliar se os resultados provenientes dos dois métodos apresentavam desvios significativos. Este teste baseia-se nas diferenças entre os resultados obtidos pelos dois métodos para cada amostra analisada. No Gráfico 5, estão representadas essas diferenças e, na Tabela 13 estão expressos os resultados para o teste  $t$ .

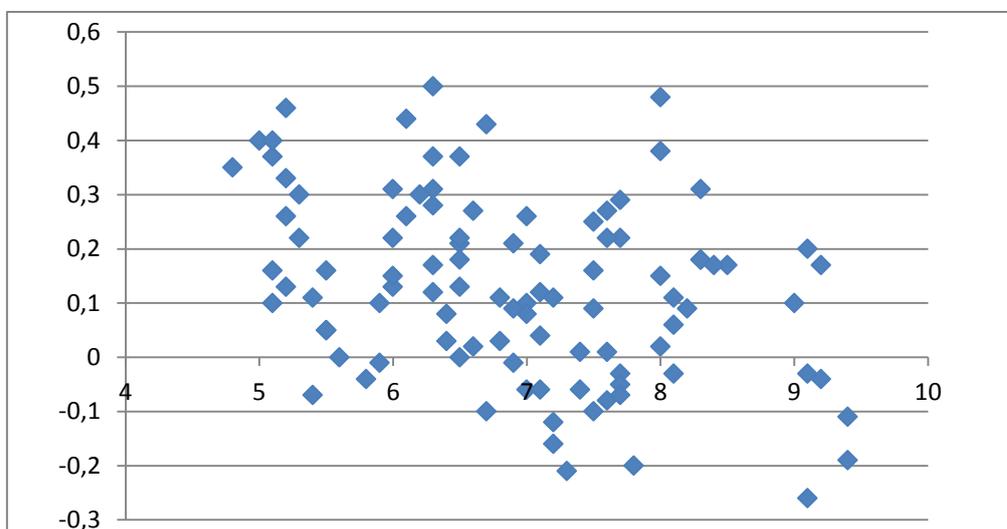


Gráfico 4: Diferença entre os resultados do método imunoenensaio e o método HPLC.

Tabela 13: Resultado do teste  $t$  para amostras emparelhadas.

Média das diferenças	- 0,13
Desvio padrão das diferenças	0,16
Valor $t$ calculado	7,74
Valor $t$ tabelado	1,98

Como o  $t$  calculado (valor absoluto) é maior do que o  $t$  tabelado, considera-se que existem diferenças em geral para o conjunto de amostras e a presença do erro sistemático é estatisticamente significativa.

### 3.3.2. Regressão Linear

De seguida, procedeu-se ao teste de regressão linear para avaliar a natureza do erro sistemático, através da análise dos valores da ordenada na origem e do declive da equação da recta. Os resultados obtidos para estes parâmetros são apresentados na Tabela 14.

Elaborou-se também um gráfico de dispersão, onde os resultados do método de imunoensaio foram colocados no eixo do yy e os resultados do método de HPLC, no eixo de xx. Através da análise do Gráfico 4, podemos visualizar a resposta da linearidade face ao intervalo de dados e uma relação entre os métodos.

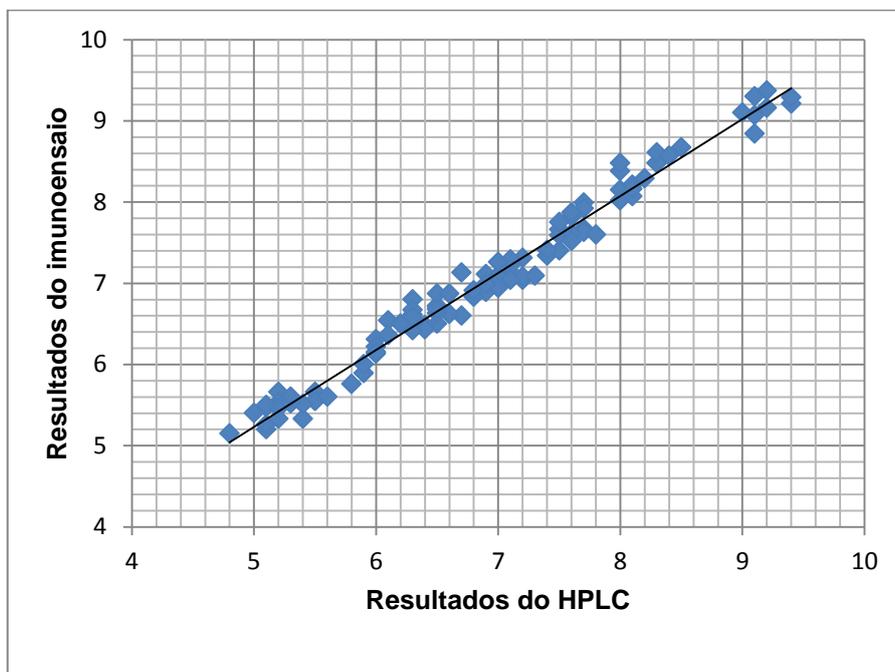


Gráfico 5: Comparação dos resultados do método teste *versus* os resultados método comparativo.

**Tabela 14: Resultados da regressão linear no estudo da exactidão.**

Função Linear			
$m_0$	0,49	$s_{m0}$	0,09
$m_1$	0,94	$s_{m1}$	0,13
$s_{y/x}$	0,15		
$r^2$	0,98		
<b>g.l.</b>	98		
$Y = 0,49 + 0,94x$			

Como coeficiente de correlação é igual a 0,98, considera-se que o intervalo de valores é adequado para a estimativa do declive e a ordenada na origem. Desta forma, procedeu-se à análise do intervalo de confiança associado à origem ( $m_0 \pm t \times s_{m0}$ ) e ao intervalo de confiança associado ao declive ( $m_1 \pm t \times s_{m1}$ ), para um nível de confiança de 95%, e verificou-se que o valor zero não pertence ao intervalo de confiança associado à ordenada na origem [0,37; 0,68] e que o valor 1 não pertence ao intervalo de confiança associado ao declive [0,92; 0,97]. Isto permitiu concluir, mais uma vez, que os métodos não são estatisticamente concordantes e que o método de imunoensaio apresenta um erro sistemático constante e um erro sistemático proporcional.

Através da equação de regressão linear, procedeu-se ainda à determinação do erro sistemático (*bias*) para os níveis críticos de decisão médica. Assim, para o nível crítico de decisão médica de 6,5% de HbA1c, o valor correspondente será de 6,65, ( $y_c = 0,49 + (0,94 - 1) \times 6,5$ ) o que significa que existe um erro sistemático de 0,15% HbA1c. Para o nível crítico de decisão médica de 7,0% de HbA1c, o valor correspondente será de 7,13% ( $y_c = 0,49 + (0,94 - 1) \times 7,0$ ), o que significa existir um erro sistemático de 0,13% HbA1c.

### 3.4. Elaboração do gráfico de decisão para o requisito da qualidade CAP (ETa de 7%) e NGSP (ETa de 10%)

Para a elaboração do gráfico e cálculo da métrica sigma, o *bias* e o coeficiente de variação foram colocados na mesma unidade de medida (%), em que o *bias* para o valor crítico de 6,5% de HbA1c será de 2,3% e o *bias* para o valor crítico de 7% de HbA1c será de 1,9%.

Procedeu-se à elaboração dos gráficos de acordo com o ponto 2.4.4, em que, no Gráfico 6, se observa o desempenho do método na escala sigma, para o critério da qualidade estabelecido pelo CAP, e, no Gráfico 7, para o critério da qualidade estabelecido pelo NGSP.

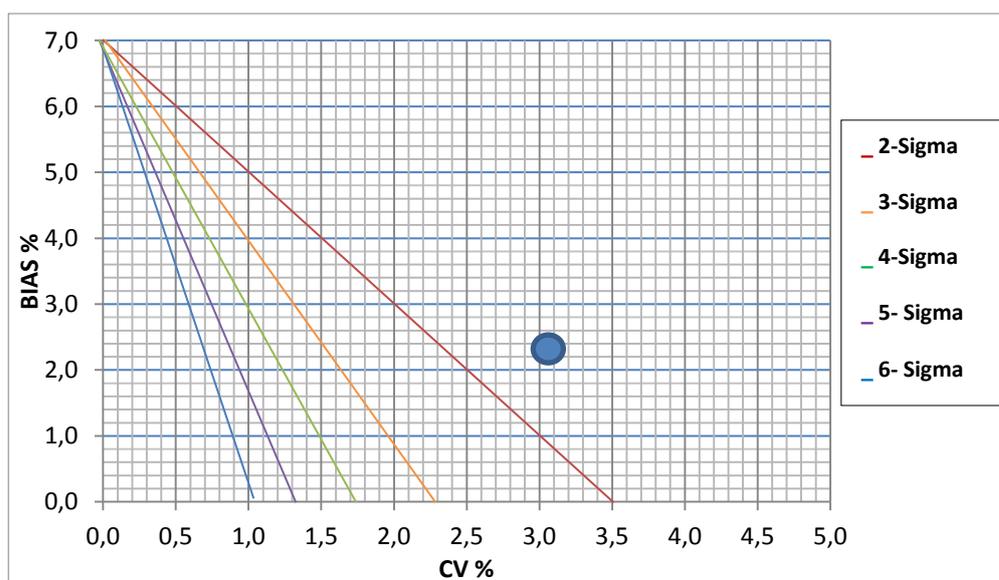
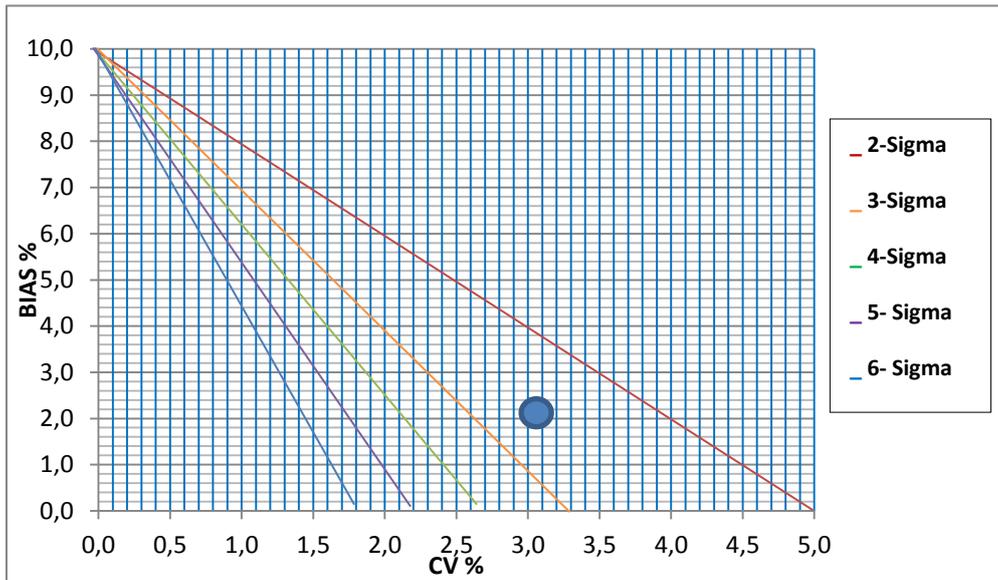


Gráfico 6: Carta de decisão do método para o critério de qualidade do CAP.

Através da observação da carta de decisão do gráfico 6, podemos concluir que o desempenho do método é inaceitável e, calculando a métrica sigma  $[(ETa - bias) / CV]$ , obtemos valores 1,5 sigma para o valor crítico de 6,5% de HbA1c e 1,6 sigma para o valor crítico de 7% de HbA1c, o que não está de acordo com o requisito de qualidade e não é aceitável para trabalhar na rotina laboratorial.



**Gráfico 7: Carta de decisão do método para o critério de qualidade do NGSP.**

Após a observação do gráfico 7, concluímos que o desempenho do método é pobre, que satisfaz o requisito de qualidade, mas não é aceite para trabalhar na rotina laboratorial. Apresenta valores sigma de 2,5 para o valor crítico de 6,5% de HbA1c e 2,6 para o valor crítico de 7% de HbA1c.

As conclusões observadas para os diferentes critérios de qualidade não sofreriam alterações se tivéssemos usado o coeficiente de variação de 2,7%, valor calculado a partir da precisão total do método de imunoensaio, caso houvesse linearidade para o valor alvo de 12,2% de HbA1c.

## Capítulo IV- Conclusão

O objectivo deste trabalho foi a implementação do método de imunoensaio, para a determinação da HbA1c na rotina laboratorial, e consistiu na avaliação do desempenho do método, em comparação com o método de HPLC, segundo os parâmetros definidos pela CLIA para métodos de complexidade moderada.

Assim, no estudo da linearidade, verificou-se que o método de HPLC apresenta linearidade no intervalo de 5,1% a 14,9% de HbA1c mas o método de imunoensaio não apresentou linearidade para este intervalo, tendo de reduzir-se a gama de trabalho para um intervalo de 5,1% a 12,4% de HbA1c, em que se considerou haver pouca credibilidade estatística em afirmar linearidade neste intervalo. Realizou-se novo estudo, agora para um intervalo de 5,4% a 9,5%, por este incluir os valores críticos de decisão médica, e verificou-se haver linearidade neste intervalo para ambos os métodos.

No estudo da precisão, verificou-se que o método de HPLC apresenta um coeficiente de variação de 1,2% para uma concentração média de 6,0% de HbA1c e um coeficiente de variação de 1,3% para uma concentração média de 11,3% de HbA1c, estando de acordo com o requisito clínico exigido, pois apresenta um coeficiente de variação inferior a 2,4%, sendo capaz de detectar uma diferença estatisticamente significativa de 0,5% de HbA1c. O mesmo não se verifica para o método de imunoensaio, que apresenta um coeficiente de variação de 3,1%, para uma concentração média de 5,8% de HbA1c, e um coeficiente de variação de 1,1%, para uma concentração média de 12,2% de HbA1c, pelo que este último não pode ser considerado por se verificar haver linearidade apenas até 9,5% HbA1c e também porque é um valor muito alto, que se afasta dos níveis críticos de decisão médica.

No estudo da exactidão, compararam-se os dois métodos e verificou-se que havia diferenças significativas entre eles, isto é, os métodos não são estatisticamente concordantes na gama de trabalho estudada, pois o método de imunoensaio apresenta um erro sistemático constante e proporcional.

Contudo o erro total do método de imunoensaio é igual a 8%, o que está de acordo com o requisito exigido para a certificação do método pelo NGSP, mas não está de acordo com o requisito da qualidade exigido pelo CAP.

Ao aplicarmos os dados obtidos à ferramenta 6-sigma, verificou-se que o método satisfaz o requisito do NGSP, apresentando um desempenho 2-sigma, facto que demonstra que o método não é aceite para trabalhar na rotina laboratorial, pois um método para esta finalidade deve ter um desempenho 4 sigma. Em relação ao critério do CAP, o método também apresenta um desempenho inaceitável.

Neste estudo, os resultados observados estão em conformidade com as publicações recentes sobre o desempenho dos métodos para a determinação da HbA1c ([www.ngsp.com](http://www.ngsp.com), 2011). Assim, no relatório do teste de proficiência do CAP (GH - 2a) de 2011, podemos observar que o método de imunoensaio, estudado neste trabalho, apresentou coeficientes de variação de 3,8%, 3,5% e 3,9% e respectivos *bias* de 2,1%, 3,3%, 3,5% para as seguintes concentrações de HbA1c: 8,5%; 5,4% e 6,4%.

Também no estudo publicado por Lenters - Westra E *et al* (2011), onde foram utilizados os dados dos laboratórios participantes no programa de controlo da qualidade externo holandês e belga, com o objectivo de avaliar o desempenho da maioria dos métodos disponíveis no mercado e, também, se estes eram capazes de satisfazer o critério clínico através do cálculo do RCV, os resultados revelaram que o método de imunoensaio em questão apresentou em média um coeficiente de variação de 3,3%, para valores alvo de 5,9% e 7,8% de HbA1c e um valor de RCV de 0,68% de HbA1c, que corresponde a uma percentagem de RCV de 9,6% para o valor alvo de 7% de HbA1c.

E, segundo os dados do PNAEQ em HbA1c, os laboratórios participantes neste programa, com o método de imunoensaio, obtiveram no ensaio de 2010, em média coeficientes de variação de 3,2% e 4,4% para as seguintes concentrações de HbA1c: 6,9% e 11,4%. O programa não revela os equipamentos usados pelos laboratórios participantes, de forma que os valores dos coeficientes de variação apresentados representam, em média o desempenho de diferentes equipamentos com o mesmo método de imunoensaio.

De salientar que os dados obtidos nos estudos publicados demonstram o desempenho médio para cada método e, como tal, alguns laboratórios, usando um determinado método, podem alcançar um valor de RCV e, por conseguinte um valor de coeficiente de variação mais baixo que os valores alcançados nos estudos, e outros laboratórios, usando o mesmo método, podem apresentar um valor de RCV e coeficiente de variação mais altos (Westgard S, 2011b).

Podemos concluir que o método de imunoensaio, embora sendo certificado pelo NGSP e satisfaça o requisito da qualidade proposto por esta entidade, apresentou um desempenho analítico inaceitável para os critérios da qualidade estabelecidos pelo CAP e clínico, considerando-se não ser viável a sua implementação na rotina laboratorial, face às limitações do método que poderão influenciar decisões clínicas importantes quando baseadas nos seus resultados.

## Referências Bibliográficas

- American Diabetes Association. 2010. "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus". *Diabetes Care*, **Vol. 33**, N°1, pp. s62-s69.
- Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. 2008. "O Papel dos Produtos Finais da Glicação Avançada (AGEs) no Desencadeamento das Complicações Vasculares do Diabetes". *Arq Bras Endocrinol Metab*, **Vol. 52**, N°6, pp. 940-950.
- Bem AF, Kunde J. 2006. "A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus". *J Bras Patol Med Lab*, **Vol. 42**, N° 3, pp. 185-191.
- Berlitz F.A., Haussen M.L. 2005. "Seis Sigma no laboratório clínico: impacto na gestão de performance analítica dos processos técnicos". *Jornal Brasileiro de Patologia Clínica*, **Vol. 41**, N°5, pp. 301-312.
- Braga F, Dolci A, Mosca A, Pantrghini M. 2010. "Variability of Glicated Hemoglobin". *Clinica Chimica Acta*, **Vol. 411**, pp. 1606-1610.
- Brito CP, Duarte R. 2010. "Recomendação global da "Internacional Diabetes Federation" sob Gravidez e Diabetes (2009) – Part II". *Revista Portuguesa de Diabetes*, **Vol. 5**, N° 2, pp. 83-90.
- Camargo JL, Gross JL. 2004. "Glico-hemoglobina (HbA1c): Aspectos Clínicos e Analíticos". *Arq Bras Endocrinol Metab*, **Vol. 48**, N° 4.
- Coordenação Geral de Acreditação. 2010. "Orientações sobre Validação de Métodos Analíticos".

- Coskun A, Unsal I, Serteser M, Inal T. 2010. "Six Sigma as a Quality Management Tool: Evaluation of Performance in Laboratory Medicine, Quality Management and Six Sigma". Abdurrahman Coskun (Ed.), <http://www.intechopen.com/articles/show/title/six-sigma-as-a-quality-management-tool-evaluation-of-performance-in-laboratory-medicine>.
  
- Dumitriu IL, Gurzu B, SI\_tineanu SM, *et al.* 2010. "A model for calculating measurement uncertainty in medical laboratories". *Revista Româna de Medicina de Laborator*. **Vol. 18**, N° 1/4, pp.65-77.
  
- EURACHEM.1998. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". 1st ed.
  
- Ferreira CES, Andriolo A. 2008. "Intervalos de referência no laboratório clínico". *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, **Vol. 44**, N°1, pp.11-16.
  
- Friedecký B, Sprongl L, Kratochvila J. 2004. "Validation and Verification of analytical Methods in Clinical Laboratories". Recommendation of the Czech Society for Clinical Biochemistry.
  
- Goldstein DE, Little RR, *et al.* 2004. "Tests of Glycemia in Diabetes". *Diabetes Care*. **Vol. 27**, N°7, pp. 1761-1773.
  
- Gras JM, Philippe M. 2007 "Application of the concept in clinical laboratories: a review". *Clin Chem Lab Med*. **Vol. 45**, N°6, pp. 789-796.
  
- Guimarães J, Bastos M, Carneiro M. 2006. "Hemoglobina Glicada (A1c): Métodos de Doseamento, calibração IFCC/DCCT". *Revista Portuguesa de Diabetes*. **Vol. 4**, pp. 24-26.
  
- Henriches HR. 2009. "HbA1c–Glycated Hemoglobin and Diabetes Mellitus". *UNIMED*

- Linters-Westra E, Weykamp C, Schindhelm RK, *et al.* 2011. "One in five laboratories using various hemoglobin A1c methods do not meet the criteria for optimal diabetes care management". *Diabetes Technology & Therapeutics*. **Vol. 13**, N°4, pp. 429-433.
  
- Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyr HM, *et al.* 2001. "The National Glycohemoglobin Standardization Program: A Five-Year Progress Report". *Clinical Chemistry*. **Vol. 47**, N°11, pp. 1985-1992.
  
- Little RR, Roberts WL. 2009. "A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement". *Journal of Diabetes Science and Techonology*. **Vol. 3**, N°3, pp.446-451.
  
- Little RR, Rohlfing CL. 2011. "Analytical goals for HbA1c: Are HbA1c results good enough for optimal use?" *Journal of Diabetes*. **Vol. 3**, N°1, pp. 3-6.
  
- Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB. 2011. "Status of hemoglobin A1c measurement and goals improvement: from chaos to order for improving diabetes care". *Clinical Chemistry*. **Vol. 57**, N°2, pp. 205-214.
  
- Marshall SM. 2010. "Standardization of HbA1c: good or bad?" *Nature Reviews Endocrinology*. **Vol. 6**, pp. 408-411.
  
- Morillo ME, Tomás FJ, Nieva NA, *et al.* 2010. "Recomendaciones para el estudio de la veracidad en el laboratorio clínico mediante la comparación de procedimientos de medida". *Sociedade Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular*.
  
- Murphy PG. 2008. "Selection of a Suitable Assay". *Clin Biochem Rev*. **Vol. 29**, Suppl.i, pp.S17-S22.

- NCCLS. 1999. "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline". *NCCLS document EP5-A*, **Vol. 19**, Nº2.
  
- NCCLS. 2001. "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods; Proposed Guideline". *NCCLS document EP6-P2*, **Vol. 21**, Nº20.
  
- NCCLS. 2002. "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline-Second Edition". *NCCLS document EP9-A2*, **Vol. 22**, Nº19.
  
- Netto AP, Andriolli A, Filho FF, *et al.* 2009. "Actualização sobre hemoglobina glicada (HbA1c) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais". *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. **Vol. 45**, Nº1, pp.31-48.
  
- Norma da Direcção-Geral da Saúde Nº002/2011 de 14/01/2011. "Diagnóstico e Classificação da Diabetes".
  
- Norma da Direcção-Geral da Saúde Nº007/2011 de 31/01/2011. "Diagnóstico e Conduta na Diabetes Gestacional".
  
- NP EN ISO/IEC 15189: 2007, Laboratórios clínicos. Requisitos particulares da qualidade e competência.
  
- OGC004. 2006. Guia Interpretativo da ISO 15189, IPAC.
  
- Organização Mundial de Saúde. 1999. "Definição, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus" *in*  
[http://www.spd.pt/index.php?option=com\\_content&task=category&sectionid=5&id=28&Itemid=30](http://www.spd.pt/index.php?option=com_content&task=category&sectionid=5&id=28&Itemid=30)
  
- Observatório Nacional da Diabetes. 2010. "Diabetes factos e números 2010" *in*  
[http://www.spd.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=283&Itemid=330](http://www.spd.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=283&Itemid=330)

- Pina CB. 2010. “Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes (2009). A Importância Acrescida de Prevenir, Diagnosticar Precocemente, Controlar e Educar”. *Revista Portuguesa da Diabetes*. **Vol. 5**, Nº1, pp. 44-45.
  
- Ricós C, Alvarez V, Cava F, *et al.* 2010. “Desirable Specifications for Total Error, Imprecision and Bias, derived from intra-and inter-individual biologic variation”.  
<http://westgard.com/biological-variation-database-specifications.htm>
  
- Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, *et al.* 2011. “Guidelines and Recommendations for Laboratory Analyses in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus”. *Diabetes Care*. **Vol. 34**, Nº6, pp. e61-e99.
  
- Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, *et al.* “Guidelines and Recommendations for Laboratory Analyses in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus”. *Clin Chem*. **Vol. 48**, Nº3, pp. 436-72.
  
- Saraiva J, Gomes L, Carvalheiro M. 2010. “Classificação e Diagnóstico da Diabetes Mellitus- O Que Há de Novo em 2010”. *Revista Portuguesa de Diabetes*. **Vol. 5**, Nº 2, pp. 77-82.
  
- Schindhelm RK, Lenters-Westra E, Slingerland RJ. 2010. “Glycated haemoglobin A1c (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus: don't forget the performance of the HbA1c”. *Diabetics Medicine UK*. **Vol. 27**, pp.1214-1215.
  
- *Strathmann F.* 2011. “Reference Intervals and Patient Safety”. *American Association for Clinical Chemistry*.
  
- Relacre. 2000. “Guia Relacre-13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química”.
  
- *VIM.* 2008. Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia (VIM).

- Weykamp C, John WG, Mosca A. 2009. "A Review of the Challenge in Measuring Hemoglobin A1c". *Journal of Diabetes Science and Technology*. **Vol. 3**, N°3, pp. 439-445.
- Westgard JO. 2008. "Basic Method Validation". *Westgard QC*. 3rd Edition Madison.
- Westgard JO. 2010a. "Managing quality vs measuring uncertainty". *Clin Chem Lab Med*. **Vol. 4**, N°1, pp.31–40.
- Westgard JO. 2010b. "HbA1c in 2010, Part II". <http://www.westgard.com/hba1c-methods-part3.htm>
- Westgard JO. 2010c. "HbA1c in 2010, Part IV". <http://www.westgard.com/hba1c-methods-part4.htm>
- Westgard JO. 2010d. "HbA1c in 2010, Part VI". <http://www.westgard.com/hba1c-methods-part6.htm>
- Westgard JO. 2011. "Update on HbA1c Quality Goals and Performance Requirements" in <http://www.westgard.com/quality-hba1c-2011.htm>
- Westgard S. 2011a. "What's the right goal?" in <http://www.westgard.com/right-quality-goal.htm>
- Westgard S. 2011b. "Quality of HbA1c, 2011, Part II" in <http://www.westgard.com/quality-hba1c-2011-part2.htm>
- White GH, Farrance I. 2004. "Uncertainty of Measurement in Quantitative Medical Testing - A Laboratory Implementation Guide". *Clin Biochem Rev*. **Vol. 25**, Suppl.ii, pp.S1-S24.

## **Sites**

<http://www.ngsp.org/>, Maio de 2011.

<http://www.nmschembio.org.uk/>, Maio de 2011.

<http://www.spd.pt/>, Abril de 2011.

<http://www.idf.org/>, Abril de 2011.