

# COMPARACIÓN DE MÉTODOS EN LA DETERMINACIÓN DE HbA1C

Mores, Mailen<sup>1</sup>

Gerván, Natalia<sup>2</sup>

Salinas, María F<sup>3</sup>

Malano, Daiana L.<sup>1</sup>

Pascual, Clarisa<sup>4</sup>

Sabagh, Marcela<sup>5</sup>

1 Bioquímica, Laboratorio Central Hospital San Roque, Córdoba, Argentina.

2 Bioquímica Especialista en Química Clínica, Laboratorio Central Hospital San Roque, Córdoba, Argentina.

3 Bioquímica, Laboratorio Central Hospital Militar Regional, Paraná, Argentina.

1 Bioquímica, Laboratorio Central Área Inmunología, Hospital San Roque, Córdoba, Argentina.

5 Bioquímica, Jefa de Servicio Bioquímico, Hospital San Roque, Córdoba, Argentina.

Correspondencia: Mores Mailén. Las Baileyanas 609, Embalse, Córdoba. CP: 5856

Teléfono móvil: 03571-15543257 - maiumores@hotmail.com

## RESUMEN

**Introducción:** El consenso para la medición de Hemoglobina Glicada (HbA1c) establece que los métodos deben ser certificados por el *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). En la actualidad los métodos basados en Inmunoturbidimetría (IT) cumplen con esta especificación, una alternativa podrían ser los métodos *Point of care*, basados en inmunoensayos (IE). Estos dispositivos presentan la ventaja de brindar los resultados de manera inmediata, reduciendo el tiempo para la toma de decisiones e intervenciones terapéuticas. El objetivo de este estudio es comparar la metodología de IT con el IE de los equipos POC en la medición de HbA1c y evaluar si los resultados son comparables en términos de error sistemático permitido. **Materiales y métodos:** Se realizó un estudio observacional y prospectivo que incluyó 66 muestras de pacientes a los cuales se les extrajo sangre con la finalidad de determinar la concentración de HbA1c por IT (Cobas C311, Roche), e IE (POC AC1Now®, Bayer). La toma de muestra y el almacenamiento se hicieron siguiendo las indicaciones de los fabricantes para ambos métodos. **Resultados:** Mediante el procedimiento no paramétrico de Passing Bablok se obtuvo la recta:  $y = 0,1733 + 0,9833x$ . El intervalo de confianza del 95% de la ordenada al origen contiene al cero y el de la pendiente al 1. Basados en la ecuación de la recta obtenida se estableció que alrededor de los puntos de corte establecidos como: referencia, diagnóstico y objetivo terapéutico, la discrepancia entre los métodos fue de 1.27%, 1.00%, y 0.81% respectivamente. El análisis del gráfico de Bland-Altman estimó un sesgo de 0,3% entre el método IE y el IT, valor menor al establecido como permitido por variabilidad biológica y por IFCC. **Conclusión:** Basados en las especificaciones de calidad del NGSP y variabilidad biológica concluimos que el método de POC es comparable con el sistema de IT para cuantificar HbA1c.

**Palabras clave:** HbA1c, diabetes, inmunoturbidimetría, poin of care

## INTRODUCCIÓN

La prevalencia de Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 va en continuo aumento a nivel mundial, con una velocidad de crecimiento mayor en los países en desarrollo. En Argentina, se estimaron 1.426.000 diabéticos en el año 2000 y se prevé que este número llegará a 2.457.000 en el año 2030 (1).

El control de la glucemia es una parte esencial en el manejo de la DM. Los resultados obtenidos por varios estudios indican que un adecuado control glucémico reduce significativamente las complicaciones micro y macrovasculares de la enfermedad (2,3).

La Hemoglobina Glicada (HbA1c) es el indicador recomendado para determinar el grado de control metabólico en la DM que mide en retrospectiva los niveles promedio de glucemia en un periodo de 2 a 3 meses (4).

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) establece como primer objetivo terapéutico, mantener estable el nivel de HbA1c, recomendando la medición de la misma al menos dos veces al año en pacientes con control glucémico estable y cada 3 meses en pacientes cuya terapia ha cambiado o que no logran las metas de control glucémico (5).

Con el objetivo de estandarizar la determinación de HbA1c, los organismos internacionales y nacionales establecen que el método de medición adecuado debe ser certificado por el *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), tener buena trazabilidad respecto al método de referencia de la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), poseer un coeficiente de variación intraensayo (CV) menor al 2% y un sesgo menor al 5% respecto al método de referencia, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (6,7).

En la actualidad los métodos basados en Inmunoturbidimetría (IT) son usados por la mayoría de los laboratorios clínicos. Según el NGSP éstos son reconocidos internacionalmente como equivalentes al método HPLC (6). Sin embargo, dicha metodología requiere de equipamientos costosos, por lo que no estaría al alcance de una gran cantidad de laboratorios.

Una alternativa de dicha medición podría ser la utilización de métodos *Point of Care* (POC), basados en inmunoensayos (IE) (8). Estos dispositivos presentan la ventaja de brindar los resultados inmediatamente después de la recolección de la muestra, lo que reduce el tiempo necesario para la toma de decisiones e intervención terapéutica más rápida (9).

El objetivo de este estudio es comparar la metodología de IT con el IE de los equipos POC en la medición de HbA1c y evaluar si los resultados son comparables en términos de error sistemático permitido.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional y prospectivo que incluyó 66 muestras de pacientes que acudieron al Servicio Bioquímico del Hospital San Roque, Córdoba, Argentina, durante el año 2016. La población estudiada consistió en pacientes adultos de ambos sexos, diabéticos y no diabéticos, que no presentaban anemia, ni alguna hemoglobinopatía asociada. A los pacientes participantes se les extrajo sangre por venopunción con la finalidad de determinar la concentración de HbA1c por dos metodologías diferentes: IT dada

por la plataforma automatizada Cobas C311, e IE dado por el sistema de POC AC1Now® de Bayer.

Las muestras fueron recolectadas en tubos con EDTA para su medición en Cobas C311 y en tubos heparinizados para el sistema POC AC1Now®, ambas fueron conservadas a 4°C y procesadas dentro de las 48 horas.

La toma de muestra y el almacenamiento se hicieron siguiendo las indicaciones de los fabricantes para ambos métodos.

Las concentraciones medidas de HbA1c incluyeron los niveles de decisión médica establecidos como referencia (5.9%) (11), valor diagnóstico (6.5%) (5) y objetivo terapéutico (7%) (5).

Para la aceptación de las diferencias entre los métodos se cotejó el sesgo obtenido, con las especificaciones de calidad, en términos de error total permitido, del NGSP (6%) y de variabilidad biológica deseable (3%). Se consideró error sistemático permitido al 50% del error total permitido.

### **Métodos**

El equipo de POC AC1Now® de Bayer consiste en un IE basado en la exposición de sangre diluida a anticuerpos anti-HbA1C marcados con látex azul. La muestra de sangre entera se pone en contacto con un diluyente que convierte la hemoglobina de la muestra en metahemoglobina. Esta se conjuga con anticuerpos anti-HbA1C marcados con micropartículas azules que migran a lo largo de las tiras reactivas. La cantidad de micropartículas azules capturadas en las tiras refleja la cantidad de HbA1c en la muestra. Los resultados de la prueba se expresan como porcentaje de HbA1c. La calibración de los equipos es realizada por el fabricante mediante un conjunto de muestras de sangre cuyas concentraciones han sido asignadas por un laboratorio certificado por el NGSP utilizando un método de referencia (10).

La plataforma automatizada de Roche Cobas C311 está basado en el principio de inmunoensayo de inhibición turbidimétrica competitiva para sangre entera hemolizada. La muestra de sangre entera se hemoliza usando un reactivo que contiene un detergente. La hemoglobina liberada se convierte en un derivado estable que se mide fotométricamente durante la pre incubación. La HbA1c en la muestra reacciona posteriormente con anticuerpos anti-HbA1c formando complejos solubles, mientras que los anticuerpos excedentes reaccionan con polihaptenos cuyo complejo puede medirse turbidimetricamente (11). A mayor concentración de HbA1c, menor es la turbidez detectada.

La calibración del método se llevó a cabo utilizando C.F.A.S. HbA1C, se utilizaron los controles internos de Roche, Precicontrol HbA1C Norm®, Precicontrol HbA1CPath® y el control de calidad externo del Programa de Evaluación Externa de Calidad (PEEC) de la Fundación Bioquímica Argentina.

Se tomó como método de referencia la plataforma automatizada por ser reconocida como equivalente a HPLC, según el NGSP (6), y por ser el método de rutina utilizado en nuestro Laboratorio.

### **Análisis estadístico**

El análisis de los datos de la comparación se realizó mediante análisis de regresión de Passing-Bablok y el gráfico de dispersión de Bland-Altman, para el análisis estadístico se utilizó el programa MedCalc® versión demo; los valores de pendiente y ordenada al origen se expresan junto al intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Se determinó el promedio de

error sistemático en todo el rango de concentración evaluado y en los puntos de decisión médica se lo comparó con el error sistemático aceptado por el NGSP y el deseable por variabilidad biológica.

## RESULTADOS

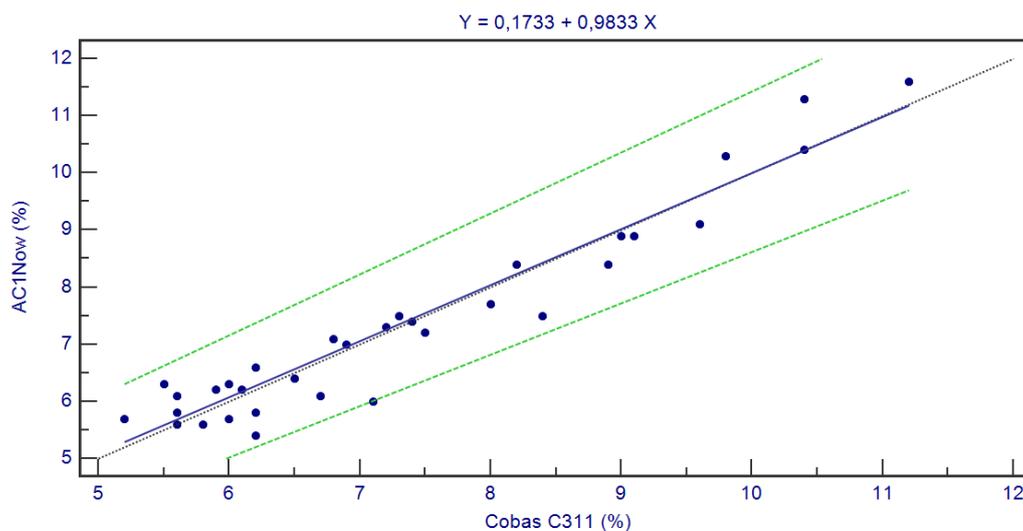
Los resultados de tendencia central, medias y medianas así como de desviación estándar se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Resultados obtenidos con ambas metodologías (n= 66)

	<b>Cobas C311</b>	<b>AC1Now®</b>
<b>Concentración Menor</b>	5,20	5,40
<b>Concentración Mayor</b>	11,20	11,60
<b>Media</b>	7,34	7,32
<b>Mediana</b>	6,90	7,00
<b>Desviación Estándar</b>	1,64	1,69

Mediante el procedimiento no paramétrico de Passing-Bablok se obtuvo la recta:  $y = 0,1733 + 0,9833x$  (Figura I).

Figura I: Recta de regresión obtenida por Passing-Bablok.



En el eje "x" se representan las determinaciones medidas por la plataforma automatizada Cobas C311, y en el eje "y" aquellas medidas por AC1Now®. Se muestra la recta de regresión (línea sólida) e intervalo de confianza del 95% (punteado alrededor de la recta de regresión). La recta punteada central corresponde a la recta con ordenada 0 y pendiente 1.

En este análisis los parámetros de regresión y su IC 95% fueron:

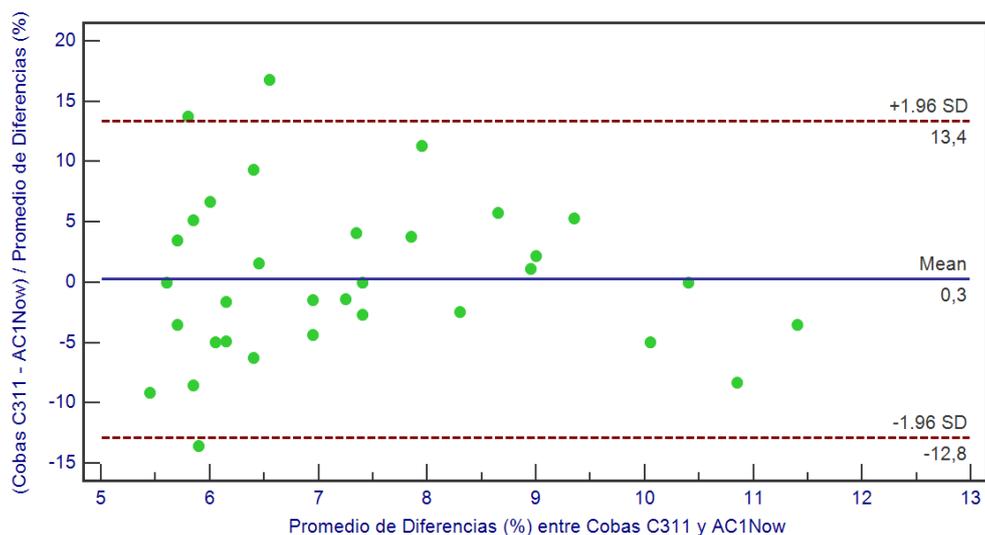
- Pendiente: 0,9833 (0,9000 a 1,0667)
- Ordenada al origen: 0,1733 (-0,3800 a 0,7600)

Los IC 95% establecidos para pendiente y ordenada al origen muestran que el valor 1 y 0 se encuentran contenidos respectivamente en cada intervalo, mostrando una desviación de la linealidad no significativa con un  $p < 0,0001$ .

Basados en la estimación de la diferencia entre el sistema de POC y el automatizado, utilizando la ecuación de la recta obtenida por Passing-Bablok, se estableció que alrededor de los puntos de corte establecidos como referencia (5.9%) (11), valor diagnóstico (6.5%) (5) y objetivo terapéutico (7%) (5), la discrepancia entre los métodos fue de 1.27%, 1.00%, y 0.81% respectivamente, valor menor al establecido por variabilidad biológica (1.5%) (12) y por el NGSP (3%) (7).

La Figura II muestra el gráfico de Bland-Altman en el que se observa la relación entre la diferencia de las concentraciones de HbA1c medidas por ambos métodos. Este gráfico muestra la aleatoriedad de los valores alrededor del valor medio y estima un sesgo de 0,3% entre el método POC y el automatizado. El valor obtenido es menor al error sistemático permitido por el NGSP (3%) y por variabilidad biológica (1,5%).

Figura II: Gráfico de Bland-Altman.



*En el eje "y" se grafican las diferencias entre las concentraciones en porcentaje entre la plataforma automatizada Cobas C311 y el sistema de POC AC1Now®. En el eje "x" se representa el promedio de las concentraciones medidas por ambos métodos, la recta horizontal marca la media de las diferencias, las rectas horizontales segmentadas representan  $\pm 1.96$  DS.*

## DISCUSIÓN

El sistema de POC AC1Now® fue diseñado para el monitoreo de los niveles de HbA1c en pacientes diabéticos. Consiste en equipos de fácil utilización, que no requieren de equipamiento extra y que proveen un resultado inmediato agilizando la acción terapéutica.

Estudios previos demostraron los beneficios que presenta en los pacientes la rápida devolución de la concentración de HbA1c, agilizando el tratamiento y mejorando el control glucémico (13,14,15). Otra ventaja de estos dispositivos de POC es en reemplazo de las metodologías de laboratorio en lugares donde el acceso a los mismos es limitada y la falta de control glucémico puede aumentar las comorbilidades asociadas a la patología diabética (16,17). No obstante, estos dispositivos, necesitan ser probados para proporcionar mediciones lo suficientemente fiables para su uso en casos de falta o dificultad al acceso de los servicios de laboratorio (18).

También debe tenerse en cuenta las interferencias que se presentan por variantes de la hemoglobina. Se ha observado que tanto la hemoglobinopatía dada por hemoglobina C como por la hemoglobina S, arrojan sesgos positivos en la determinación de HbA1c por el método AC1Now® (19). Esta sobreestimación podría conducir a un tratamiento más agresivo del paciente diabético, con el consiguiente aumento en el riesgo hipoglucémico de los mismos (20). La revisión bibliográfica muestra que la calidad analítica de los sistemas POC es controversial.

Si bien estos equipos presentan certificación de la IFCC, existen estudios científicos que indican que estos criterios no son alcanzados (21). Lenters-Westra y col. (22) compararon la performance de 7 dispositivos de POC para la determinación de HbA1c. Basados en los protocolos de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para precisión y sesgo, determinaron que solo 3 de ellos cumplían con los criterios analíticos establecidos por el NGSP.

Un metaanálisis publicado recientemente compara de manera directa el rendimiento de dispositivos de POC para HbA1c con los métodos de laboratorio, mostrando que existe una gran variabilidad en el sesgo para la mayoría de los equipos (23).

Asegurar la calidad analítica de los instrumentos POC es crucial, los mismos deben formar parte de una cadena de control de calidad de los hospitales, laboratorios y consultorios médicos, de lo contrario el impacto en los pacientes puede ser perjudicial.

La comparación entre instrumentos sirve para obtener datos en cuanto a sistemas alternativos de análisis ante fallas del analizador de rutina. El protocolo de linealidad da el rango de concentraciones entre las cuales se realiza la comparación; la evaluación de la ecuación de la recta y contar con muestras en los puntos de decisión médica, con sesgos menores a los permitidos, aportan las herramientas para dar como aceptable la comparación (24).

En nuestro trabajo, observamos en el gráfico de Bland-Altman una constante variabilidad y aleatoriedad de los valores alrededor del valor medio, con un ligero incremento entre las mediciones en concentraciones bajas de HbA1c, pudiendo esto atribuirse a que el número de pacientes con valores de HbA1c normales fue mayor que aquellos que poseían valores elevados. El sesgo estimado por este gráfico y el error establecido por la ecuación de la recta, en concentraciones de decisión médica (valor de referencia, diagnóstico y objetivo terapéutico), mostraron no ser superiores a los errores sistemáticos permitidos evaluados.

Basados en las especificaciones de calidad de los organismos internacionales NGSP y variabilidad biológica concluimos que el método de POC fue comparable con el sistema de IT utilizado como rutina en el laboratorio Clínico.

### **Conflicto de interés**

Los autores declaran no poseer conflicto de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

---

<sup>1</sup>Guía de Práctica Clínica Nacional sobre Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 Para el Primer Nivel de Atención. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación Argentina. Disponible en: [http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000070cnt-2012-08-02\\_guia-prevencion-diagnostico-tratamiento-diabetes-mellitus-tipo-2.pdf](http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000070cnt-2012-08-02_guia-prevencion-diagnostico-tratamiento-diabetes-mellitus-tipo-2.pdf); Consultado el 30 de Noviembre de 2016.

<sup>2</sup>The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329: 977–86.

<sup>3</sup>Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet 1998; 352(9131): 837-53.

<sup>4</sup>Arrendale J, Cherian S, Zineh I, Chirico M, Taylor J. Assessment of Glycated Hemoglobin Using A1CNow+™ Point-of-Care Device as Compared to Central Laboratory Testing. J Diabetes Sci Technol 2008; 2(5): 822-7.

<sup>5</sup>American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2016. Diabetes Care 2016; 39(Suppl.1): (S40).

<sup>6</sup>Sociedad Argentina de Diabetes. Documento de las "Primeras Jornadas Conjuntas de Consenso del Laboratorio en Diabetes" Desarrolladas entre la Sociedad Argentina de Diabetes - Capítulo Cuyo; la Asociación Bioquímica de Mendoza y la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Juan Agustín Maza 2009. Disponible en: [http://www.diabetes.org.ar/wp-content/uploads/2015/02/Primeras\\_Jornadas\\_Conjuntas\\_de\\_Consenso\\_del\\_Laboratorio\\_en\\_Diabetes.pdf](http://www.diabetes.org.ar/wp-content/uploads/2015/02/Primeras_Jornadas_Conjuntas_de_Consenso_del_Laboratorio_en_Diabetes.pdf); Consultado el 23 de Febrero de 2017.

<sup>7</sup>NGSP Protocol. Disponible en: <http://www.ngsp.org/protln.asp>; Consultado el 21 de Febrero de 2017.

<sup>8</sup>Affret A, Griz LHM, Cesse EÂP, Specht YS, Carvalho EMF, Fontbonne A. Assessment of a glycated hemoglobin point-of-care analyzer (A1CNow+) in comparison with an immunoturbidimetric method: a diagnostic accuracy study. Sao Paulo Med J 2015; 133( 6 ): 460-4.

<sup>9</sup>Health Quality Ontario. Point-of-Care Hemoglobin A<sub>1c</sub> Testing: An Evidence-Based Analysis. Ont Health Technol Assess Ser 2014; 14(8): 1-30.

<sup>10</sup>AC1Now® Professional Procedure Guide (90821B 04/2008). Disponible en [http://www.hmscweb.com/PDF\\_Files/Bayer/A1CNow\\_HCP\\_CLSI\\_Formatted\\_Product\\_Insert.pdf](http://www.hmscweb.com/PDF_Files/Bayer/A1CNow_HCP_CLSI_Formatted_Product_Insert.pdf); Consultado el 28 de Enero de 2017.

---

<sup>11</sup>Tina-quant® HbA1c Gen. 3. Turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) for the in vitro determination of hemoglobin A1c in whole blood or hemolysate. Disponible en: [http://www.cobas.com/content/dam/cobas\\_com/pdf/product/Tina-quant-HbA1c-Gen-3/Tina-Quant%20HbA1c%20Fact%20Sheet.pdf](http://www.cobas.com/content/dam/cobas_com/pdf/product/Tina-quant-HbA1c-Gen-3/Tina-Quant%20HbA1c%20Fact%20Sheet.pdf); Consultado el: 28 de Enero de 2017.

<sup>12</sup>Quality Requirements. Desirable Biological Variation Databas especifications. Disponible en <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>; Consultado el 21 de Febrero de 2017.

<sup>13</sup>Cagliero E, Levina EV, Nathan DM. Immediate feedback of A1C levels improves glycemic control in type 1 and insulin-treated type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22(11): 1785-9.

<sup>14</sup> Miller CD, Barnes CS, Phillips LS, et al. Rapid A1c availability improves clinical decision makin in an urban primary care clinic. *Diabetes Care* 2003; 26(4): 1158-63.

<sup>15</sup> Vinagre I, Álvarez P, García N, Roura G, Conget I. Evaluación del control metabólico en pacientes con diabetes tratados con insulina mediante la utilización de los dispositivos Contour USB y A1cNow+ (Estudio COMET). *Endocrinol Nutr* 2015; 62(8): 384-90.

<sup>16</sup>Martin DD, Shephard MD, Freeman H, Bulsara M, Jones T, Davis E, Graeme M. Point-of-care testing of HbA1c and blood glucose in a remote Aboriginal Australian community. *Med J Aust* 2005; 182(10): 524-7.

<sup>17</sup>Yager P, Domingo GJ, Gerdes J. Point-of-care diagnostics for global health. *Annu Rev Biomed Eng* 2008; 10: 107-44.

<sup>18</sup>Bode BW, Irvin BR, Pierce JA, Allen M, Clark AL. Advances in hemoglobin A1c point of care technology. *J Diabetes Sci Technol* 2007; 1(3): 405-11.

<sup>19</sup> Roberts WL, Safar-Pour S, De BK, Rohlfing CL, Weykamp CW, Little RR. Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem* 2005; 51: 776–8.

<sup>20</sup>Little RR. Analysis of Point-of-Care and Over-the-Counter Testing Methods for Hemoglobin A1c: How Good Do They Need To Be? *J Diabetes Sci Technol* 2010; 4(6): 1504-1506.

<sup>21</sup>Weykamp C, John G, Gillery P, English E, Ji L, Leters-Westra E, Little R, Roglic G, Sacks DB, Take I. Investigation of 2 models to set and evaluate quality targets for Hb a1c: biological variation and sigma-metrics. *Clin Chem* 2015; 61: 752–9.

<sup>22</sup>Leters-Westra E, Slingerland RJ. Three of 7 hemoglobin A1c point-of-care instruments do not meet generally accepted analytical performance criteria. *Clin Chem* 2014; 60: 1062–72.

<sup>23</sup>Hirst JA, McLellan JH, Price CP, et al. Performance of point-of-care HbA1c test devices: implications for use in clinical practice – a systematic review and meta-analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2016; 55(2): 167-180

---

<sup>24</sup>Guglielmone R, de Elías R, Kiener O, Collino C, Barzón S. Verificación de métodos en un laboratorio acreditado y planificación del control de calidad interno. Acta bioquímica clínica latinoamericana 2011; 45(2): 335-347.