

## Evaluación de un procedimiento de medida de hemoglobina A<sub>1c</sub> en una gota de sangre recogida sobre papel de filtro\*

T. Carrera Font<sup>1</sup>, Ll. Bonamusa Oliva<sup>2</sup>, C. Perich Alsina<sup>1</sup>, P. Bermejo López-Muñiz<sup>1</sup>, J. Ramis Fossas<sup>1</sup>, L. Almirall Bolibar<sup>2</sup>, J.M. Navarro Olivella<sup>1</sup>

### Resumen

*El objetivo del presente estudio es evaluar un procedimiento de recogida de sangre sobre un papel de filtro para efectuar después la medida de la hemoglobina A<sub>1c</sub> mediante cromatografía de intercambio iónico.*

*Aproximadamente 15 µL de sangre se depositan en tiras de papel de filtro, Schleicher & Schuell 2992 que se dejan secar, se introducen en tubos de plástico y se mantienen a temperatura ambiente y en nevera durante 21 días. En el momento del análisis, la sangre se eluye manteniendo el papel sumergido durante 5 minutos en 1 mL del reactivo hemolizante H40. El hemolizado obtenido se procesa en el sistema de HPLC HA-8140 (Arkray).*

*La precisión intraserial (n=20), expresada como CV, es de 0,6% para un valor de hemoglobina A<sub>1c</sub> de 0,082, y de 1,5% para un valor de 0,055%. La precisión interserial (n=8) es de 1,0% a 1,8% para los mismos valores de hemoglobina A<sub>1c</sub>. La estabilidad de la hemoglobina A<sub>1c</sub> se ha estudiado analizando cada 2-3 días las muestras guardadas a temperatura ambiente y en nevera. Los resultados obtenidos en 40 muestras de sangre recogidas en tubo con EDTA K<sub>3</sub> se han comparado, mediante el método de regresión no paramétrico de Passing-Bablok, con los de las mismas muestras recogidas en papel y guardadas 5 días a temperatura ambiente, obteniéndose una correlación de r=0,994 y una ecuación de la recta de: y = 0,87x + 0,0043. Asimismo, se han analizado comparativamente los valores de 287 muestras de sangre capilar comparados con la muestra correspondiente de sangre venosa del mismo paciente. Los resultados han mostrado una correlación de r=0,95 (Spearman) y unos valores de la recta (Passing-Bablok) de a=1 (IC 95% 0,957-1,00) y b=0,002 (IC 95% 0,002-0,0051).*

*El método estudiado permite valorar la fracción de masa de hemoglobina A<sub>1c</sub> contenida en una gota de sangre recogida sobre papel de filtro mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución con una buena precisión. Sin embargo, a pesar del excelente coeficiente de correlación, el intervalo de confianza de la ordenada en el origen indica que los resultados obtenidos a partir de la sangre venosa recogida en tubo y los de la sangre capilar recogida en papel no son intercambiables por lo que es necesario establecer el intervalo de referencia para este nuevo procedimiento.*

### Summary

*The goal of this study is to evaluate a procedure for collecting blood onto a filter paper for a further determination of HbA<sub>1c</sub> on a ion-exchange HPLC system.*

*Approximately 15 µL of blood are spotted on filter paper strips (S&S, Schleicher & Schuell 2992). The blood-spotted paper is air-dried, introduced into a plastic tube and stored at room temperature and at 4°C for 21 days. Prior to the analysis the blood is eluted soaking the spotted paper for 5 min in one millilitre of H40 hemolysing reagent. The hemolysed sample is directly processed in the HPLC HA-8140 (Arkray).*

*Within-run precision of this procedure (n=20), expressed as CV, is 0.6% and 1.5% at a HbA<sub>1c</sub> level of 0.082 and 0.055 respectively. Between-run precision (n=8) yield a CV's of 1.0% and 1.8% at the same HbA<sub>1c</sub> levels. Stability of the HbA<sub>1c</sub> results has been studied analyzing each 2-3 days the spotted samples stored at room temperature and at 4°C. The results obtained measuring 40 samples collected on EDTA K<sub>3</sub> tube has been compared with those obtained from the blood spotted paper, stored five days at room temperature. The analysis of Passing & Bablok shows a correlation of r=0.994 and the following equation: y = 0.87x + 0.0043. In addition, 287 capillary blood samples spotted onto the filter paper has been compared with the corresponding EDTA-venous sample. The analysis of Passing & Bablok shows a correlation of r=0.95 (Spearman) and an equation of a=1 (IC 95% 0.957-1.00) and b=0.002 (IC 95% 0.002-0.0051).*

*The studied method allows measuring the HbA<sub>1c</sub> ratio with a very good precision on a drop of blood collected on filter paper using an HPLC system. Despite the excellent correlation coefficient the confidence intervals of intercept shows that the results obtained in measuring primary tube venous blood or capillary blood spotted on paper are not fully interchangeable so a new reference interval should be established for this new procedure.*

### Introducción

El término glicohemoglobina (GHb) agrupa una serie de estructuras químicas diversas, que tienen en común estar formadas por la unión de un azúcar a la molécula de hemoglobina por un átomo de nitrógeno (grupo amino). Entre ellas, la frac-

\*Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el XVIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, celebrado en Puerto de la Cruz, Tenerife el 19, 20 y 21 de Mayo de 1999.

<sup>1</sup>Laboratori Clínic Bon Pastor. DAP Sant Andreu. ICS. Barcelona.

<sup>2</sup>QA&AL Menarini Diagnostics. Sant Adrià del Besòs. Barcelona.

Abreviaturas no estandarizadas

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

ción  $A_{1c}$  es la que está mejor caracterizada y es la que es habitualmente se determina en el laboratorio.

La hemoglobina  $A_{1c}$  ( $HbA_{1c}$ ) es una molécula formada por la unión covalente entre el grupo amino N-terminal de la cadena  $\beta$  de la hemoglobina A ( $HbA$ ) y la glucosa. La determinación de la fracción de masa en sangre de la  $HbA_{1c}$  respecto a la hemoglobina, es de importancia fundamental en el seguimiento y control de la diabetes mellitus (1,2).

La reacción entre la glucosa y la  $HbA$  es un ejemplo de glicación no enzimática, un proceso que transcurre *in vivo* de forma lenta, continua e irreversible. Dado que la membrana del eritrocito es totalmente permeable a la glucosa, en el interior del mismo se va acumulando hemoglobina glicada a una velocidad que es proporcional a la concentración plasmática de glucosa. Este hecho convierte a la  $HbA_{1c}$  en un marcador fiable de la glicación de las proteínas sanguíneas y, consecuentemente, en una herramienta que permite al clínico la posibilidad de valorar de forma objetiva el control glucémico en las 8-12 semanas precedentes (3,4).

Habitualmente, la medida de la hemoglobina  $A_{1c}$  se realiza en muestras de sangre obtenida por punción venosa y recogida en un tubo (EDTA) que se envía al laboratorio donde se realiza la determinación de la fracción de masa por métodos cromatográficos o inmunológicos. En los últimos años, ha crecido el interés por la posibilidad de realizar determinaciones de esta magnitud a partir de sangre capilar y utilizando procedimientos de recogida de muestra que permitieran un transporte fácil de la misma, incluso con el objetivo de que fuera posible enviarla por correo. En este sentido, recientemente se han descrito métodos que permiten recoger sangre capilar en un soporte de papel de filtro que posteriormente es enviado al laboratorio para su análisis (5-10).

El objetivo del presente estudio es evaluar un procedimiento sencillo de recogida de sangre capilar sobre un papel de filtro para efectuar después la medida de la hemoglobina  $A_{1c}$  ( $HbA_{1c}$ ) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## Material y métodos

### Instrumentación

La determinación de la hemoglobina  $A_{1c}$  se realizó en el analizador Auto  $A_{1c}$  HA-8140 (Arkray-Menarini Diagnostics) que separa las fracciones de hemoglobina mediante cromatografía de intercambio iónico y efectúa su medida fotométrica 415 y 500 nm.

### Reactivos

Papel de filtro: Schleicher & Schuell 2992 (S&S).

Columna de intercambio iónico HA 8140 Column Unit: (Menarini Diagnostics; ref. U8720).

Eluyente A: (Menarini Diagnostics; ref. U8730)

Eluyente B: (Menarini Diagnostics; ref. U8731)

Eluyente C: (Menarini Diagnostics; ref. U8732)

Hemolizante 40H: (Menarini Diagnostics; ref. U8733)

### Especímenes

Los estudios de laboratorio, que incluyeron el análisis de la precisión, estabilidad y comparación preliminar se realizaron aplicando sangre venosa al papel de filtro. La sangre capilar se utilizó para realizar el estudio de correlación.

### Especímenes para la evaluación preliminar

En la evaluación preliminar del procedimiento se utilizaron tiras de papel S&S impregnadas con 15  $\mu$ L de la sangre de pacientes diabéticos que llegaba al laboratorio en tubos con

EDTA  $K_3$ , para la determinación de la  $HbA_{1c}$ .

Para el estudio de la precisión se efectuaron dos mezclas de sangres con diferente valor de hemoglobina  $A_{1c}$  (bajo y alto) y se impregnaron 30 tiras de papel de filtro para cada una de las mezclas.

El estudio de la estabilidad de la  $HbA_{1c}$  en la sangre depositada en el papel de filtro se efectuó impregnado 40 tiras con una sangre de valor no patológico y 40 tiras con una sangre de valor elevado de  $HbA_{1c}$ , manteniendo la mitad de ellas a 4°C y la otra mitad a temperatura ambiente durante 21 días.

La concordancia de resultados entre la sangre depositada en el papel de filtro y la procesada por el procedimiento habitual de laboratorio se realizó con muestras de sangre de 40 pacientes diabéticos.

**Especímenes para la evaluación de la aplicación clínica**  
El estudio de la concordancia de resultados se efectuó con sangre de 287 pacientes diabéticos, obtenida por punción capilar y recogida en el papel de filtro según las recomendaciones vigentes (11), en el mismo momento de la punción venosa para la extracción de sangre.

### Procedimiento

La elución de la sangre del papel de filtro se realizó manteniendo el papel sumergido durante 5 minutos en 1 mL de reactivo hemolizante 40H. El hemolizado obtenido se procesa inmediatamente en el analizador.

Para el estudio de la precisión intraserial se eluyó la sangre, después de mantener los papeles de filtro en tubo cerrado y a 4°C durante 5 días, de 20 tiras de un valor de  $HbA_{1c}=0,055$  y 20 tiras de un valor de  $HbA_{1c}=0,082$ , y se determinó la fracción de masa de la  $HbA_{1c}$  en cada una de ellas en una misma serie analítica. Para la repetibilidad interserial se eluían dos especímenes diarios (uno de valor normal y otro elevado), hasta un total de ocho. En ambos casos se calculó el coeficiente de variación analítica.

La estabilidad de las muestras absorbidas en el papel guardado a temperatura ambiente y a 4°C durante 21 días se estudió eluyendo la sangre cada 2-3 días. Se consideró no significativa una variación inferior al 5%.

La concordancia de resultados se valoró mediante el coeficiente de correlación de Spearman, y el método de Passing & Bablok, con sus correspondientes intervalos de confianza del 95%.

## Resultados

La tabla I muestra los resultados obtenidos en el estudio de la precisión intraserial e interserial para la determinación de  $HbA_{1c}$  de muestras de sangre absorbida en papel S&S.

**Tabla I. Precisión intraserial e interserial para la determinación de  $HbA_{1c}$  en muestras de sangre recogidas en papel de filtro**

	$n$	$\bar{x}$	$s$	CV (%)
Intraserial	20	0,055	0,000825	1,5
	20	0,082	0,00049	0,6
Interserial	8	0,055	0,00099	1,8
	8	0,082	0,00082	1

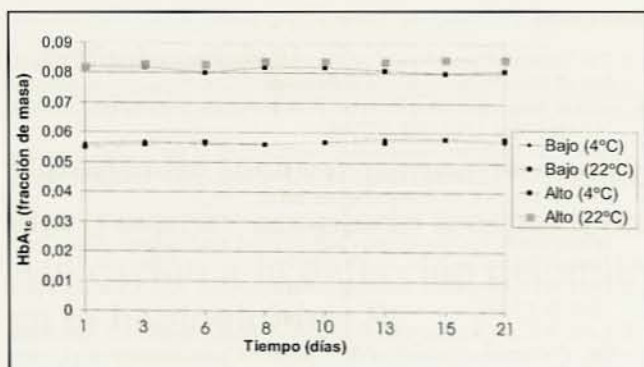


Figura 1. Estabilidad de la HbA<sub>1c</sub> en el papel de filtro. (La gráfica muestra los valores de HbA<sub>1c</sub> obtenidos tras eluir la muestra del papel, conservado a temperatura ambiente y en nevera, a lo largo de 21 días de conservación.)

La figura 1 muestra los valores obtenidos a lo largo de los 21 días, siendo las variaciones observadas inferiores al 5% en todos los casos. En la figura 2 se muestran los cromatogramas de una misma muestra de sangre recogida en papel y eluída del mismo a las 24 horas y a los 21 días respectivamente; como puede observarse no se detectan diferencias apreciables entre los mismos que puedan indicar algún tipo de alteración del espécimen medido. En el estudio preliminar de concordancia entre las dos muestras de sangre venosa entre un intervalo de 0,042 a 0,121 se obtuvo un coeficiente de correlación de Spearman  $r=0,99$  y unos valores de la recta de  $a=0,87$  (IC 95% 0,85-0,90) y  $b=0,0043$  (IC 95% 0,0024-0,0070).

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos en el estudio de comparación de porcentaje de HbA<sub>1c</sub> entre la sangre capilar recogida en el papel de filtro y la sangre venosa recogida con EDTA K<sub>3</sub> como anticoagulante. Se puede observar que se obtiene una pendiente de  $a=1$  (IC 95% 0,957-1,00) y una ordenada en el origen de  $b=0,002$  (IC 95% 0,002-0,00509). El coeficiente de correlación de Spearman hallado fue de  $r=0,95$ .

## Discusión

La precisión obtenida con el sistema de recogida de muestra aquí descrito, inferior en cualquier caso al 2%, es equivalente a la obtenida con el mismo instrumento en condiciones normales de trabajo (muestra de sangre venosa-EDTA K<sub>3</sub>). (12). Este hecho indica que los pasos adicionales de absorción de muestra en el papel y su posterior elución no repercuten negativamente en la precisión del sistema.

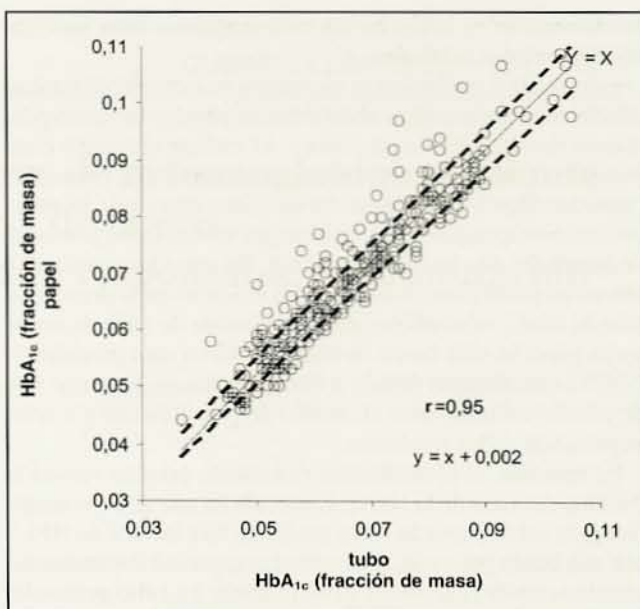
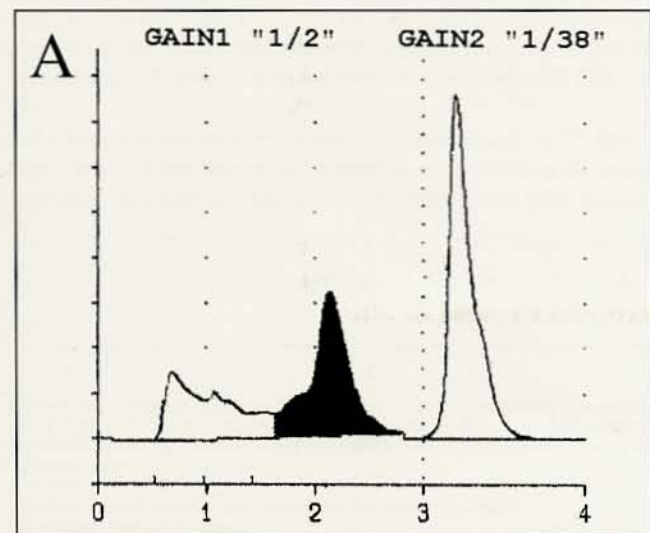


Figura 3. Comparación entre los resultados de HbA<sub>1c</sub> obtenidos en sangre capilar recogida en papel de filtro frente a las mismas muestras medidas directamente (análisis de Passing & Bablok)

Estudios previos (5,6) habían mostrado que las muestras de sangre absorbidas en papel experimentaban un incremento del valor de HbA<sub>1c</sub> conforme transcurría el tiempo desde la extracción. Posteriormente, se han desarrollado tratamientos alternativos del papel con el objetivo de minimizar este fenómeno, que permitirían una estabilidad de la muestra de varias semanas (7). En nuestras condiciones, el valor de HbA<sub>1c</sub> medido en las muestras de sangre venosa absorbidas en papel S&S sin ningún tipo de tratamiento ha mostrado mantenerse estable al menos durante 21 días tanto a 4°C como a temperatura ambiente (22°C).

Por otra parte, en nuestros estudios no se han apreciado alteraciones del cromatograma en la muestra absorbida en papel incluso después de haber transcurrido varias semanas. Otros autores han descrito la aparición de picos artefactuales, presumiblemente debidos a la formación de aductos entre la hemoglobina y el glutatión, que interfieren con la determinación, si bien en estos casos el sistema de HPLC utilizado era distinto del nuestro (6,8). Estas discrepancias entre nuestros resultados de estabilidad y las de otros autores, que pueden tener su origen en causas metodológicas diversas tales como la solución amortiguadora utilizada para realizar la elución de la muestra o

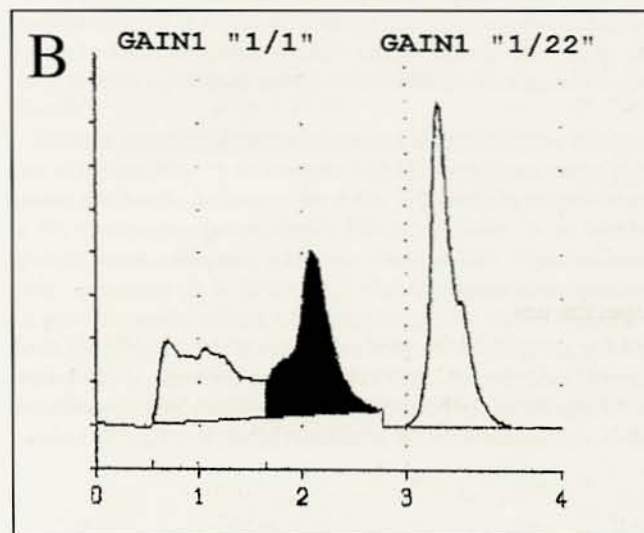


Figura 2. (A) Cromatogramas correspondientes a una muestra de sangre capilar recogida en papel y procesada por HPLC 24 horas después. (B) Cromatograma correspondiente a la misma muestra recogida en papel y eluída a los 21 días de la toma de la muestra.

las diferencias en la resolución cromatográfica entre sistemas no están todavía aclaradas.

Los estudios preliminares mostraron una excelente concordancia entre las muestras absorbidas en papel y las correspondientes muestras de sangre venosa. Al realizar el estudio comparando el valor obtenido en sangre capilar en 287 muestras (transcurridos 5-7 días desde la punción) absorbida en papel con su correspondiente valor en sangre venosa (tubo primario) se comprobó una buena correlación, sin error proporcional y con un pequeño error sistemático. La exactitud de la determinación de HbA<sub>1c</sub> ofrecida por diversas técnicas de toma de muestra en papel ha sido fuente de controversia en años precedentes (9,10) especialmente debido a discrepancias en cuanto al tipo de cálculo utilizado para el estudio de concordancia y a la interpretación de los resultados.

En resumen, el procedimiento estudiado permite valorar la fracción de masa de la HbA<sub>1c</sub> contenida en una gota de sangre recogida sobre papel de filtro mediante una técnica de HPLC con una buena precisión, y exactitud comparándola con las determinaciones realizadas directamente en tubo primario. Asimismo, se ha mostrado que las muestras así recogidas pueden conservarse durante varias días sin alteración aparente. Este hecho hace que sea posible plantear su uso para recoger y enviar muestras hasta el laboratorio. El sistema aquí descrito es simple y no requiere tratamientos o manipulaciones adicionales, ni en la toma de muestra ni en la elución de la misma antes su análisis, tal como es necesario en otros sistemas (13). Además, éste método puede ser utilizado simplemente como un sistema de toma de muestra capilar en el mismo laboratorio. En realidad, el simple hecho de poder realizar la determinación en sangre capilar puede suponer una ventaja en la medición de esta magnitud en algunos pacientes en los que la punción venosa es poco aconsejable (14).

En cualquier caso, y a pesar del excelente coeficiente de correlación hallado en la comparación de procedimientos, los intervalos de confianza de la ordenada en el origen muestran que los resultados obtenidos a partir de la sangre recogida en tubo y los de la sangre recogida en papel no son intercambiables, por lo que si se utiliza este nuevo procedimiento deben establecerse sus intervalos de referencia y en consecuencia sus valores discriminantes de buen control metabólico.

Correspondencia:  
T. Carrera Font  
Laboratori Bon Pastor  
C/ Mollerussa s/n  
08030 Barcelona

## Bibliografía

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
2. American Diabetes Association. Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes Study. *Diabetes Care*, vol 23 Supplement 1, Clinical practice recommendations 2000.
3. Goldstein D, Little R, Wiedemeyer H, England J, McEnzie E. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986;32:B64-B70.
4. John WG. Glycated haemoglobin analysis. *Ann Clin Biochem* 1997;34:17-31.
5. Little RR, McKenzie EM, Wiedemeyer HM, England JD, Goldstein DE. Collection of blood on filter paper for measurement of glycated hemoglobin by affinity chromatography. *Clin Chem* 1986; 32:869-71.
6. Baglin SK, Brown AS. Two capillary blood-collecton techniques for estimating glycohemoglobin compared. *Clin Chem* 1995; 41:330-2.
7. Little R, Goldstein D, Tenill A, Weidemeyer HM, Huang D, Schwartz SL, et al. Evaluation of a mail-in test for measuring HbA<sub>1c</sub> with capillary blood. *Clin Chem* 1999; 45: A33.
8. Jeppsson JO, Jerntorp P, Almer LO, Persson R, Ekberg G, Sundkvist G. Capillary blood on filter paper for determination of HbA<sub>1c</sub> by ion exchange chromatography. *Diabetes Care* 1996; 19:142-5.
9. Gay EC, Cruickshanks KJ, Chase HP, Klingensmith G, Hamman RF. Accuracy of a filter paper method for measuring glycosylated hemoglobin. *Diabetes Care* 1992; 15:108-10.
10. Taylor RP. Questionable accuracy of a filter paper method for measuring GHb. *Diabetes Care* 1993; 16:854.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Obtención de sangre sobre papel de filtro en programas de cribado neonatal: Normativa aprobada-Tercera edición. Documento NCCLS LA4-A3. Pennsylvania; 1997.
12. John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini ARKRAY HA 8140 hemoglobin A<sub>1c</sub> analyzer. *Clin Chem* 1997;43: 968-75)
13. Bognetti ER, Zoja A, Ciralli F, Chiumello G. HbA<sub>1c</sub> determination on capillary blood sample: validity, stability, and potential usefulness. *Diabetes Care* 1995; 18:1305-6.
14. Eckerbom S, Berqvist Y. Improved sample collection technique for capillary blood on filter paper for determination of glycated haemoglobin. *Ann Clin Biochem* 1989; 26:148-50.