

## Determinación de glicohemoglobina en el analizador IMx<sup>®</sup>

A. Buño Soto, R. Gómez Rioja, C. Jariego Fente, C. Grande Aragón

### Resumen

*Se describe la determinación de la fracción de glicohemoglobina usando un nuevo método en el analizador Abbot IMx<sup>®</sup>.*

*Este método se basa en una primera unión de la glicohemoglobina con un reactivo de afinidad polianiónica. El complejo aniónico obtenido es capturado en una matriz de fase sólida catiónica y la glicohemoglobina se cuantifica por fluorescencia. Es un procedimiento simple que no requiere preparación preliminar del hemolizado y totalmente automatizable. Los resultados obtenidos fueron altamente reproducibles, obteniéndose unos coeficientes de variación intra e interseriales inferiores al 5%, y una buena concordancia al compararlos con los obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La afinidad con el ácido m-aminofenilborónico no produce interferencias con la fracción lábil ni con variantes de la hemoglobina como hemoglobina F, hemoglobina S y hemoglobina C. Estas características hacen de este nuevo método una alternativa atractiva para la cuantificación de la glicohemoglobina.*

### Introducción

La cuantificación de la glicohemoglobina se utiliza rutinariamente en la práctica clínica diaria en el control a largo plazo del paciente diabético, ya que informa de la concentración de glucosa media integrada de las 6-8 semanas previas (1-3).

La hemoglobina en su forma glucada se puede cuantificar como glicohemoglobina, como fracción glucada en el extremo  $\beta$ -NH<sub>2</sub>-terminal (hemoglobina A<sub>1c</sub>) o su mayor subfracción (hemoglobina A<sub>1c</sub>) que lleva unido un resto glucosa al extremo NH<sub>2</sub>-terminal del aminoácido valina de una o ambas cadenas  $\beta$  de la hemoglobina (4).

Existen un gran número de métodos válidos para la cuantificación de la glicohemoglobina que se diferencian en el principio de separación de la fracción glucada así como en la posibilidad de valorar una o más especies glucadas (5,8). La falta de calibradores adecuados así como las diferentes características analíticas de los métodos explican la disparidad de resultados obtenidos entre los diferentes grupos (9,10).

Se ha evaluado un nuevo método automatizado desarrollado por los laboratorios Abbott para la cuantificación de la glicohemoglobina, el cual separa dicha fracción mediante la unión a un polímero de afinidad aniónica. Este complejo polianión-glicohemoglobina es capturado por una matriz catiónica (captura iónica) y separado por tanto de la

### Summary

*Direct quantitation of glycated haemoglobin from anticoagulated whole blood using a new Abbot IMx<sup>®</sup> assay is described. This method consists of first tagging glycated haemoglobin with a soluble polyanionic affinity reagent. The anionic complex thus obtained is captured in a cationic solid phase matrix and glycated haemoglobin quantified by fluorescence. It is a technically simple assay not requiring preliminary preparation of the hemolysates and has the capability to be fully automated. Assay was highly reproducible with between and within-run CV's less than 5%, and a good concordance was obtained against the HPLC method. Labile fraction and the haemoglobin variants, HbF, HbS, and HbC did not interfere affinity with aminophenylboronic acid. These features make the IMx glycated haemoglobin assay a very attractive alternative method for the quantitative determination of the glycated haemoglobin.*

fracción no glucada. La cuantificación de la hemoglobina y la fracción glucada se realiza por fluorescencia y las concentraciones se obtienen mediante una curva de calibración.

Se ha estudiado la imprecisión, linealidad, contaminación, recuperación (11), así como la comparación de resultados con los obtenidos por la cromatografía líquida de alta resolución.

### Material y métodos

#### Instrumentación

El analizador utilizado fue el IMx<sup>®</sup> (Abbott Laboratories, North Chicago, EEUU) que utiliza el método de captura iónica, mediante la cual, tras la lisis de los eritrocitos, una macromolécula polianiónica se une específicamente con la glicohemoglobina mediante una interacción entre los grupos dihidroxiboronato del polímero y los grupos cis-diol de la oxoamina. El complejo formado se separa de la hemoglobina no glucada por su paso a través de una matriz de fibra de vidrio recubierta con un compuesto de amonio cuaternario de elevada masa molecular. El complejo es capturado por la matriz catiónica que se lava con solución amortiguadora ( $\mu\text{g,Cl}_2$ , asparagina, metionina, metilumbeliferona como fluoróforo y solución amortiguadora taurina a pH 9,0) para eliminar la fracción no glucada. La atenuación de la fluorescencia debido a la presencia de glicohemoglobina en la matriz es medida por el sistema óptico del analizador. La matriz se lava con un reactivo que contiene sorbitol que compite con la glicohemoglobina por su unión a la matriz. Una nueva alícuota de otra dilución a la cual se le ha añadido sorbitol, es transferida a la matriz

cuantificando la atenuación de la fluorescencia debida a la presencia de glicohemoglobina y hemoglobina no glucada. Ambas fluorescencias medidas son convertidas automáticamente a concentraciones de glicohemoglobina y hemoglobina a partir de una curva de calibración obtenida al analizar 6 calibradores que contienen 0; 0,2; 0,6; 1,2; 1,8 y 2,4 mmol/L de glicohemoglobina y 0; 1,0; 3,0; 6,0; 9,0 y 12,0 mmol/L de hemoglobina lo que corresponde a una fracción de glicohemoglobina de 0,2 en todos los calibradores. Los resultados son expresados como porcentaje de glicohemoglobina, o mediante una fórmula de conversión estandarizada, como porcentaje de hemoglobina  $A_{1c}$ . La curva de calibración es almacenada, realizándose una recalibración en cada serie con un calibrador de 0,2 mmol/L de glicohemoglobina.

La afinidad con el ácido *m*-amino-fenilborónico no produce interferencias con las variantes de la hemoglobina (hemoglobina S, F y C) ni con la fracción lábil o aldimina de la glicohemoglobina (12-14).

Los especímenes son hemolizados de forma automática y todas las determinaciones se realizaron con el mismo analizador y lote de reactivos.

La comparación de resultados se realizó respecto a los obtenidos en un analizador automático Diamat (Bio-Rad Laboratories, München, Alemania) mediante cromatografía líquida de alta resolución, utilizando una columna de intercambio iónico.

#### Especímenes

Los especímenes de sangre utilizados (n=156) fueron recogidos en tubos que contenían EDTA-K<sub>2</sub> como anticoagulante y almacenados a 4 °C hasta un máximo de 5 días. Dichos especímenes procedían de pacientes diabéticos de ambos sexos y con edades comprendidas entre 12 y 61 años, tratados en la Unidad de Diabetes de nuestro hospital y con fracciones diferentes de hemoglobina A<sub>1c</sub>, dependiendo del grado de control metabólico.

#### Análisis estadístico

El análisis de regresión se realizó aplicando el método de los mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación lineal de Pearson.

El estudio de intercambiabilidad de resultados entre métodos se realizó mediante el análisis de regresión no paramétrica de Passing y Bablok (15).

#### Protocolo de la evaluación

Para la obtención de la imprecisión se utilizaron tres materiales de control con diferentes fracciones de glicohemoglobina (0,051; 0,097 y 0,172 respectivamente) suministrados por los laboratorios Abbott y almacenados a 4 °C. Las concentraciones fueron calculadas a partir de curvas de calibración obtenidas el primer día del estudio y ajustadas posteriormente en cada serie analizada con el calibrador Mode 1 (0,2 mmol/L de glicohemoglobina) (Abbott). La imprecisión intraserial fue realizada analizando 20 alícuotas de cada material de control el primer día del estudio. La imprecisión interserial se determinó valorando los tres materiales de control durante veinte días consecutivos.

#### Linealidad

La linealidad se estudió en 9 especímenes de pacientes diabéticos  $\bar{x}=0,1182$  que fueron diluidas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 (v:v) con el calibrador de concentración cero.

#### Contaminación

La contaminación se evaluó colocando el calibrador cero des-

pués de un espécimen con elevada concentración de glicohemoglobina. El porcentaje de la misma se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Contaminación} = \frac{\text{Concentración del calibrador}}{\text{Concentración del espécimen}} \times 100$$

#### Recuperación

La recuperación se realizó preparando diferentes mezclas de un espécimen con cantidades crecientes de glicohemoglobina (calibrador 9 mmol/L). Se añadió una cantidad de calibrador suficiente como para incrementar el valor de la fracción de glicohemoglobina del espécimen base en 0,2, 0,5 y 1. Para ello las proporciones de las mezclas utilizadas fueron 1:6, 1:3 y 1:1 (v:v) respectivamente. Estas mezclas se cuantificaron tres veces consecutivas, utilizando para los cálculos los valores medios. El porcentaje de recuperación se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración teórica (\%)}}{\text{Concentración obtenida (\%)}} \times 100$$

#### Resultados

Los resultados del estudio de la imprecisión intra e interserial de la determinación de la glicohemoglobina quedan recogidos en la tabla I.

Al aplicar el análisis de regresión a las diferentes diluciones realizadas para el estudio de la linealidad se obtuvo un coeficiente de correlación, entre los valores medidos frente a los teóricos, de 0,99.

La contaminación entre especímenes obtenida fue del 1,25%.

Los datos del estudio de recuperación obtenidos tras la adición de cantidades crecientes de glicohemoglobina a un espécimen cuya fracción era de 0,0546 fue de 100,3, 100,8 y 96,7% respectivamente (tabla II).

La figura 1 muestra la comparación entre los valores de hemoglobina A<sub>1c</sub> obtenidos en ambos sistemas (IMx<sup>®</sup> y Biorad Diamat). La correlación entre los resultados fue buena (r=0,965) y la intercambiabilidad fue estudiada mediante el análisis de regresión de Passing y Bablok obteniéndose la siguiente recta: hemoglobina A<sub>1c</sub> IMx<sup>®</sup> = 0,956 hemoglo-

**Tabla I. Imprecisión de la determinación de glicohemoglobina por el sistema IMx<sup>®</sup>**

	n	$\bar{x}$ (1)	s (1)	CV (%)
Intraserial	20	0,0523	0,0017	3,25
	20	0,1006	0,0042	4,17
	20	0,1769	0,0061	3,45
Interserial	20	0,0507	0,0023	4,53
	20	0,1004	0,0049	4,88
	20	0,1741	0,0071	4,07

**Tabla II. Estudio de recuperación**

n=6	$\bar{x}$ Teórica (1)	$\bar{x}$ Medida (1)	Porcentaje de recuperación (%)
Mezcla 1	0,0679	0,0681	100,3
Mezcla 2	0,0780	0,0786	100,8
Mezcla 3	0,1013	0,0980	96,7

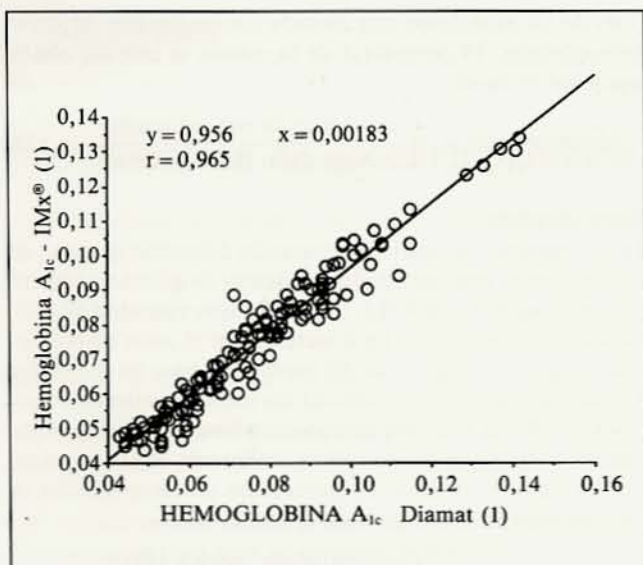


Figura 1. Comparación (IMx®/Cromatografía líquida de alta resolución) de la determinación de hemoglobina A<sub>1c</sub>.

bina A<sub>1c</sub> Diamat + 0,00183, siendo el intervalo de confianza de b: 0,919 y 1,000, y el intervalo de confianza de a: -0,145 y 0,468, incluyéndose el valor b=1 y a=0 respectivamente. Al aplicar la prueba de suma acumulativa (cusum) para estudiar la desviación de la linealidad no se encontró desviación estadísticamente significativa.

## Discusión

La medida de la fracción de glicohemoglobina tiene gran importancia en el seguimiento del control del paciente diabético. Como resultado de ello han aparecido numerosos métodos para su cuantificación. Todos los métodos descritos hasta hoy día presentan buena correlación aunque existan diferencias entre ellos en lo que concierne a los componentes medidos y características de realización (10,16-19).

En 1984, el National Diabetes Data Group estableció que ninguna metodología parecía ser superior sobre las demás, y recomendaron que los coeficientes de variación intra e interserial deberían ser menores del 5%, siendo deseable evitar la interferencia del intermediario lábil (4). No obstante, antes de seleccionar un método para la cuantificación de la glicohemoglobina, habría que establecer ciertos objetivos de calidad analítica. En la práctica clínica es importante que una variación de más de 0,01 en la fracción de hemoglobina A<sub>1c</sub> en un individuo no sea resultado de la imprecisión analítica (20).

El método evaluado es reproducible, obteniéndose coeficientes de variación intra e interserial inferiores al 5%. El estudio de linealidad mostró un coeficiente de correlación estadísticamente significativo ( $r=0,99$ ;  $P<0,001$ ) y la recuperación obtenida fue de  $\bar{x}=99,3\%$ .

Asimismo, se compararon los resultados obtenidos por el sistema IMx® en 156 especímenes con los obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución. Se seleccionó un método de cromatografía de intercambio iónico debido a su alta precisión, especificidad y rapidez. Una importante característica de este método es el hecho de que el analizador puede ser calibrado con un hemolizado conservado bajo condiciones de ultracongelación (21).

Se obtuvo una excelente correlación ( $r=0,965$ ) y concordancia entre los resultados obtenidos por ambos sistemas mediante el análisis de regresión de Passing y Bablok, que

estima la recta de regresión considerando el error analítico de ambos, demostrándose la no existencia de error proporcional o constante en las determinaciones. Estos resultados indican que las fracciones de hemoglobina A<sub>1c</sub> determinados por el IMx® son comparables a los obtenidos por el sistema Diamat.

En resumen, la medida de la fracción de glicohemoglobina mediante el analizador IMx® presenta las ventajas de su simplicidad técnica, ya que no necesita preparación previa del hemolizado, y de su total automatización, por lo que se la considera una alternativa muy atractiva.

Correspondencia:  
Antonio Buño Soto  
c/ Gavilanes, 1, 4º Dcha.  
28035 Madrid

## Bibliografía

- Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated haemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984; 310: 384-385.
- Lester E. The clinical value of glucated haemoglobin and glycated plasma proteins. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 213-219.
- Lytken Larsen M, Horder M, Mogensen EF. Effect of long-term monitoring of glycosylated haemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; 323: 1021-1025.
- Baynes JW, Bunn HF, Goldstein DE et al. National Diabetes Data Group: Report of the Expert Committee on glycosylated haemoglobin. *Diabetes Care* 1984; 7: 602-606.
- Mayer TK, Freedman ZR. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurement and their clinical utility. *Clin Chim Acta* 1983; 127: 147-184.
- Ashby JP, Deacon AC, Frier BM. Glycosylated haemoglobin measurement and clinical interpretation. *Diabetic Medicine* 1985; 2: 83-87.
- Goldstein DE, Little RR, Wiedemeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated haemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986; 32: B64-B70.
- John WG, Bullock DG, McKenzie F. Methods for the analysis of glycated haemoglobins: what is being measured. *Diabetic Medicine* 1992; 9: 15-19.
- John WG. Glycated haemoglobin analysis-assessment of within and between-laboratory performance in a large UK region. *Ann Clin Biochem* 1987; 24: 453-460.
- Pickup JC, Crook MA, Tutt P. Blood glucose and glycated haemoglobin measurement in hospital: which method? *Diabetic Medicine* 1993; 10: 402-411.
- Peters T, Westgard JD. Evaluation of methods. En: Tietz NW, dir. *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: Saunders, 1986: 410-423.
- Michle FA, Bannister A, Bellingham AJ, Dean PDG. Separation of glycosylated haemoglobins using immobilized phenylboronic acid. *Biochem J* 1983; 209: 771-779.
- Talwar D, Barr BB, Kesson CM, Robb DA. Determination of glycosylated adult and fetal haemoglobins by affinity chromatography. *Clin Chim Acta* 1983; 128: 61-67.
- Yatscoff RW. Interference of fetal haemoglobin and labile glycosylated haemoglobin with measurement of glycosylated haemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29: 543-545.
- Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-720.
- Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI. Determination of glycosylated haemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange method and effects of common interferences. *Clin Chem* 1982; 28: 2088-2094.
- Mortensen HB, Nielsens L, Seggaard V, Svendsen PA, Nerup J. Comparison of six assays for glycosylated haemoglobin determination. *Scand J Clin Lab Invest* 1983; 43: 357-362.
- John WG, Albutt EC, Handley G, Richardson RW. Affinity chromatography method for the measurement of glycosylated haemoglobin: comparison with two methods in routine use. *Clin Chim Acta* 1984; 136: 257-262.
- Standing SJ, Taylor RP. Glycated haemoglobin: an assessment of high capacity liquid chromatographic and immunoassay method. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 494-505.
- Lytken Larsen M, Blaabjerg O, Hyltoft Petersen P, Hansen H, Horder M. Analytical goal setting prior to selection of a method for glycated haemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 715-721.
- The DDDCT Research Group. Feasibility of centralized measurements of glycosylated haemoglobin in the diabetes control and complications trial: A multicenter study. *Clin Chem* 1987; 33: 2267-2271.