

Medida de fructosamina en suero como alternativa a la determinación de hemoglobina glucada en el control de la diabetes mellitus

A. Vernetta Porta^a, V. Álvarez Funes, J. Prat Quinzaños, J. Jiménez Villa

Resumen

El objetivo de este trabajo es comparar la determinación de fructosamina con la de hemoglobina glucada, como medida de control en los pacientes diabéticos.

Desarrollando la técnica de fructosamina según las instrucciones dadas por el fabricante para su adaptación al Centrifichem-600, hemos obtenido un coeficiente de variación intraserial de 2,5 % e interserial de 3,1 %, así como una correlación significativa entre fructosamina y hemoglobina glucada ($r=0,834$); y entre fructosamina y glucosa en suero ($r=0,838$).

Los valores de fructosamina de los pacientes diabéticos son significativamente más elevados que los de los pacientes no diabéticos ($P < 0,001$). Asimismo, los valores de fructosamina de los pacientes diabéticos con hemoglobina glucada superior a 0,08 son significativamente más altos que los de pacientes con hemoglobina glucada inferior a 0,08 ($P < 0,001$).

Podemos concluir que la determinación de fructosamina es una buena alternativa a la de hemoglobina glucada en el control del tratamiento de los pacientes diabéticos.

El valor de fructosamina que corresponde al de 0,08 para hemoglobina glucada es de 3,1 mmol/L.

Summary

The goal of this study was to compare fructosamine with glycated haemoglobin determinations, as quantities for diabetic patients management.

The fructosamine assay was performed according to the kit manufacturer instructions and adapted to the Centrifichem-600 analyzer. We have obtained an intra-run coefficient of variation of 2,5 % and an inter-run one of 3,1 %, and a significant correlation between fructosamine and basal glucose ($r=0,838$), and between fructosamine and glycated haemoglobin ($r=0,834$).

The mean fructosamine concentration in serum of diabetics is significantly higher than nondiabetic ($P < 0,001$). Also, the mean fructosamine concentration of diabetics with glycated haemoglobin $> 0,08$ is significantly higher than those with glycated haemoglobin $< 0,08$ ($P < 0,001$).

We can conclude that the fructosamine determination is a good alternative to the glycated haemoglobin in the control of the diabetics treatment.

The fructosamine value that correspond to the 0,08 from the glycated haemoglobin is 3,1 mmol/L.

Introducción

El seguimiento o control de los enfermos diabéticos se ha venido haciendo con diversas magnitudes bioquímicas, desde la determinación puntual de glucosa en suero y en orina, hasta los diferentes tipos de proteínas glucadas (albúmina, hemoglobina...)^{1,2,3,4,5,6,7}.

Más recientemente se ha propuesto la determinación de fructosamina en suero como medida retrospectiva de la glucación de proteínas^{8,9,10,11,12,13,14}.

^a Servei d'Anàlisis Clíniques
C.A.P. Cornellà
Bellaterra, 41
Cornellà de Llobregat, Barcelona

Los diferentes constituyentes analizados se distinguen por el tiempo en el que se controla la concentración de glucosa en sangre, dependiendo de la vida media de la proteína evaluada en la prueba¹⁵. Así, la determinación de glucosa en suero en ayunas refleja la concentración de glucosa en el momento de la extracción, la de albúmina glucada, unos treinta días anteriores, y la de hemoglobina glucada unos cien días. La concentración de fructosamina en suero es un índice del control intermedio de glucosa de 2 a 3 semanas.

Actualmente la hemoglobina glucada (Hb-A1 y Hb-A1c) es el constituyente más analizado para el control del tratamiento de la diabetes mellitus. Se determina por métodos cromatográficos, electroforéticos y espectrofotométricos, todos ellos difíciles de automatizar^{16,17}.

La glucación de proteínas en sangre se basa en dos etapas de reacción¹⁸:

1. Formación de bases de Schiff por enlace reversible entre glucosa y la proteína.

2. Formación de oxoamina irreversible (fig. 1).

La medida de estas proteínas glucadas, denominadas fructosaminas se basa en la reducción, en medio alcalino, del colorante azul de nitrotetrazolio (NBT) dando lugar a un formazán que presenta un máximo de absorción a 530 nm (fig. 2).

En nuestra experiencia evaluamos la determinación de fructosamina en un analizador centrífugo, estudiando la correlación respecto a concentración sérica de glucosa en ayunas, y respecto a Hb-A1 expresada como fracción de hemoglobina total.

Material y métodos

Pacientes

De los pacientes que habitualmente llegan a nuestro laboratorio seleccionamos 284, de los cuales 51 no eran diabéticos y el resto tenían un diagnóstico previo de diabetes mellitus.

A todos ellos se les determinó la glucosa y la fructosamina séricas y la Hb-A1 sanguínea.

Los pacientes diabéticos se distribuyeron en tres grupos según el valor de Hb-A1 resultante. De esta forma quedaron constituidos cuatro grupos según se refleja en la tabla I.

Aparatos

Las determinaciones de glucosa y de fructosamina se realizaron en un Centrifichem-600 de Baker con Pipetor-1000.

La hemoglobina glucada (Hb-A1) se cuantificó en un espectrofotómetro Beckman-42.

Análisis de fructosamina

Se realizó mediante el equipo de reactivos comercializado por Roche-Diagnósticos (referencia 0711217) con calibrador de desoxymorfolino-fructosa (DMF) 3,2 mmol/L y reactivo azul de nitrotetrazolio (NBT) 0,25 mmol/L en tampón NaHCO₃/Na₂CO₃ 0,1 mol/L, pH=10,35.

Las condiciones de adaptación al Centrifichem-600 se especifican en la tabla II.

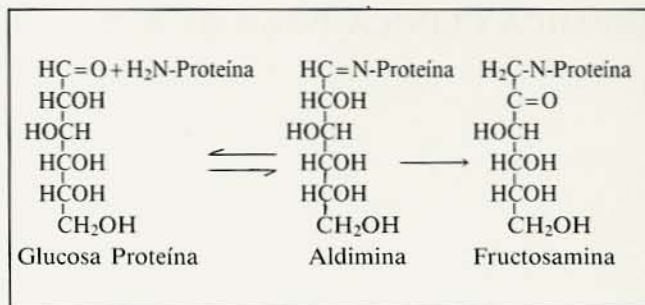


Figura 1. Formación de fructosamina por glucación no enzimática de proteínas

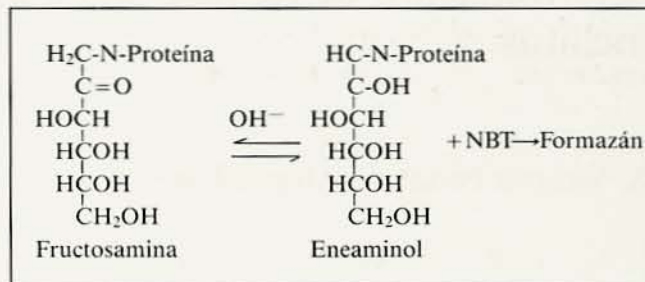


Figura 2. Reacción cromogénica de fructosamina

Análisis de Hb-A1

Se practicó la determinación cromatográfico-espectrofotométrica comercializada por Biosystems (referencia 11019), con eliminación de la fracción lábil o aldimina y con corrección de la temperatura a 23 °C.

Análisis de glucosa

Para la cuantificación de glucosa se utilizó la técnica de glucosa-oxidasa de Laboratorios Menarini (referencia B-7640).

Muestras

Para la determinación de glucosa y fructosamina se separó suero, que se congeló a -20 °C en espera de su análisis.

Para la Hb-A1 se usó sangre con ácido etilendiamino-tetraacético, sal dipotásica, analizada el mismo día de la extracción.

Tabla I
Grupos de estudio

Grupo	Hb-A1(I)	Número de casos
1. No diabéticos	< 0,08	51
2. Diabéticos	< 0,08	63
3. Diabéticos	> 0,08 < 0,10	68
4. Diabéticos	> 0,10	102
Total		284

Tabla II
Adaptación del método de determinación de la fructosamina al Centrifichem-600

Temperatura:	37 °C	Límite absorbancia:	2,0
Filtro:	550 nm	Volumen muestra:	20 µL
Tiempo inicial:	600 s	Volumen diluyente:	50 µL
Intervalo tiempo:	5 min	Volumen reactivo:	200 µL

Análisis estadístico

En primer lugar se estudió la imprecisión intra e interserial de las determinaciones de fructosamina y de Hb-A1.

La gaussianidad de la distribución de los valores de fructosamina se estudió con la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas con la prueba de Barlett.

La comparación de las medias de fructosamina se realizó con la prueba *U* de Mann-Whitney cuando se compararon dos grupos y con la de Kruskal-Wallis al comparar más de dos grupos.

La relación entre las variables cuantitativas se estudió mediante el análisis de regresión lineal simple.

Se aceptó como valor de significación el valor de *P* inferior a 0,05.

El análisis fue realizado en un microordenador IBM PC-XT, utilizando el paquete estadístico SPSS/PC+.

Resultados

Imprecisión de la determinación de fructosamina

La imprecisión intra e interserial se evaluó mediante una mezcla de sueros, y dos sueros de control comerciales liofilizados de valor desconocido (QAP-DADE), se efectuaron 20 determinaciones durante 5 días, cuyos resultados se expresan en la tabla III.

Imprecisión de la determinación de Hb-A1

La imprecisión intra e interserial se evaluó con tres sueros de control valorados (Boehringer-Manheim) a distintos valores, efectuándose 8 determinaciones durante 5 días, cuyos resultados se expresan en la tabla IV.

Comparación entre glucosa, Hb-A1 y fructosamina

Los resultados obtenidos para glucosa, Hb-A1 y fructosamina de los cuatro grupos de pacientes estudiados se reflejan en la tabla V. La prueba de Kolmogorov-Smirnov demuestra que se distribuyen de forma gaussiana.

En la figura 3 se muestran las rectas de regresión y los coeficientes de correlación de Pearson para las variables cuantitativas estudiadas.

Tabla III
Imprecisión de la determinación de fructosamina

Muestra	$\bar{x} \pm s$ (mmol/L)	CV %
Intraserial:		
Mezcla de sueros	2,64 ± 0,066	2,50
Control 1	6,42 ± 0,080	1,27
Control 2	7,58 ± 0,170	2,30
Interserial:		
Mezcla de sueros	2,71 ± 0,084	3,10
Control 1	6,47 ± 0,140	2,20
Control 2	7,98 ± 0,360	4,50

Tabla IV
Imprecisión de la determinación de Hb-A1

Muestra	$\bar{x} \pm s$ (l)	CV %
Intraserial:		
Control 1	0,091 ± 0,0017	1,85
Control 2	0,119 ± 0,0007	0,59
Control 3	0,169 ± 0,0028	1,67
Interserial:		
Control 1	0,087 ± 0,0028	3,22
Control 2	0,112 ± 0,0025	2,27
Control 3	0,173 ± 0,0033	1,90

La prueba de Barlett indica que las varianzas no son homogéneas, por lo que se procede a la comparación de las medias de los cuatro grupos mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, que demuestra que existen diferencias significativas entre ellas ($P < 0,001$).

La comparación de los valores de fructosamina entre pacientes diabéticos y no diabéticos, y entre diabéticos con Hb-A1 inferior a 0,08 y diabéticos con Hb-A1 superior a 0,08 se realizaron mediante la prueba de *U* de Mann-Whitney, cuyos resultados se reflejan en la tabla VI.

Discusión

El constituyente determinado actualmente en nuestro laboratorio para el control del tratamiento de los pacientes diabéticos es la hemoglobina glucada.

Debido al incremento en el número de peticiones de

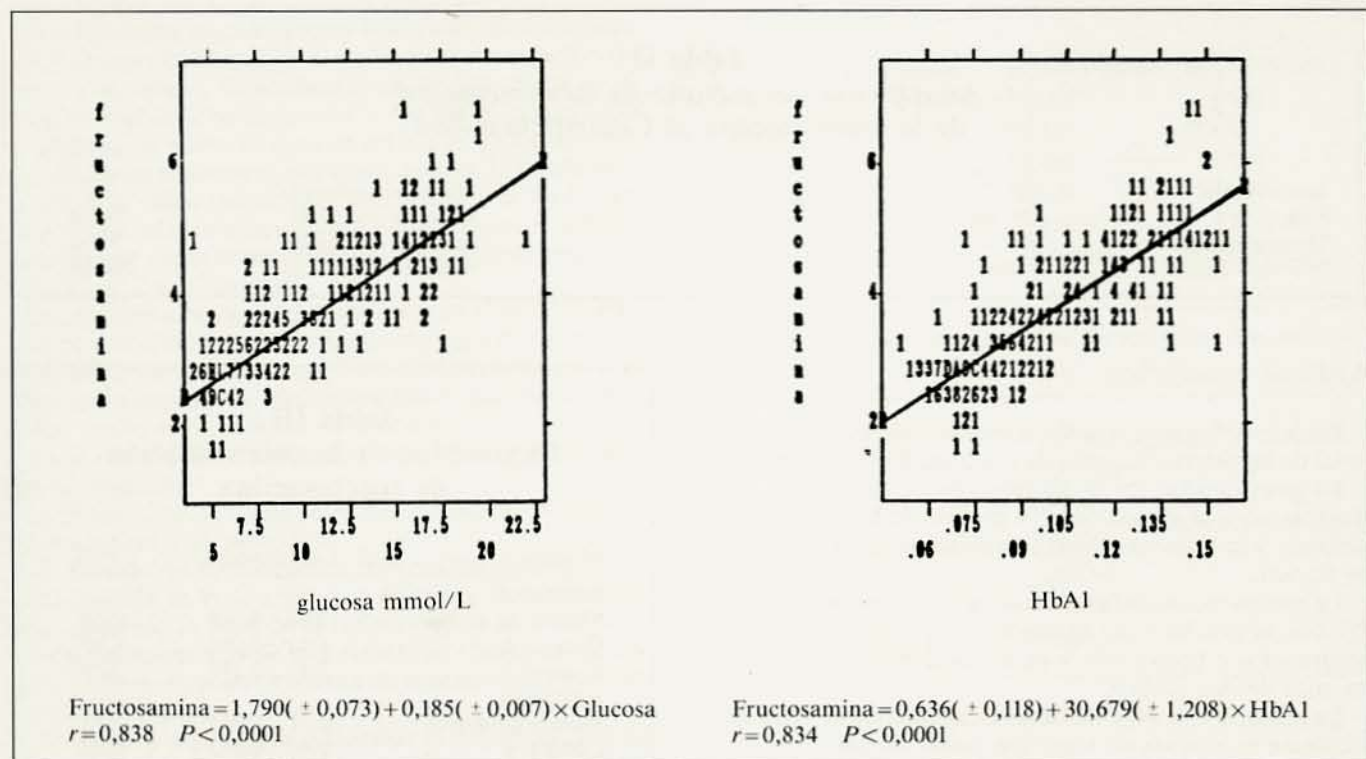


Figura 3. Rectas de regresión y coeficientes de correlación para las variables cuantitativas del estudio

dicha determinación y la dificultad de automatizarla, hemos optado por estudiar una magnitud alternativa: concentración de fructosamina en suero.

En primer lugar resaltaremos que esta determinación es fácilmente automatizable^{19,20,21,22,23}, requisito indispensable cuando el número de muestras diarias es considerable. En nuestro caso las determinaciones se han hecho en un Centrifichem-600, el cual permite un tiempo de preincubación de 10 minutos, imprescindible para evitar interferencias por otros reductores no específicos²⁴, y además podemos conseguir un control exacto de la temperatura a 37 °C, lo cual representa una ventaja más respecto a la realización manual de la determinación de Hb-A1 sujeta a las variaciones de la temperatura ambiente.

Como consecuencia de la automatización, el coste por determinación se reduce considerablemente, ya que disminuye el precio del reactivo y el tiempo empleado en el análisis.

A priori, uno de los inconvenientes que nos planteamos ante la posibilidad del cambio de magnitud bioquímica, es que fructosamina y Hb-A1 reflejan tiempos diferentes

en la concentración de glucosa en sangre. Sin embargo, debido al alto coeficiente de correlación obtenido entre ambas determinaciones, creemos que es posible realizar la medida habitual del control del tratamiento en enfermos diabéticos, mediante la determinación de fructosamina, dejando la de Hb-A1 como magnitud complementaria para algunos casos que presenten una especial dificultad.

Dado que existen diferencias significativas entre las medias de los valores de fructosamina de los cuatro grupos, se procede a estudiar dichos valores reagrupándolos en dos grupos: diabéticos (grupos 2, 3 y 4) y no diabéticos (grupo 1); y posteriormente reagrupándolos en diabéticos con Hb-A1 inferior a 0,08 (grupo 2) y diabéticos con Hb-A1 superior a 0,08 (grupos 3 y 4). En ambos casos la comparación de las medias da un resultado significativo. Por ello, podemos afirmar que la determinación de fructosamina discrimina bien entre la población de diabéticos y no diabéticos estudiada.

De la misma forma, creemos interesante resaltar que los enfermos diabéticos cuya Hb-A1 es mayor de 0,08 tienen igualmente una media de fructosamina significati-

Tabla V

Descripción de los valores de glucosa, Hb-A1 y fructosamina en los cuatro grupos de estudio

Grupo	Glucosa (mmol/L)	Hb-A1 (l)	Fructosamina (mmol/L)
1	5,11 (0,38)	0,0674 (0,0066)	2,69 (0,26)
2	6,08 (1,26)	0,0715 (0,0051)	2,76 (0,49)
3	8,68 (2,27)	0,0895 (0,0054)	3,42 (0,57)
4	14,17 (3,32)	0,1260 (0,0143)	4,52 (0,74)

Los valores se expresan como media y, entre paréntesis, desviación estándar

Tabla VI
Comparación de las medias de fructosamina

Grupo	<i>n</i>	<i>R</i>	<i>U*</i>	<i>P</i>
Diabéticos	233	160,3		
No diabéticos	51	61,1	1791,5	<0,001
Diabéticos con Hb-A1 >0,08 %	170	143,9	778	<0,001
Diabéticos con Hb-A1 ≤0,08 %	63	44,3		

*Valor de la *U* de Mann-Whitney

vamente mayor que aquellos cuya Hb-A1 es menor de 0,08, siendo el valor de fructosamina de 3,1 mmol/L el que se corresponde con el 0,08 de Hb-A1.

Por todo ello, proponemos la fructosamina como una determinación útil en el seguimiento y control del tratamiento de la diabetes mellitus.

Bibliografía

- Gabay KH, Hasty K, Breslow JL, Ellison RC, Bunn HF, Gallop PM. Glycosylated Hemoglobins and Long-Term Blood Glucose control in Diabetes Mellitus. *J Clin End Met* 1977; 44:859-864.
- Gonen B, Rubenstein AH, Rochman H, Tanega SP, Horwitz DL. Haemoglobin A1: an indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet* 1977; 734-736.
- Walinder O, Wibell L, Bostrom H. The clinical value of HbA1-determinations. *Act Med Scand* 1980; suppl 639:17-22.
- Goldstein DE, Parker KM, England JD, England JE, Hsiao-Mei Wiedmeyer. Clinical application of glycosylated hemoglobin measurements. *Diabetes* 1982; 31:70-78.
- Gascon F. La hemoglobina glicosilada: utilidad clínica. *Biométrica* 1984; 3:125-134.
- Van Diejen-Visser MP, Salemans T, Van Wersch JW, Schellekens LA, Brombacher PJ. Glycosylated serum proteins and glycosylated haemoglobin in normal pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1986; 23:661-666.
- Moore JC, Outlaw MC, Barnes AJ, Turner RC. Glycosylated plasma protein measurement by a semi-automated method. *Ann Clin Biochem* 1986; 23:198-203.
- Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982; 127:87-95.
- Baker JR, Johnson RN, Scott DJ. Serum fructosamine concentrations in patients with type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus during changes in management. *Br Med J* 1984; 288:1484-1486.
- Baker JR, Metcalf PA, Holdaway IM, Johnson RN. Serum fructosamine concentration as measure of blood glucose control in type I (insulin dependent) diabetes mellitus. *Br Med J* 1985; 290:352-355.
- Hindle EJ, Glenise M, Rostron, Gatt JA. The estimation of serum fructosamine: an alternative measurement to glycated haemoglobin. *Ann Clin Biochem* 1985; 22:84-89.
- Chalas J, Abella A, François P, Leluc R. Interet d'un nouveau marqueur du controle glycémique chez le diabetique: la fructosamine. Poster a Pont-à-Mousson, 1985.
- Stahl A, Clad E, Brogard JM. Index de fructosamine chez des sujets sains et des patients diabetiques. Pont-à-Mousson, 1985.
- Yong Seng Lim, Staley MJ. Measurement of plasma fructosamine evaluated for monitoring diabetes. *Clin Chem* 1985; 31:731-733.
- Lim Yong Seng, Staley MJ. Plasma fructosamine is a measure of all glycated proteins. *Clin Chem* 1986; 32:560.
- García C, Elduque A, Ginferre E, Baiget M. La hemoglobina glicosilada labil: importancia de su eliminación en el ensayo cromatográfico de las hemoglobinas glicosiladas. *Biol Clin Hem* 1982; 4:189-196.
- Moore JC, Bown E, Outlaw MC, Jelfs R, Holman RR, Turner RC. Glycosylated haemoglobin: comparison of five different methods, including measurement on capillary blood samples. *Ann Clin Biochem* 1986; 23:85-91.
- Rietz P, Heerspink W, Miedema K, Morger F, Schwaninger J, Eisenwiener HG. Fructosamine, a new parameter in the control of diabetes? Roche Diagnósticos.
- Lloyd D, Marples J. Simple colorimetry of glycated serum protein in a centrifugal analyzer. *Clin Chem* 1984; 30:1686-1688.
- San-Gil F, Schier GM, Moses RG, Gan IET. Improved estimation of fructosamine, as a measure of glycated serum protein, with the Technicon RA-1000 Analyzer. *Clin Chem* 1985; 31:2005-2006.
- Baker JR, Metcalf PA, Johnson RN, Newman D, Rietz P. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin Chem* 1985; 31:1550-1554.
- Oosterom R, de Lijster J, Boerma GJM. In measuring fructosamine in the Cobas Bio and RA-1000, a shorter pre-incubation is feasible. *Clin Chem* 1986; 32:1984.
- Vega L, Gómez del Campo A, González JM, Navajo JA. Adaptación de la determinación de fructosamina en suero como medida de glicosilación proteica a un analizador Hitachi 705. *Rev Diag Biol* 1986; 35:243-248.
- A 10-min pre-incubation is required for measurement of fructosamine in plasma. *Clin Chem* 1986; 32:403.