

Evaluación de un nuevo método automatizado de cromatografía de afinidad con boronato para la determinación de glicohemoglobina

B. García García, I. Carretero Casimiro, A. Gómez del Campo, F. Cava Valenciano, E. Navarro Nieto

Resumen

Se describe la determinación de la fracción de glicohemoglobina mediante un nuevo método cromatográfico automatizado basado en el principio de la cromatografía de afinidad con boronato en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados obtenidos fueron altamente reproducibles, con unos coeficientes de variación intra e interseriales inferiores al 5% y una buena concordancia respecto a los resultados obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución basada en intercambio iónico.

La fracción lábil no interfiere en la cromatografía de afinidad con el ácido *m*-amino fenil borónico. Por tanto, este método es una alternativa atractiva para la cuantificación de glicohemoglobina.

Introducción

La determinación de la fracción de glicohemoglobina es considerada actualmente un procedimiento de rutina, ya que permite valorar el control metabólico mantenido por los pacientes con diabetes mellitus durante los dos o tres meses previos a la consulta, siempre que no coexistan situaciones clínicas como anemia hemolítica o hemoglobinopatías (1-4).

La hemoglobina (Hb) en su forma glicada se puede cuantificar como glicohemoglobina, formada por la condensación de glucosa al grupo amino de diferentes aminoácidos de las cadenas β de la hemoglobina (HbA₁). Cuando esa condensación se produce sobre el extremo NH₂-terminal del aminoácido valina da lugar a una fracción mayoritaria (HbA_{1c}) que corresponde aproximadamente al 80% del total de la HbA₁(5).

Existe un gran número de procedimientos válidos para la cuantificación de la glicohemoglobina que se diferencian en el principio de separación de la fracción glicada así como en la posibilidad de valorar separadamente una o más fracciones (6-8).

En este trabajo se ha evaluado un método automatizado basado en la cromatografía de afinidad con boronato. Se ha estudiado la repetibilidad, inexactitud, contaminación, recuperación, practicabilidad, así como la comparación de resultados con los obtenidos por cromatografía de alta resolución utilizando una columna de intercambio iónico.

Summary

Quantitation of glycohaemoglobin fraction by a new automated method, based on boronate affinity chromatography in a high performance liquid chromatography system, is described. Results were highly reproducible, with within-run and between-run coefficients of variation lower than 5% and a good agreement with results obtained by ion-exchange HPLC.

The labile fraction does not interfere the affinity with *m*-aminophenyl-boronic acid. Thus, this method is an attractive alternative procedure for glycohaemoglobin measurement.

Material y métodos

Instrumentación

El analizador utilizado fue el CLC330 TM (Primus Corporation, Kansas City, EEUU) que utiliza el principio de cromatografía de afinidad con boronato en un sistema de alta resolución. Todas las funciones están controladas por microprocesadores en un cromatógrafo líquido y un integrador computerizado (Hewlett Packard Company, EEUU). El integrador procesa la señal desde el detector espectrométrico y calcula la fracción de HbA₁ en relación a la hemoglobina detectada.

La comparación de resultados se realizó respecto a los obtenidos en un analizador automático (Hi-Auto A1c Daiichi HA-8121, Kogaku Co, Ltd, Kyoto, Japón), que realiza un proceso de separación basado en la cromatografía líquida de intercambio iónico. Con este sistema se determinan los siguientes constituyentes: HbA₁, HbA_{1c} y Hb fetal.

Procedimiento de medida

Las proteínas glicadas difieren de las no glicadas en que contienen un grupo 1,2-cis diol. Cuando una solución de proteínas pasa a través de la columna, los componentes glicados son retenidos mediante la fijación de los grupos diol con el ácido *m*-amino fenil borónico fijado a la matriz. Después de eluir los componentes no glicados no retenidos por la columna, los componentes glicados son eluidos de la columna con un reactivo que los desplaza del boronato. Posteriormente, ambos componentes pasan a través de un detector espectrométrico, donde son detectados a una longitud de onda de 413 +/− 2 nm. La hemólisis y dilución de las muestras se realiza en un solo paso, utilizando para ello un único reactivo (GHb Diluent/hemolysis) suministrado por la casa comercial. Tanto el proceso de hemolisis como de inyección en la columna está totalmente automatizado.

La medida de HbA₁ por cromatografía de afinidad de boronato, teóricamente, está libre de las interferencias más comunes como son las variantes de hemoglobina, modificaciones no glicadas y otros cromógenos. No requiere eliminar componentes lábiles (aldiminas o bases de Schiff), ya que sólo la hemoglobina glicada estable es retenida por el boronato.

Especímenes y materiales de control

Para el estudio de repetibilidad inter e intraserial se utilizó el material de control comercial suministrado por Primus Corporation, de valor bajo y medio y un espécimen de sangre con fracción de HbA₁ elevada recogido en tubo con EDTA K₃ como anticoagulante, correspondiente a un paciente diabético mal controlado. Estos especímenes fueron fraccionados en alícuotas y conservados a -18 °C hasta el momento de su determinación. El tiempo que los especímenes permanecieron congelados no fue en ningún caso superior a los 20 días necesarios para realizar el estudio de la repetibilidad interserial.

Protocolo de la evaluación

Este trabajo se atendrá al protocolo de evaluación de instrumentación de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) (9).

Repetibilidad

Para la repetibilidad intraserial se analizaron en la misma serie analítica 40 alícuotas de los materiales de control (alto, medio, bajo). Para la repetibilidad interserial se analizaron alícuotas de los mismos controles (alto, medio y bajo), durante 20 días consecutivos.

Comparación de resultados entre procedimientos

Se compararon los resultados obtenidos por el procedimiento en estudio y el de uso habitual en el laboratorio en 100 especímenes seleccionados de forma que aparecieran valores que se encuentran habitualmente en un trabajo rutinario. Se aplicó análisis de regresión simple para su mejor interpretación.

Contaminación por arrastre

Se estudió mediante la determinación de la fracción de glicohemoglobina en tres alícuotas de valor alto (A) (fracción del espécimen A: 0,141) seguidas por tres de valor bajo (B) (fracción del espécimen B: 0,05), dando lugar a la serie A₁, A₂, A₃, B₁, B₂, B₃. El proceso se repitió 10 veces en distintas series analíticas. El resultado medio de las diez pruebas de contaminación se calculó como porcentaje del valor del espécimen contaminante según la siguiente fórmula:

$$\text{Contaminación} = \frac{(\text{Fracción } [B_1] - \text{Fracción } [B_3])}{(\text{Fracción } [A_3] - \text{Fracción } [B_3])} * 100$$

Recuperación

La recuperación se realizó preparando diferentes mezclas de un espécimen con cantidades crecientes de glicohemoglobina. Se añadió cantidades crecientes de un calibrador de concentración alta de hemoglobina (2,48 mmol/L) y una fracción de glicohemoglobina de 0,141, a muestras de un espécimen de concentración baja (1,705 mmol/L y 0,052 respectivamente).

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:

$$\text{Recuperación} = 100 \frac{(F_m [V_1 C_1 + V_2 C_2] - F_2 V_2 C_2)}{V_1 C_1 F_1} * 100$$

donde:

F_m y F₂ = fracciones medidas de la mezcla y del espécimen de concentración baja de Hb.

V₁ y V₂ = volúmenes de los especímenes de concentración alta y baja de Hb.

C₁ y C₂ = concentraciones de Hb de los dos especímenes.

F₁ = fracción teórica de glicohemoglobina en el espécimen de concentración alta de Hb.

Valores de referencia

Para la producción de valores de referencia se analizaron especímenes obtenidos de 100 individuos presuntamente sanos, de ambos sexos, con una media de edad de 36 años (intervalo de 18 a 64 años), procedentes del banco de sangre, a los que previamente se les realizó una determinación de glucosa en suero, para excluir a posibles diabéticos. La extracción se realizó en tubos con EDTA K₃ como anticoagulante.

Análisis estadístico

En la comparación de resultados entre procedimientos se utilizó como medida de fuerza de la asociación el coeficiente de correlación de Pearson (*r*) y se ajustaron los valores a línea mediante regresión simple.

El estudio de intercambiabilidad de resultados entre procedimientos se realizó mediante el análisis de regresión no paramétrica de Passing y Bablok (10).

Para verificar la gaussianidad de la distribución se realizó una aproximación visual con la prueba de Wilk-Shapiro y se aplicó la prueba de Kolmogorov.

Resultados

En la tabla I se muestran los resultados de la repetibilidad intra e interserial para los tres especímenes analizados. Los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores a 2% excepto en un caso.

La figura 1 muestra la comparación entre los resultados obtenidos en ambos sistemas (Primus Corporation CLC330 TM y Daiichi Hi-AutoA1c). La correlación entre los resultados fue buena (*r*=0,98) y la intercambiabilidad fue estudiada mediante el análisis de regresión de Passing y Bablok obteniéndose la siguiente recta: Primus = a (Hi-AutoA1c) + b; a = 0,9943 (i. de c. = 0,9609-1,0277); b = 0,6252 (i. de c. = 0,3537-0,8919); donde a = pendiente, b = ordenada en el origen, i. de c. = intervalo de confianza del 95%. Los valores obtenidos indican que existen diferencias constantes entre los resultados obtenidos por ambos procedimientos.

La bondad de ajuste de los puntos sobre la recta de regresión fue evaluado mediante análisis de residuales obteniéndose un coeficiente de Durbin-Watson de 1,9508.

La contaminación entre especímenes obtenida fue del 0,44%.

Los datos del estudio de recuperación obtenidos tras la adición de cantidades crecientes de glicohemoglobina a una muestra fue de 96,85, 102,04 y 103,9%, respectivamente (tabla II).

La distribución para la población de referencia fue gaus-

Tabla I. Repetibilidad de la determinación de HbA_{1c} por el analizador CLC330TM

	n	\bar{x} (1)	s (1)	CV (%)
Intraserial	40	0,0551	0,00060	1,08
	40	0,0982	0,00150	1,52
	40	0,1360	0,00075	0,55
Interserial	20	0,0572	0,00089	1,55
	20	0,1041	0,00310	2,96
	20	0,1341	0,00190	1,41

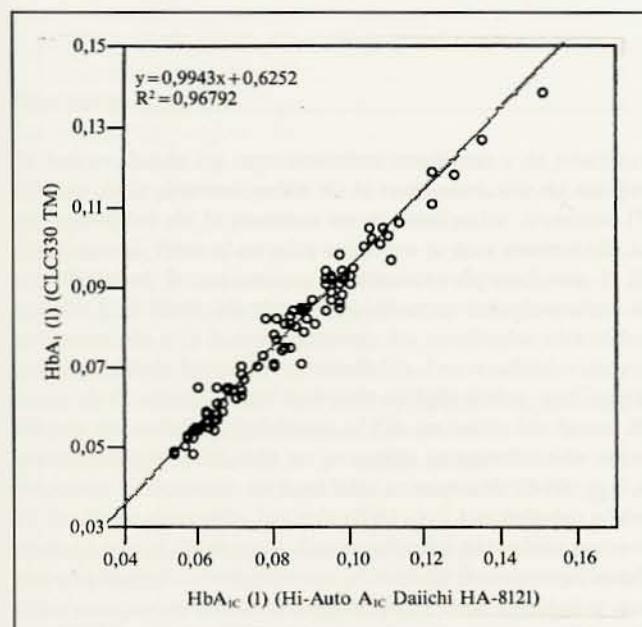


Figura 1. Comparación de procedimientos.

Tabla II. Estudio de recuperación

n = 6	\bar{F} (teórica)	\bar{F} (medida)	Porcentaje de recuperación (%)
Mezcla 1	0,0693	0,0685	96,85
Mezcla 2	0,0810	0,0820	102,04
Mezcla 3	0,1047	0,1080	103,90

\bar{F} = fracción media.

siana para la glicohemoglobina $z=0,731$ ($P=0,658$). Se definió el intervalo de referencia de la magnitud en estudio, según la técnica utilizada, como los valores correspondientes al percentil 2,5 y 97,5 respectivamente, resultando el siguiente intervalo para una población sana: (0,047-0,0585).

Discusión

La medida de la fracción de glicohemoglobina tiene gran importancia en el seguimiento del control metabólico del paciente diabético y por este motivo han aparecido numerosos métodos para su cuantificación, la mayoría de los cuales presentan buena correlación aunque existan diferencias entre ellos en lo que concierne a los componentes medidos y características de realización (11-15).

Los dos métodos más ampliamente utilizados para la determinación de glicohemoglobina son los que utilizan el intercambio iónico y el inmunoanálisis (4-17). Dadas las diferencias entre métodos es imprescindible no sólo la evaluación de los nuevos procedimientos que van apareciendo en el mercado sino también las comparaciones y correlaciones entre sus resultados. Considerando las ventajas teóricas en cuanto a especificidad y a menos interferencias de la cromatografía de afinidad es conveniente realizar estudios sobre la validez de la misma para el control de la población diabética (18).

El *National Diabetes Data Group* estableció en 1984 que ninguna metodología parecía ser superior a las demás y recomendaron que los coeficientes de variación intra e interserial deberían ser menores del 5%, siendo deseable evitar la interferencia de la fracción lábil (5). En la práctica clínica es importante que la repetibilidad analítica no contribuya con variaciones en la fracción de HbA_{1c} superiores a 0,01 (16). El método evaluado es reproducible, obteniéndose coeficientes de variación intra e interserial inferiores al 5%.

El procedimiento evaluado no permite la separación de las distintas variantes de la hemoglobina como lo hace la cromatografía de alta resolución por intercambio iónico, y por lo tanto da unos valores más elevados, pero para el control clínico de los pacientes es adecuado. La correlación entre los resultados obtenidos por el analizador CLC330 TM Primus Corporation y la cromatografía de alta resolución por intercambio iónico es buena ($r=0,98$), pero al compararlos mediante el análisis de regresión lineal de Passing y Bablok se observa que no son directamente intercambiables, ya que el concepto de «fracción HbA_{1c}» es distinto según el método utilizado; por lo tanto, al poner en marcha este nuevo procedimiento resulta imprescindible la determinación de nuevos valores de referencia.

En resumen, la medida de la fracción de glicohemoglobina mediante el analizador de CLC330 TM de Primus Corporation, si bien presenta una buena calidad analítica, no representa ninguna ventaja respecto a la cromatografía de alta resolución por intercambio iónico, por lo que la elección del método dependerá en cada caso de las características del laboratorio, así como de los costes y reactivos que se quieran utilizar.

Correspondencia:
B. García García
Laboratorio de Análisis Clínicos
Hospital N° S° de Sonsoles
Ctra. de Madrid, km 109
05001 Ávila

Bibliografía

- Javonovic L, Peterson CM. Clinical utility of glycosylated hemoglobin. *Am J Med* 1981; 70: 331-8.
- McDonald JM, Davis DE. Glycosylated hemoglobins and diabetes mellitus. *Human Pathol* 1979; 10: 279-91.
- Bun HF. Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. *Diabetes* 1981; 30: 613-7.
- Godstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986; 32: B64-70.
- Baynes JW, Bunn HF, Goldstein DE et al. National Diabetes Data Group.: Report of the Expert Committee on glycosylated hemoglobin. *Diabetes Care* 1984; 7: 602-6.
- Mayor TK, Freedman ZR. Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurement and their clinical utility. *Clin Chim Acta* 1983; 127: 147-8.
- Ashby JP, Deacon AC, Frier BM. Glycosylated hemoglobin measurement and clinical interpretation. *Diabetic Medicine* 1985; 2: 73-7.

8. John WG, Bullock DG, McKenzie F. Methods for the analysis of glycated hemoglobins: what is being measured. *Diabetic Medicine* 1992; 9: 15-9.
9. Buttner J, Borth R, Boutwrell JH, Broughton PMG, Bowyer RC. Approved recommendation (1978) on quality control in clinical chemistry. Part 2. Assessment of analytical methods for routine use. *Clin Chem Acta* 1978; 146F-62F.
10. 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: 709-20.
11. Pickup JC, Crook MA, Tutt P. Blood glucose and glycated haemoglobin measurement in hospital: which method? *Diabetic Medicine* 1993; 10: 402-11.
12. 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: 2.088-94.
13. Mortensen HB, Nielsens L, Segard V. Comparison of six assays for glycosylated haemoglobin determination. *Scand J Clin Lab Invest* 1983; 43: 357-62.
14. John WG, Albutt EC, Handley G. Affinity chromatography haemoglobin: comparison with two methods in routine use. *Clin Chim Acta* 1984; 136: 257-62.
15. Standing SJ, Taylor RP. Glycated haemoglobin: an assessment of high capacity liquid chromatographic and immunoassay method. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 494-505.
16. Lytken Larsen M, Blaabjerg O, Hytoft Petersen P. Analytical goal setting prior to selection of a method for glycated haemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 715-21.
17. Davis JE, McDonald JM, Jarett L. A high performance liquid chromatography method for haemoglobin A1c. *Diabetes* 1978; 27: 102-7.
18. Grande C, Buño A. Evaluation of a new method for the quantification of glycated haemoglobin. Ed. Abbot Diagnostics Educational Services. Abbot Park 1993; 23-4.