

NOTA TÉCNICA

Evaluación de un método POCT (pruebas a la cabecera del paciente) para la determinación de hemoglobina glucosilada

Ana María Fernández Ramos*, Gemma Cobos Muñoz, Alejandra Aguilera Castillo y Alfredo Enguix Armada

Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Virgen de la Victoria, Málaga, España

Recibido el 24 de septiembre de 2008; aceptado el 22 de abril de 2009

Disponible en Internet el 27 de junio de 2009

PALABRAS CLAVE

Hemoglobina glucosilada (HbA1c);
Método de medida;
Pruebas a la cabecera del paciente;
Diabetes

Resumen

Introducción: La hemoglobina glucosilada (HbA1C) presenta un papel fundamental en el control y prevención de complicaciones en el paciente diabético, puesto que permite la monitorización de sus valores de glucemia en los 3 meses previos al análisis. Debido a la importancia de su determinación han aparecido diferentes métodos de cuantificación. El objeto de este trabajo es evaluar el método POCT (*point of care testing* 'pruebas a la cabecera del paciente') mediante el aparato In2it de Bio-Rad.

Material y métodos: Se realizó una comparación entre 2 métodos de cuantificación: el HPLC (*high-performance liquid chromatography* 'cromatografía líquida de alta resolución o de alta presión') (ADAMS-A1c HA-8160, Menarini Diagnostics, Florencia, Italia) y el POCT (In2it, Bio-Rad, California, EE.UU.). Para esto, se compararon los resultados de 60 muestras, además de determinar la imprecisión intraserial y la imprecisión interdiaria de ambos aparatos.

Resultados: La comparación entre ambos métodos mostró una buena correlación entre el HPLC y el POCT: $Y = 0,4000 + 1,000 X$. Los intervalos de confianza del 95% para la coordenada en el origen y la pendiente fueron de $-0,1500$ a $0,6500$ y de $0,9565$ a $1,0769$, respectivamente.

La imprecisión intraserial se situó entre el 2,5 y el 3% (del 2,20 al 3,04%) y la imprecisión interdiaria se situó entre el 3,53 y el 2,95% para valores altos y bajos, respectivamente.

Discusión: El método POCT ha demostrado cumplir todos los requisitos técnicos necesarios para su validación como método para la determinación de la HbA1C, ya que presenta igualdad de prestaciones analíticas con el método HPLC. Además, es apropiado para el seguimiento de pacientes diabéticos en atención primaria, dada su facilidad y sencillez de manejo.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: AMFRLAB@telefonica.net (A.M. Fernández Ramos).

KEYWORDS

HbA1c;
Evaluation
methodology;
Point of care testing;
Diabetes

Evaluation of a POCT (point of care testing) assay for haemoglobin A1c**Abstract**

Introduction: The HbA1c is related to the control and prevention of complications in diabetics. This parameter enables glucose control to be monitored in the three months previous to the determination.

Due to the significance of its determination, different measurement methods have been developed. The aim of this work is to evaluate the POCT (point of care testing) method used by the In2it BioRad.

Material and methods: We report on a comparison between two methods: a HPLC (high-performance liquid chromatography) (ADAMS-A1c HA-8160, Menarini) and the POCT test (In2it, BioRad). To determine the within and between day imprecision, 60 samples were analysed and compared.

Results: Both methods showed good correlations ($Y = 0.4000 + 1.000 X$). The 95% confidence intervals for the coordinate at the origin and the slope were (-0.1500 to 0.6500) and (0.9565 to 1.0769), respectively. Within day imprecision was 2.5–3% (2.20–3.04%) and between day imprecision was 3.53% and 2.95% for high and low values, respectively.

Discussion: The POCT test (BioRad System) has demonstrated that it fulfils all the technical requirements needed for its validation as an HbA1c analysis method as it has a similar performance to the HPLC method. The POCT method has shown to be suitable for the follow-up of diabetic patients in primary care due to its ease and simplicity of use.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La hemoglobina glucosilada (HbA1C) es el resultado final de la interacción no enzimática y prácticamente irreversible entre los grupos aldehído de la glucosa unidos covalentemente a las valinas de los extremos N-terminales de las cadenas β ; sus concentraciones son directamente proporcionales a la concentración de glucosa existente en el medio debido a la permeabilidad de su membrana.

La hemoglobina está constituida por 3 fracciones: HbA2 (2,5%), HbF (0,5%) y HbA1 (97%); esta última está formada, a

su vez, por 3 subfracciones, la HbA1a (15%), la HbA1b (5%) y la HbA1C (80%), una fracción final estable que gracias a esta característica permite una buena monitorización de la glucosa a largo plazo y no presenta las fluctuaciones a las que se ven sometidas las determinaciones puntuales de glucosa.

La monitorización de HbA1C empezó a cobrar importancia en 1986 cuando la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomendó la realización de 2 mediciones anuales de HbA1C para el seguimiento de la enfermedad diabética. Este objetivo se reafirmó en 1993 con la publicación del estudio DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) en el que, además, se advertía de la importancia del control de la HbA1C para la prevención y el retraso de posibles complicaciones, fundamentalmente microvasculares (nefropatía, retinopatía, etc.) en pacientes diabéticos^{1,2}.

De acuerdo con las recomendaciones de la ADA para el empleo de los métodos POCT (*point of care testing* 'pruebas a la cabecera del paciente') en la determinación de HbA1C se realiza la comparación entre un método POCT (In2it, BioRad) (fig. 1) y uno ampliamente validado y empleado, como es el HPLC (*high-performance liquid chromatography* 'cromatografía líquida de alta resolución o de alta presión') (ADAMS-A1c HA-8160, ARKRAY, Menarini Diagnostics)³.

Los métodos POCT para la determinación de la HbA1C representan una gran ventaja en el seguimiento de la enfermedad diabética debido a la obtención de la muestra por punción capilar, lo que evita posibles daños derivados de la extracción venosa, que pueden dificultar extracciones posteriores, y a la cercanía del método con el paciente, lo que permite el ajuste del tratamiento y la toma de decisiones de un modo prácticamente inmediato, y así reduce de modo considerable el tiempo de respuesta analítico.



Figura 1 Imagen del aparato In2it (Bio-Rad).

Material y métodos

Instrumentación

El análisis por HPLC que efectúa el aparato ADAMS-A1c-HA-8160 emplea la HPLC mediante intercambio de cationes en columnas de fase reversa y posterior detección mediante colorimetría a doble longitud de onda (415–500 nm), y se basa en la menor carga positiva de la fracción A1C (glucosilada) respecto a la no glucosilada^{4,5}.

El método de la cromatografía de afinidad con boronato efectuado en el aparato In2it se basa en lisar la sangre, mezclarla e incubarla; de este modo, se une la HbA1C a la resina de afinidad con boronato y se procede a recoger y medir por fotometría la fracción no glucosilada. Posteriormente, se libera una solución de lavado para la resina de afinidad y, por último, un tampón de elución que separa la fracción glucosilada de la resina de afinidad para que pueda recogerse y medirse por fotometría a una longitud de onda de 440 nm⁶.

Reactivos

La HPLC por intercambio iónico de fase reversa efectuada con el aparato ADAMS A1c HA-8160 emplea los reactivos que suministra el fabricante⁵. La calibración se realiza de acuerdo con el método de referencia IFCC WG HbA1C (Internacional Federation of Clinical Chemistry Working Group).

La cromatografía de afinidad con boronato efectuada con el aparato In2it (I) emplea los reactivos que suministra el fabricante⁶ y para la calibración sigue las recomendaciones de la DCCT.

Procedimiento

En el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (Málaga) se procedió a valorar la técnica de cromatografía de afinidad con boronato efectuada en el aparato In2it (I) mediante la determinación de la precisión intraserial y de la imprecisión interdiaria para, posteriormente, proceder a detectar los valores aberrantes.

Posteriormente, se procedió a realizar una determinación simultánea en los aparatos ADAMS A1c HA-8160 e In2it (I) de 60 especímenes (sangre total con EDTA [*ethylene diamine tetra-acetic* 'ácido edético']), y la cantidad mínima de sangre total necesaria para la medición era de 4 µl y una media de 2,9 min por determinación, en el caso del aparato ADAMS A1c HA-8160, y 20 µl y aproximadamente 10 a 11 min en el aparato In2it (I).

La determinación de HbA1C mediante el aparato In2it es sencilla y rápida y se basa en introducir un cartucho de reactivo en el aparato con la zona de recepción de muestras hacia arriba. Posteriormente, se obtiene la muestra de sangre capilar por punción del pulpejo del dedo con una lanceta especial en forma de llave que se suministra (aunque para este estudio se empleó sangre total con EDTA), que una vez correctamente rellena se introduce en una ranura del aparato y se gira hasta separarla de la zona con la muestra que queda en el interior de éste; el usuario sólo debe esperar el resultado.

- 1) Para el estudio de la imprecisión intraserial se procedió a medir un conjunto de especímenes de valores altos y bajos introduciendo los bajos 60 veces consecutivas y los altos otras 60 veces consecutivas el mismo día. Los rangos (media \pm 2 desviaciones estándar [DE]) fueron de 9,98 a 10,9 para los valores altos y de 4,94 a 5,58 para los valores bajos del aparato In2it, y de 9,17 a 9,73 para los valores altos y de 5,06 a 5,50 para los valores bajos del aparato ADAMS A1c HA-8160.
- 2) La imprecisión interdiaria se evaluó por medio de controles, y se empleó Lyphochek Diabetes Control Levels 1 y 2 (Bio-Rad), que correspondían respectivamente a los controles bajo y alto 40 veces, cada uno con los aparatos ADAMS-A1c HA-8160 e In2it, respectivamente, durante días consecutivos. Los rangos (media \pm 2 DE) fueron de 9,48 a 10,92 para los valores altos y de 5,75 a 6,47 para los valores bajos del aparato In2it, y de 9,02 a 9,54 para los valores altos y de 5,31 a 5,75 para los valores bajos del aparato ADAMS A1c HA-8160.

Para la detección de posible presencia de valores aberrantes, se siguieron las recomendaciones^{7,8} consistentes en ordenar los resultados de menor a mayor y se seleccionaron los 2 valores menores (X1 y X2) y los 2 mayores (Xn y Xn-1).

Especímenes

n = 60 por ambos métodos:

1. Obtención de sangre total con EDTA, que fue la que emplearon en el estudio ambos aparatos (también es posible emplear sangre conservada con heparina o flúor en el aparato In2it)^{5,6}.

Tratamiento estadístico

Para el estudio comparativo entre ambos métodos se recogieron 60 muestras mediante el seguimiento de un muestreo aleatorizado: el 60% procedía de atención primaria y el 40% procedía de hospitalización; para este análisis se utilizó el paquete estadístico Excel Microsoft Office 2000 y regresión de Passing y Bablok (MEDCAL 4.020.021) (fig. 2).

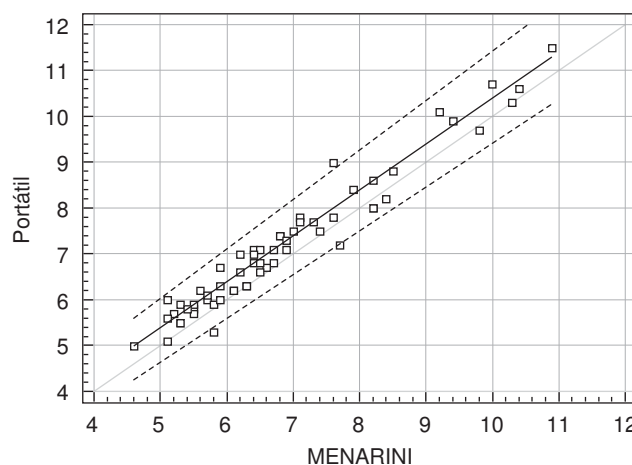


Figura 2 Recta de regresión de Passing y Bablock de muestras analizadas con el analizador In2it de Bio-Rad y ADAMS A1c HA-8160 de Menarini.

Para el estudio de la significación estadística de la variación intraserial e interdiaria se empleó la distribución F de Snedecor para el análisis de la variancia.

La interpretación de la F sería que la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre las variancias permitiría afirmar que las 2 técnicas de laboratorio son equivalentes, lo que obliga, en caso contrario, a elegir el método con menor variancia y, por tanto, menor variabilidad en las mediciones^{9,10}.

Resultados

Los valores aberrantes eliminados correspondieron a 4 intraserials (altos y bajos) de ADAMS-A1c HA-8160 y 3 intraserials (altos y bajos) de In2it; no debe eliminarse ningún valor aberrante en el caso de la imprecisión interdiaria.

Los resultados de las imprecisiones intraserial e interdiaria, así como de la significación de ambos métodos mediante el empleo de la F de Snedecor, se muestran en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1 Valores de la imprecisión intraserial e interdiaria obtenidos por este laboratorio con el analizador ADAMS A1c HA-8160 (Menarini) y el analizador In2it (Bio-Rad)

	CV1 Intraserial	CV2 Intraserial	CV1 Interdiario	CV2 Interdiario
Alto	1,48 ^a	2,20 ^a	1,38 ^b	3,53 ^b
Bajo	2,14 ^a	3,04 ^a	1,96 ^b	2,95 ^b

CV 1: coeficiente de variación obtenido por el analizador ADAMS A1c HA-8160 (Menarini); CV 2: coeficiente de variación obtenido por el analizador In2it (Bio-Rad).

^aTamaño muestral igual a 60.

^bTamaño muestral igual a 40.

Tabla 2 Estudio de significación estadística de los valores de las variancias intraserial e interdiaria, obtenidos por este laboratorio con el analizador ADAMS A1c HA-8160 (Menarini) y el analizador In2it (Bio-Rad) mediante el empleo de F de Snedecor

Comparación	Análisis de las variancias
Intraserial valores bajos Bio-Rad/Menarini ^a	0,026/0,013 = 2,00*
Intraserial valores altos Bio-Rad/Menarini ^a	0,053/0,020 = 2,65*
Interdiario valores bajos Bio-Rad/Menarini ^b	0,032/0,012 = 2,66*
Interdiario valores altos Bio-Rad/Menarini ^b	0,130/0,016 = 8,12*

^aTamaño muestral Bio-Rad y Menarini igual a 60.

^bTamaño muestral Bio-Rad y Menarini igual a 40.

*Estadísticamente significativo con una p = 0,025.

La correlación entre ambos métodos fue Y (BIO-RAD) = 0,4000+1.000 × (MENARINI). Los intervalos de confianza del 95% para la coordenada en el origen y la pendiente fueron de -0,1500 a 0,6500 y de 0,9565 a 1,0769, respectivamente. El coeficiente de correlación de Pearson obtenido fue r = 0,9744.

Discusión

La diabetes es una enfermedad de alta prevalencia en la sociedad actual, como lo demuestran los datos de la OMS, según los que el número actual de diabéticos se sitúa en torno a los 180 millones, y se espera que aumente a más del doble en el año 2030, con el consiguiente incremento en gasto sanitario¹¹.

Los métodos desarrollados para la medición de la HbA1C son múltiples, y es muy importante la estandarización de la técnica y su calibración, llevada a cabo por la IFCCWG HbA1C Standardisation y la AACC (American Association of Clinical Chemistry), que busca unificar el patrón de referencia así como el establecimiento de la precisión para la técnica por el IFCC Reference Laboratory; según éste, el coeficiente de variación (CV) debe situarse entre el 2,5 al 3,0%¹², aunque según Sacks et al son aceptables aquéllos inferiores al 5% con un nivel de evidencia C².

Según la IFCC y la AACC, un buen control de la diabetes supone un valor inferior al 7% de HbA1C; el límite superior para sujetos sanos se establece en el 6%¹².

La ventaja de la utilización de aparatos del tipo POCT en atención primaria por parte del personal con una mínima preparación se debe a su manejo fácil e intuitivo, sin perjuicio de que la realización del control de calidad y supervisión analítica la realice el laboratorio de referencia¹³, que facilita el seguimiento evolutivo de los pacientes diabéticos pues permite la determinación de la HbA1C. En la actualidad, la HbA1C se considera como el mejor sistema existente para el control a largo plazo de la diabetes; sus valores reflejan la concentración de glucosa en los 2 o 3 meses anteriores al análisis, y se corresponde aproximadamente con los 120 días que representan la vida media del hematíe, de manera que una reducción del 1% equivale a 25 o 35 mg/dl en la concentración media diaria de glucosa^{1,2}.

La relevancia clínica del autocontrol de la HbA1C con métodos POCT dispone en la actualidad de sólo 2 revisiones, como son las publicadas por la ADA 2007 con un nivel de evidencia grado E³ y las de la Academia Nacional de Bioquímica Clínica (NABC) con un grado de evidencia A, en la que se concluye que el empleo de los POCT disminuye las complicaciones derivadas de un mal control de la enfermedad, mejora los resultados clínicos del paciente y favorece el descenso de la HbA1C en sucesivas determinaciones, de modo que aumenta la eficacia el tratamiento^{14,15}.

Conclusión

A través de este estudio se ha podido comprobar que hay diferencias significativas en las variancias de la imprecisión intraserial e interdiaria tanto en los valores altos como en los bajos entre el método POCT y el método HPLC, pero sin presentar relevancia clínica, dado que los CV del método POCT son inferiores a los CV propuestos en la bibliografía; si

bien el error máximo deseable es del 2,7%, un 4% de CV es suficiente para tener variación biológica^{12,14,16}.

Por todo esto, el método POCT es útil y apropiado para el seguimiento de pacientes diabéticos en atención primaria, además de por su facilidad y sencillez de manejo.

El objetivo de próximos trabajos puede ser la comparación de otros métodos POCT con sus métodos de referencia, así como estudios enfocados en su practicidad en el ámbito de la atención primaria.

Bibliografía

- Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: Methodologies and clinical applications. *Clin Chem*. 1986;32:B64-70.
- Sacks, Bruns DE, Goldstein DE, MacLaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*. 2002;48:436-72.
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2007. *Diabetes Care*. 2007;30:4-41.
- Arkray.com [homepage on the internet]. 2007 [consultado 25/8/2008]. Disponible en: <http://www.arkray.co.jp/english/products/daibetes.html>
- Ficha técnica de Adams A1c HA-8160, Menarini (versión de junio de 2006).
- Ficha técnica de In2it, Bio-Rad (versión de junio de 2007).
- Canalias F. Recomendaciones para el estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Documento de la Sociedad Española de Bioquímica clínica y patología molecular, Comité científico, Comisión de Metrología. Documento B. Fase 3. Versión 1. *Química Clínica*. 2003;22: 63-5.
- Sánchez M, Gella FJ. Recomendaciones para el estudio de la capacidad de detección de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Documento de la Sociedad Española de Bioquímica clínica y patología molecular, Comité científico, Comisión de Metrología. Documento C. Fase 3. Versión 1. *Química Clínica*. 2004;23:439-41.
- Milton JS. Estadística para biología y ciencias de la salud. 3.^a ed. Madrid: Mc Graw-Hill; 2001.
- Fuentes X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM. Bioquímica clínica y patología molecular. Reverté. 1998;1:56-7.
- World Health Organization. 2008 [consultado 25/8/2008]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
- Goodall I. HbA1c standardisation destination – Global IFCC standardisation how, why, where and when a tortuous pathway from kit manufacturers, via inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes [consultado 25/8/2008]. *Clin Biochem*. 2005;26:5-19. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1240025>
- Meier F, Jones BA. Point-of-care testing error: Sources and amplifiers, taxonomy, prevention strategies, and detection monitors [consultado 25/8/2008]. *Arch Pathol Lab Med*. 2005; 129:1262-7. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>
- NACB. Laboratory medicine practices guidelines. En: Nichols JH, editor. *Diagnosis and management of diabetes mellitus. Evidence-based practice for POCT*. Springfield: Baystate Health System; 2004.
- Hortas ML. Aplicación de la tecnología Point of Care en el diagnóstico y manejo de la diabetes mellitus. Programa de Formación Continuada a Distancia. Madrid: Asociación Española de Farmacéuticos Analistas (AEFA); 2008.
- Tablas de variación biológica-especificaciones deseables y mínimas de la calidad analítica. Corrección de 26-09-08. Documento de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comité de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios. Comisión de Calidad Analítica [consultado 2/9/2009]. Disponible en: <http://www.seqc.es/article/articleview/330/1/170/>