Novus Diagnostics, S.A.
Donde la calidad es un hábito

NEWSLETTER
EHPLC032

Electroforesis capilar versus HPLC para la medición de HbA1c

Como revisamos en la semana anterior, la medición de la HbA1c se puede ver afectada por la presencia de alguna hemoglobinopatía. Por ello, es importante saber cuál metodología es la que mejor se adapta a nuestro medio. Esta semana estaremos revisando una comparación entre la electroforesis capilar y la HPLC o cromatografía líquida de alta resolución.

¿Cuál es la importancia de tener una prueba estandarizada para el diagnóstico de la diabetes mellitus?

Sabemos que la diabetes mellitus es una enfermedad con prevalencia e incidencia en aumento a nivel global por lo que realizar un diagnóstico certero tiene que ser una prioridad para el laboratorio clínico.

Si su incidencia y prevalencia continúan con el mismo crecimiento exponencial que ahora, se estima que en el 2035 habrá 592 millones de personas con la enfermedad.

Actualmente, la medición de HbA1c es el biomarcador más importante para la monitorización del control glucémico en la práctica clínica. Además, es un importante marcador del riesgo de complicaciones crónicas producidas por la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2. Y añadido a esto, desde el 2010, la Asociación Americana de la Diabetes (ADA) introdujo la medición de HA1c como un parámetro adicional para el diagnóstico de la enfermedad.

Por todo ello, el grupo de investigación del control de la diabetes y sus complicaciones propuso la estandarización del método de medición de la HbA1c bajo los lineamientos de la Federación de Química clínica. Por lo tanto, se ha exigido a los nuevos equipos que cumplan con los requisitos dictados por estas instituciones.

¿Cuáles son las características de los analizadores evaluados de electroforesis capilar y HPLC?

En el estudio se realizó la cuantificación de HbA1c en ambos analizadores Sebia Capillarys 3 Tera y Bio-Rad-D-100, y posteriormente se comparó los resultados con el HLC-723G7 de Tosoh.

El analizador Bio-Rad D-100 es totalmente automatizado, y se basa en la separación cromatográfica de la fracción de hemoglobina por medio del intercambio de cationes por cromatografía líquida de alta resolución asociada a detección UV. La sangre completa se diluye automáticamente con una solución hemolizante y se carga en el cartucho. Posteriormente las fracciones de hemoglobina separadas se detectan a 415 nm. La HbA1Ac se calcula a partir del ratio de HbA1c sobre el total de las fracciones de HbA. El software de Bio-Rad detecta los picos normales y anormales (variantes de hemoglobina), y vuelve a correr la muestra automáticamente según la configuración establecida por el usuario. En el cromatograma se pueden observar 7 picos que corresponden en orden a: HbA1a, HbA1b, HbF, A1c lábil, P3 (pico de degradación que corresponde a componentes no identificados) y HbA0.

En cuanto al analizador Sebia Capillarys 3 Tera, igualmente es totalmente automatizado, y se basa en la electroforesis capilar y la detección UV para cuantificar la HbA1c, proteínas (en suero y orina), inmunotipificación (suero y orina), y transferrina deficiente de carbohidrato. Este analizador posee 12 capilares que funcionan paralelamente y por lo tanto permite 12 análisis simultáneos. Previo a cada corrida, los capilares se lavan con solución de lavado y posteriormente se prepara para el análisis con solución buffer. La sangre completa se diluye automáticamente con una solución hemolizante y posteriormente es inyectada al extremo anódico del capilar. Los componentes de la hemoglobina son separados por separación proteica de alto voltaje y luego es detectada por el extremo catódico del capilar a 415nm. El software Phoresis de Sebia, detecta los perfiles normales y atípicos (variantes de hemoglobina, aumento de HbA2 entre otros). El cromatograma se componente de al menos 4 picos: HbA1c, otras HbA, HbA0 y HbA2. En el caso de presentar HbF elevada, aparece un pico adyacente al pico de HbA0. La presencia de variantes de hemoglobina se observará como picos extra en el cromatograma.

¿Qué muestras se evaluaron durante el estudio?

Para ambos analizadores se utilizaron materiales de control de calidad para su evaluación, los controles estaban compuestos de sangre completa liofilizada. Además, se realizó control de calidad externo con muestras proveídas por el Instituto científico de Salud Pública.

Las muestras para el análisis de HbA1c o para el cribado de hemoglobinopatías, se obtuvieron de pacientes diabéticos y no diabéticos.

Para la evaluación de las variantes de hemoglobina, se utilizaron muestras de pacientes con variantes de hemoglobina.

Finalmente, para la medición de interferencia de la HbA1c carbamilada, triglicéridos y bilirrubina, los eritrocitos se obtuvieron tras la centrifugación y remoción de plasma.

¿Qué variables se evaluaron durante el estudio?

Como parte de la evaluación de protocolo, se determinaron las siguientes variables para cada uno de los analizadores:

Imprecisión: valorada en cada corrida y evaluada según la guía del Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínicos (CSLI por sus siglas en inglés).

Exactitud: también evaluada según las guías de CSLI.

Linealidad: se evaluó de dos maneras por medio de muestras, primero utilizando un kit de linealidad de Bio-Rad Lypochek Hemoglobin A1c y posteriormente utilizando muestras de pacientes según las guías de CLSI.

Arrastre: medido a partir del análisis de muestras sanguíneas con concentraciones altas y bajas de HbA1c.

Método de comparación: ambos analizadores fueron comparados con los resultados obtenidos por el método de rutina Tosoh HLC-723G7.

Prueba de interferencia: el error permitido por interferencia se calculó de acuerdo con las guías CSLI para las posibles interferencias como la HbA1c lábil, hemoglobina carbamilada, bilirrubina, triglicéridos, contenido de hemoglobina y variantes de hemoglobina.

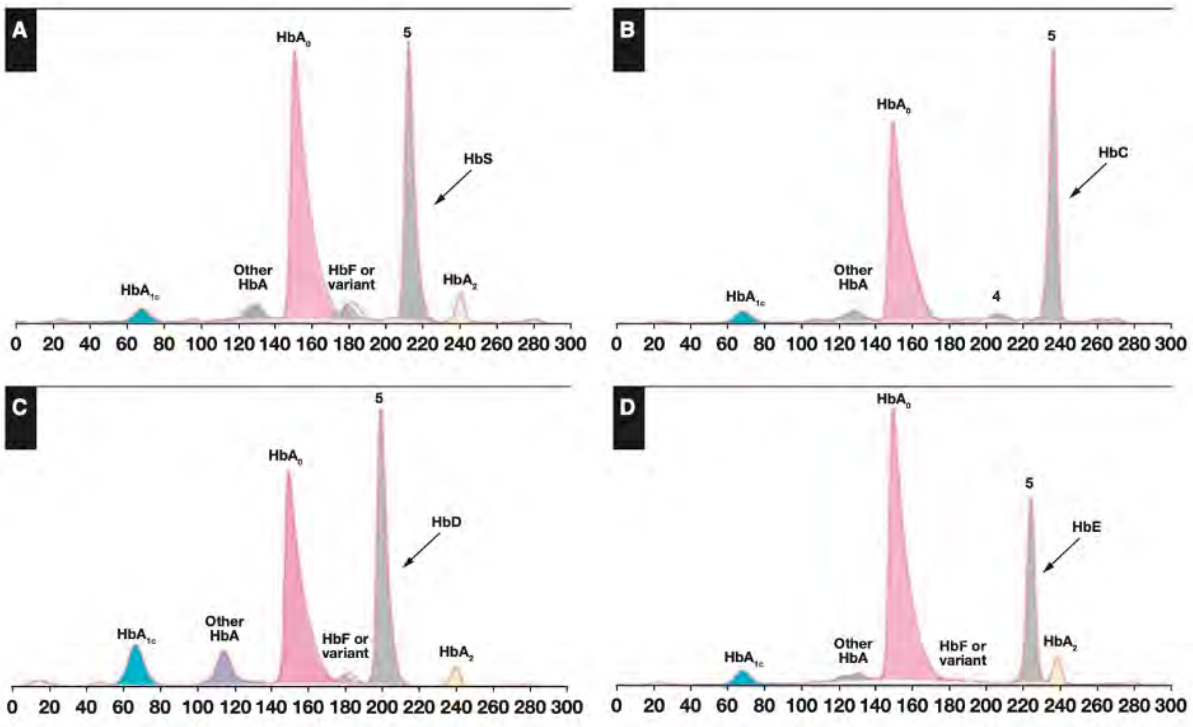
Estabilidad de la HbA1c: fue varolada a partir del análisis de 3 muestras de pacientes con concentraciones bajas, medias y altas de HbA1c durante 3 semanas.

Detección de variantes de hemoglobina: para poder demostrar la capacidad de detectar variantes de hemoglobina al medir la HbA1c, se utilizaron muestras con variantes HbS, HbD, HbE y otras variantes raras o en heterocigosis con otras variantes (ej. HbSC, HbH, HBSS, HbEE, HbCD entre otras).

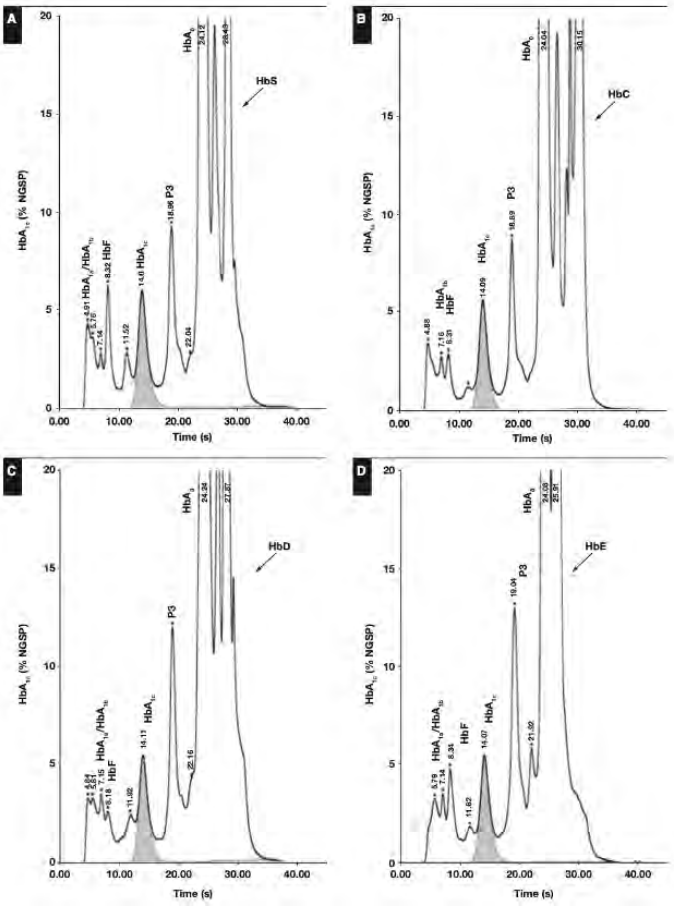
¿Cómo se observa un cromatograma en cada uno de los analizadores?

Como parte de la valoración integral de cada equipo, el estudio mostró resultados de los cromatogramas del analizador de Sebia Capillarys 3 Tera y el equipo de Bio-Rad.

A continuación, mostramos un ejemplo de los cromatogramas obtenidos en el equipo Sebia Capillarys 3 Tera en el que podemos observar la representación gráfica de la HbA1c y de otras fracciones, así como de las variantes de hemoglobina presentes en la muestra. (tomado de Herpol M et al. Evaluation of the Sebia Capillarys 3 Tera and the Bio-Rad D-100 Systems for the Measurement of Hemoglobin A1c. Am J Clin Pathol. 2016 Jul;146(1):67-77)



En la siguiente imagen se puede observar los cromatogramas obtenidos por el analizador HPLC de Bio-Rad D-100 con la identificación de las diferentes fracciones y variantes de hemoglobina. (tomado de Herpol M et al. Evaluation of the Sebia Capillarys 3 Tera and the Bio-Rad D-100 Systems for the Measurement of Hemoglobin A1c. Am J Clin Pathol. 2016 Jul;146(1):67-77)



¿Cuáles fueron las conclusiones del estudio?

En los últimos años, los requisitos para los analizadores de HbA1c se han vuelto más rígidos ya que la medición de HbA1c se utiliza tanto para la monitorización como el diagnóstico de diabetes. La concentración establecida de HbA1c para el diagnóstico de diabetes es 6,5%, y se debe de repetir la prueba para confirmar el diagnóstico. Además, la medición de HbA1c ha demostrado identificar otros pacientes que no han sido diagnosticados por medio de las pruebas de tolerancia a la glucosa. Por lo tanto, es importante escoger una metodología correcta para reducir los sesgos potenciales, pues se puede sobre o infra diagnosticar.

A pesar de ello, ambos analizadores cumplen con los criterios establecidos.

Al analizar las variables estudiadas, se obtuvo que ambos mostraron una exactitud excelente en ausencia de variantes de hemoglobina. Sin embargo, en concentraciones elevadas de HbA1c, el equipo de Bio-Rad D-100 mostró un pequeño sesgo, pero aceptable. Por otra parte, ninguno presentó interferencias con la lectura en presencia de la fracción lábil de HbA1c, hemoglobina carbamilada, triglicéridos o bilirrubina. En el caso del analizador Bio-Rad D-100, se observó un sesgo cuando las concentraciones de glucosa eran elevadas.

Los autores del estudio sugieren que los analizadores automatizados son ideales para realizar diagnósticos certeros y precisos e incluso obtener los resultados durante la consulta del paciente.

En cuanto al tiempo requerido para el análisis de muestras, en el estudio observaron que para un lote pequeño de pruebas el equipo de Bio-Rad era superior al de Sebia ya que tarda relativamente menor tiempo en el inicio de la lectura. Sin embargo, a medida que el número de muestras aumentan, el Sebia Capillarys 3 Tera mostró tener un mejor rendimiento ya que el lavado/inyección/análisis se puede realizar simultáneamente.

Por otro lado, habrá que tener en cuenta factores externos que puedan alterar falsamente la medición de HbA1c, especialmente enfermedades que modifican la vida media del eritrocito. Entre las enfermedades que reducen la vida media del eritrocito se encuentran la anemia renal, enfermedad hepática, pérdida sanguínea entre otras, pueden disminuir falsamente los niveles de HBA1c. Y enfermedades que prolongan la vida media del eritrocito como la deficiencia de hierro pueden aumentar los niveles de HbA1c.

Con respecto a las hemoglobinopatías, en este estudio ambos analizadores fueron evaluados bajo la presencia de variantes de hemoglobina. Ambos analizadores fueron capaces de detectar todas las variantes excepto la HbH y Hb Bart.

Finalmente, en cuanto a la muestra utilizada, el analizador de Sebia ha demostrado tener un buen rendimiento con muestras capilares o a partir de gota seca en papel filtro.

En conclusión, ambos analizadores cumplen con los requisitos establecidos por las guías internacionales, pero se debe de realizar una evaluación individual de acuerdo con las necesidades del laboratorio.

Bibliografía:

1. *Herpol M, Lanckmans K, Van Neyghem S, Clement P, Crevits S, De Crem K, Gorus FK, Weets I. Evaluation of the Sebia Capillarys 3 Tera and the Bio-Rad D-100 Sys tems for the Measurement of Hemoglobin A1c. Am J Clin Pathol. 2016 Jul;146(1):67-77. doi: 10.1093/a jcp/aqw081. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27357293.*



Dra. Alexa Núñez (PhD MD)

Médico y Cirujano egresada de la Universidad Francisco Marroquín de Guatemala. Realizó su formación en Neumología en el Hospital Vall d´Hebron de Barcelona y posteriormente Doctorado en Medicina en la Universidad Autónoma de Barcelona, España. En la actualidad trabaja como Gerente de Mercadeo Científico de Novus Diagnostics de Guatemala.