



Fundación JL Castaño
SEQC

SEQC^{ML}

Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2018-2019

CASOS CLÍNICOS DE PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL LUGAR DE ASISTENCIA (POCT)

Ed. Cont. Lab. Clin 41: 34 - 40

INTERFERENCIA EN LA MEDICION DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA: A PRÓPOSITO DE UN CASO.

Immaculada Domínguez Pascual.

Servicio Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Virgen del Rocío.

José Ángel Noval Padillo.

Servicio Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Virgen del Rocío.

EXPOSICIÓN DEL CASO

Varón de 61 años de edad con historia clínica de diabetes tipo 2 descompensada, que acude a su centro de Atención Primaria para una visita de rutina. Se le solicita un estudio analítico básico que incluye perfil básico, perfil hepático, perfil lipídico, hemograma y junto a esas determinaciones la hemoglobina glicosilada (HbA1c).

El paciente presentó una glucemia de 219 mg/dl (70-110) mg/dl y una HbA1c inesperada de 6,2% (4-6%) obtenido por un equipo de High-performance liquid chromatography (HPLC) con tiempo de elución corto y con un cromatograma, que presenta un pico desconocido que eluye después de la HbA1c, con un tiempo de retención de 0.77 min. pero no con un área sospechosa de variante de hemoglobina (figura 1).

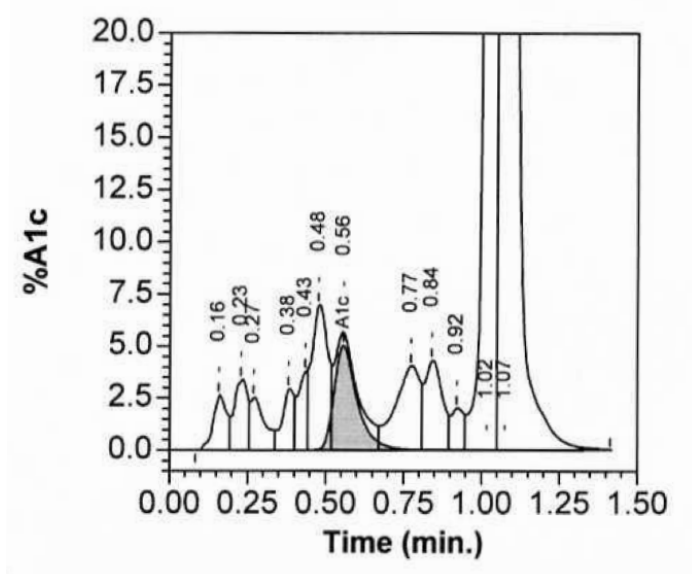


Figura 1.

DETERMINACIONES COMPLEMENTARIAS.

En la tabla 1 y 2 se muestran los resultados obtenidos de la bioquímica y hemograma del paciente en estudio

Serie blanca	Valores	Unidades
Leucocitos	7,5	x10 ⁹ /l
Linfocitos	26,9	%
Linfocitos valor absoluto	2	x10 ⁹ /l
Monocitos	5,1	%
Monocitos valor absoluto	0,4	x10 ⁹ /l
Neutrófilos	63,7	%
Neutrófilos valor absoluto	4,8	x10 ⁹ /l
Eosinófilos	4,1	%
Basófilos	0,2	%
Serie roja		
Hematíes	4,2	x10 ¹² /l
Hemoglobina	14	g/dl
Hematocrito	41,2	%
Volumen corpuscular medio (VCM)	97,6	fl
Concentración HGB Corpuscular Media (HCM)	33,9	g/l
Hemoglobina Corpuscular Media	33,1	pg
Ancho Distribución Hematíes (RDW)	13,4	%
Plaquetas	204	x10 ⁹ /l
Volumen Plaquetar Medio	8,8	fl
Reticulocitos	1,2	%

Tabla 1: Resultados del hemograma del paciente diabético estudiado, fl: fentolitros, pg: picogramos.

El valor de la HbA1c no concuerda con otros indicadores del control metabólico y hematológico, un valor de fructosamina de 397 micromol/L (150-285 micromol/L), ausencia de anemia y test de la función hepática normal.

Prueba	Valores	Unidades	V.R.
Glucosa	219	mg/dl	70-110
Fructosamina	397	µmol/l	150-285
Urea	41	mg/dl	10,1-40,1
Creatinina	1,06	mg/dl	0,5-1,1
Proteínas totales	8	g/dl	6,5-8
GOT	38	UI/l	10,1-37,1
GPT	40	UI/l	10,1-40,1
GGT	76	UI/l	10,1-50,1
F. Alcalina	45	UI/l	40,1-130,1
Bilirrubina total	0,59	mg/dl	0,10-1,20
Sodio	142	mEq/l	135-145
Potasio	4,3	mEq/l	3,5-4,5

Perfil Lipídico			
Colesterol	138	mg/dl	150-200
Triglicéridos	105	mg/dl	70-170

Tabla 2: Resultados de la bioquímica del paciente diabético estudiado. UI/l: unidades internacionales por litro. mEq/l: miliequivalentes por litro. V.R: valores de referencia.

Para confirmar ese valor, se procesó la muestra por el equipo de HPLC con tiempo de elución de tres minutos (VARIANT TURBO II), obteniendo otro inesperado valor de HbA1c 6.2%. Además el cromatograma obtenido mostró picos anómalos: un pequeño pico después de la HbA1c con un tiempo de retención de 1,23 min y un pequeño pico antes de la HbA0 que no se distinguía con claridad y con una mayor resolución se observó mejor (figura 2). Este pico se presentó en todos los cromatogramas obtenidos del paciente e interfiriendo con el cálculo correcto de la fracción de HbA1c y estuvo presente independiente del instrumento o tiempo de análisis usado (1,5min-3min).

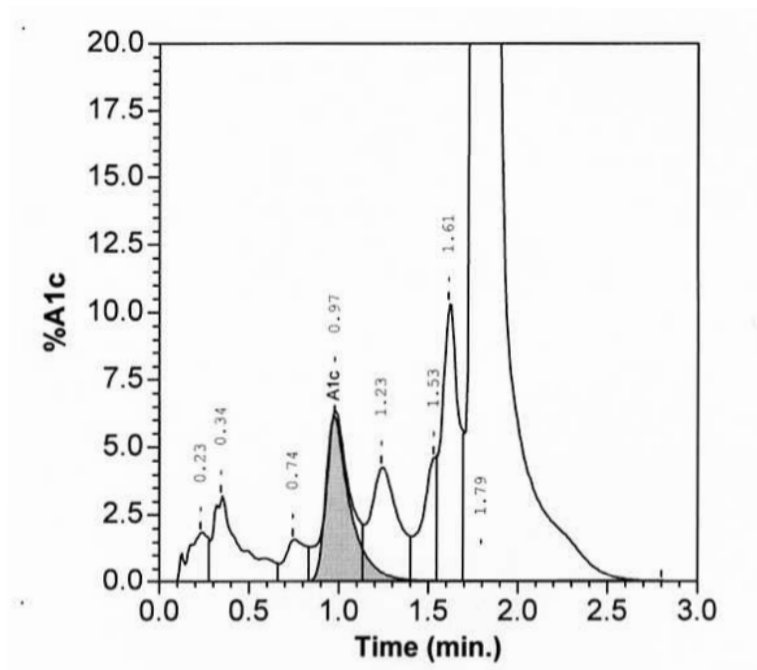


Figura 2: Cromatograma obtenido del equipo de HPLC con tiempo de análisis de 3 minutos.

Para descartar posibles interferencias preanalíticas, se solicita una nueva muestra al paciente. En el nuevo análisis que se realizó con la muestra recién extraída del paciente se observó de nuevo picos anómalos: un pico posterior a la HbA1c muy unido a ella, no conocido y que habitualmente no se observa, así como un pico delante de HbA0 que tuvo que ser ampliado para observarse bien (figura 3, tabla 3).

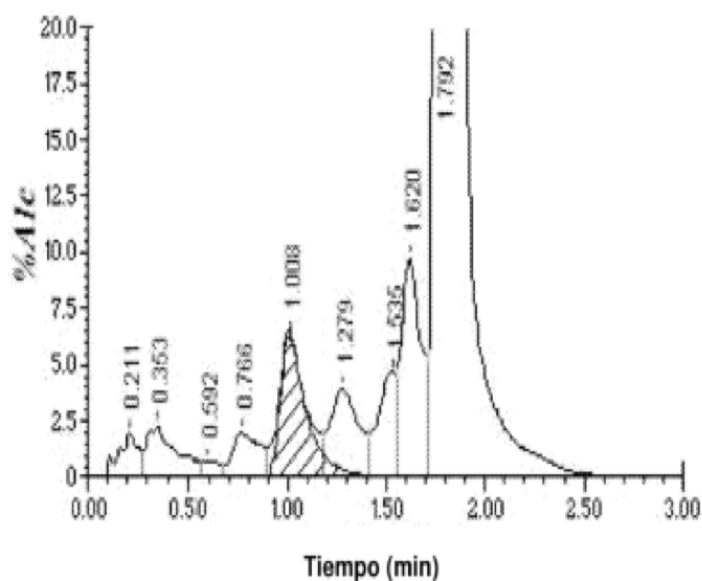


Figura 3: Cromatograma obtenido del equipo HPLC con tiempo de análisis de 3 minutos.

Hb correspondiente al pico	Área calibrada (%)	Área (%)	Tiempo retención (min)	Área pico
HbA ₁ a	---	0,9	0,21	26.613
HbA ₁ b	---	1,6	0,35	46.994
HbF	---	0,3	0,59	9.334
HbLA ₁ c	---	1,2	0,77	36.882
HbA ₁ c	6,4	---	1,01	117.391
Desconocida	---	2,6	1,28	77.769
HbP3	---	2,0	1,53	59.741
HbP4	---	4,4	1,62	130.791
HbA0	---	83,1	1,79	2.484.957
Área total:				2.990.472

Tabla 3: Resultados de las Hemoglobinas detectadas mediante HPLC en el paciente diabético estudio.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EN LA MEDICIÓN DE HbA_{1c} DE POINT OF CARE.

Procesamos la muestra por dos métodos alternativos de Point of Care, afinidad de boronato (AFINION), considerándolo el método de referencia y por inmunoensayo (DCA system) los cuales no presentan este tipo de interferencias, lo que ofreció un resultado de un 8,4% por el AFINION y un 8,1 % por el DCA System (tabla 4) que fueron más acorde con la concentración de glucosa obtenida.

HbA _{1c} % informada	VARIANT II	DCA system	Afinion
8.4	6.4	8.1	8.4

Tabla 4: Valores de HbA_{1c}, obtenidos por diferentes métodos.

La suma del área de los picos mostrados en el cromatograma (el pico desconocido y el pico correspondiente a la HbA1c) resultaba en un valor muy similar al ofrecido por la determinación por afinidad de boronato y por inmunoensayo (6,4+ 2,6= 9%).

Dado que el pico desconocido no se identificaba con ninguna hemoglobinopatía conocida en las bases de datos de los equipos de High-performance liquid chromatography (HPLC) utilizado en nuestro laboratorio asistencial, no se observaba mediante el diagnóstico realizado con la tecnología de otros equipos con la misma metodología y la discrepancia entre los resultados de HbA1c de los equipos de HPLC y los equipos de Point of Care, nos encontramos con la sospecha de una nueva variante de hemoglobina.

Según los resultados obtenidos, decidimos realizar la caracterización estructural y funcional de pico desconocido.

BIBLIOGRAFÍA

Sacks DB, Arnold M, Barkis GL, bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. Clin Chem 2011;57:e1-e47.

Valenstein PN, Sirota RL. Identification errors in pathology and laboratory medicine. Clin Lab Med 2004; 24: 979-996, vii Albright ES, Ovalle F, Bell DS. Artificially low hemoglobin A1c caused by use of dapsone. Endocr Pract 2002; 8: 370-372.

Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. Acta Haematol 2004; 112: 126-128.

C W Weykamp, T J Penders, F A Muskiet, and W van der Silk. Influence of haemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. Clinical chemistry 1993; v.39, p.1717-23

Sicard DA, Taylor JR. Comparison of point-of-care HbA1c test versus standardized laboratory testing. The Annals of Pharmacotherapy 2005;39:1024-1028.

COMISIÓN DE PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL LUGAR DE ASISTENCIA (POCT)

Paloma Oliver (*Presidenta*), Ricardo Alonso, Cristina Andrés, José Luis Bedini, M^a Pilar Bueno, Javier Lirón, M^a Jesús Lorenzo, Xavier Navarro, José Ángel Noval, Fernando Rodríguez, Catalina Sánchez.

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi, N. Giménez, A. Merino, A. Peña, N. Rico (*Presidenta*), M. Rodríguez, T. Rodríguez, P. Rodríguez, C. Sánchez, M. Serrando, MC. Villà, JA. Wong.

ISBN 978-84-09-02921-1 – Febrero 2019 (recibido para publicación Junio 2018)

RESOLUCION DEL CASO

Se realizan nuevos estudios para la caracterización del pico desconocido.

El estudio de la movilidad electroforética de la hemoglobina se efectúa mediante electroforesis en acetato de celulosa a pH alcalino (pH, 8.6).

El estudio de las cadenas se realiza mediante HPLC (RP-HPLC) de fase inversa usando un columna Vydac C4 de poro grande y un gradiente lineal desde 47% a 100% de fase B en 80 minutos a un flujo de 1mL/min (fase A=30% acetonitrilo, 0.3% ácido trifluoroacético (TFA) en agua; fase B=70% de ácido acetonitrilo en agua)..

En los estudios ulteriores la electroforesis a pH alcalino y ácido, no se evidenció una hemoglobina anormal, siendo las propiedades de unión al oxígeno idénticas a la de la hemoglobina A y los test de inestabilidad normales. Sin embargo, el estudio de cadenas de globina por HPLC en fase inversa mostró tres picos de la muestra paciente, un pico de cadena Beta, un pico de cadena alfa correspondientes a las cadenas normales alfa, y otro pico de cadena beta que eluye antes de lo esperado y de igual tamaño que el pico de la cadena beta normal, sugiriendo la presencia de una variante heterocigoto para la cadena beta.

En la secuenciación del DNA , se presentó la mutación CTC>TTC en el codón 81 del gen Beta en estado heterocigoto, que determina el cambio del aminoácido Leucina por Fenilalanina en la posición 81 de la cadena Beta sintetizada por el alelo mutado (B81(CTC>TTC) LEU>PHE). Siendo un nueva variante estructural, la cual se denominó Hemoglobina Sevilla.

La "hemoglobina Sevilla "es el tercer caso de variante estructural de la hemoglobina con un cambio en la posición 81 de la cadena Beta-globina. En este caso, la mutación leucina por fenilalanina, no interfiere ni en la función ni estabilidad de la hemoglobina, porque el cambio involucra la sustitución de un aminoácido apolar hidrofóbico (LEU) por otro con las mismas características (PHE). Sin embargo, la sustitución de la leucina en esta posición conduce a cambios estructurales en la molécula que han permitido esta detección por los métodos cromatográficos. Esta variante influye infravalorando el resultado de hemoglobina glicosilada obtenido con los métodos de HPLC a distintos tiempos de elución pero no por los equipos POCT estudiados, AFINION y DCA system.

Es importante diseñar un protocolo estandarizado para los laboratorios clínicos que utilicen el HPLC para la determinación de HbA1c con el fin de identificar picos anómalos y rechazar los valores obtenidos. Existen variantes de la Hemoglobina aún desconocidas que interfieren en la exactitud de estos métodos, por lo que es necesaria su identificación para determinar los valores de la HbA1c en los individuos que las expresan, con el fin de mejorar así los métodos de diagnóstico y/o seguimiento de la diabetes mellitus en estos pacientes. En estos casos, no es apropiado el uso de la metodología HPLC. Cuando ocurre esto, la muestra debe ser analizada por un método basado en otro principio de determi-

nación que no esté influenciado por esta variante como es el caso de la cromatografía de afinidad o inmunoensayo, disponible en los equipos de Point of Care para determinación de HbA1c.

La interferencia por la presencia de una variante es un problema importante teniendo en cuenta que se han identificado más de 700 variantes de hemoglobinas. Cada método de determinación de la HbA1c, puede verse afectado en mayor o en menor medida por las numerosas variantes de Hemoglobina, que interfieren en el análisis. Los resultados pueden verse falsamente aumentados o disminuidos, dependiendo del método y de la variante presente.

La utilización de un método inadecuado para la determinación de HbA1c, puede producir la medición incorrecta en un gran número de portadores heterocigotos de alguna variante de Hemoglobina, por lo que, a la hora de seleccionar un analizador de HbA1c para el laboratorio clínico habría que considerar la prevalencia de hemoglobinopatías en la población y la posible interferencia en el método utilizado. Diversos grupos de expertos afirman que no es recomendable informar los valores de HbA1c en sujetos diabéticos con variantes de hemoglobinas.

La búsqueda de estrategias por parte del laboratorio, como la combinación en el laboratorio asistencial de la tecnología HPLC junto con los equipos de Point of Care, hace que podamos monitorizar correctamente con la determinación de HbA1c, a los pacientes diabéticos portadores heterocigotos de alguna variante de Hemoglobina tanto conocida como desconocida, eliminando factores colaterales para una correcta interpretación en los resultados de HbA1c.