

INSTITUTO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA

Montaje y estandarización de la determinación colorimétrica de hemoglobina glicosilada

Lic. Enrique Ezcurra Ferrer*

Ezcurra Ferrer, E.: *Montaje y estandarización de la determinación colorimétrica de hemoglobina glicosilada.*

Se describe el procedimiento analítico utilizado y la determinación de los coeficientes de variación, en condiciones óptimas y en condiciones de rutina, de 3 pools de hemolizados (A, B y C) cuyos valores fueron obtenidos utilizando un método cromatográfico de referencia. Se obtuvieron coeficientes de variación en condiciones óptimas para los pools A, B y C, que luego se incrementaron, al pasar el método a condiciones de rutina. La sensibilidad presentó un valor considerablemente menor al límite inferior del rango registrado, para este parámetro, en sujetos normales. Se monitoreó la linealidad de la reacción de color en la que se basa el método, resultando adecuada para un rango de concentraciones de 20-80 p.mol/l de soluciones de hidroximetil-furfural. Se concluye que el método evaluado posee parámetros de calidad satisfactorios que permiten utilizarlos en la determinación de hemoglobina glicosilada con fines asistenciales e investigativos.

INTRODUCCION

La determinación de hemoglobina glicosilada ha alcanzado gran relevancia en el campo de la diabetes mellitus en la última década. Numerosos estudios han demostrado que el nivel de hemoglobina glicosilada es un índice integrador de los niveles glicémicos promedio a que se han visto expuestos los hematíes circulantes durante su vida media, por lo que puede considerarse como un indicador objetivo del grado de control metabólico de cualquier paciente diabético.^{1,2} Se reconoce en la actualidad la gran importancia clínica que posee la determinación de hemoglobina glicosilada y su uso se ha extendido vertiginosamente en la práctica diabetológica tanto asistencial como investigativa.

Se han descrito muchos procedimientos analíticos para la cuantificación de las diversas fracciones glicosiladas de la hemoglobina A (que constituyen en su conjunto la hemoglobina glicosilada o HbA) y de acuerdo con el método empleado se pueden determinar las fracciones aisladas (HbA_{1c}, HbA y HbA) o medir globalmente los niveles de HbA_i.^{3,4}

*Fluckiger y Winterhalter*⁵ desarrollaron en 1976 un método colorimétrico basado en la producción de hidroximetil-furfural (HMF) por hidrólisis ácida del enlace cetamínico glucosahemoglobina y posterior detección del HMF mediante su reacción con ácido tiobarbitúrico.

Teniendo en cuenta que de las metodologías analíticas disponibles, la técnica de Fluckiger resultaba la más adecuada por su relativa sencillez, economía de recursos y posibilidad de aplicación tanto a la asistencia como a la investigación, se determinó realizar en el Laboratorio de Bioquímica Clínica del Instituto Nacional de Endocrinología el montaje y estandarización de la determinación colorimétrica de hemoglobina glicosilada (HbAi) cuyos resultados se informan en el presente trabajo.

MATERIAL Y METODO PROCEDIMIENTO ANALITICO

Se utilizó el protocolo suministrado por el doctor *Fluckiger*, cuyos detalles se reseñan a continuación.

1. Se tomaron 2 ml de hemolizado sin dializar, los cuales contenían 10 % de Hb total. Los hemolizados se prepararon de la siguiente forma: a los glóbulos lavados 3 veces con solución salina se les añadió de 1-1,5 volúmenes de agua destilada y 0,4 volúmenes de tetracloruro de carbono, se completó la hemólisis mediante agitación vigorosa durante 5 minutos. Después de centrifugar durante 20 minutos a 3 000 *rev/min*, el hemolizado se aspiró con una pipeta Pasteur evitando contaminación con fragmentos de restos celulares. Se determinó Hb total por el método de Drabkin¹¹ y se ajustó la concentración al 10 % de Hb total con agua destilada.
2. Se adicionó 1 ml de ácido oxálico 0,3 N.
3. Se incubó 1 hora a 100°C y luego se enfrió a temperatura ambiente.
4. Se añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 40% con agitación inmediata en mezclador vortex.
5. Se centrifugó durante 15 minutos a 3 000 *rev/min*, y se aspiraron cuidadosamente 2 ml del sobrenadante. En este paso, se debe evitar pipetear residuos del precipitado carmelita pues se obtendrían lecturas muy altas en la reacción final del color.
6. Se añadió 0,5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,05 M.
7. Se incubó durante 40 minutos a 40 °C, el color desarrollado fue estable por lo menos, durante 3 horas.
8. Se leyó la absorbancia en cubeta de 1 cm a 443 nm.
9. Se realizó el cálculo considerando que una absorbancia de 0,029 corresponde a 1% de HbAi en el hemolizado.

MUESTRAS ANALIZADAS

Se prepararon 3 *poolés* de hemolizados (cuyos niveles de HbAi fueron previamente determinados por el método cromatográfico de Trivelli¹²) en cantidad suficiente para realizar los estudios de variación en condiciones óptimas y en condiciones de rutina, de acuerdo con la metodología descrita por Whitehead.¹³

Alícuotas de los 3 *poolés* fueron congeladas a -70 °C hasta el momento del análisis.

PATRONES

Con vistas a corroborar la linealidad de la reacción de color final entre el HMF producido por hidrólisis ácida del hemolizado y el TBA, se preparó un patrón acuoso de HMF (mgr/ml) del cual se obtuvieron por las correspondientes diluciones, soluciones de HMF en el rango de 20-80 .mol/l. La curva completa se repitió en las primeras 10 corridas del estudio de variación en condiciones de rutina.

RESULTADOS

La tabla 1 resume los valores promedios hallados para los 3 *pool*es de hemolizados, A, B y C de acuerdo con el método cromatográfico. Cada *pool* fue procesado 5 veces por este método para corroborar que se encontraba dentro del rango útil de medición de la hemoglobina glicosilada (5-18 %).

Tabla 1. *Determinación de HbA_x por el método cromatográfico*

	N	X (% HbA _x)	DS	CV (%)
<i>Pool A</i>	5	6,04	0,29	4,8
<i>Pool B</i>	5	10,71	0,42	3,9
<i>Pool C</i>	5	14,43	0,61	4,2

La tabla 2 contiene los resultados del estudio de variación en condiciones óptimas de los 3 *pool*es mencionados, usando el método colorimétrico. Cada *pool* fue procesado individualmente en una corrida de 20 tubos, junto con una curva patrón de HMF.

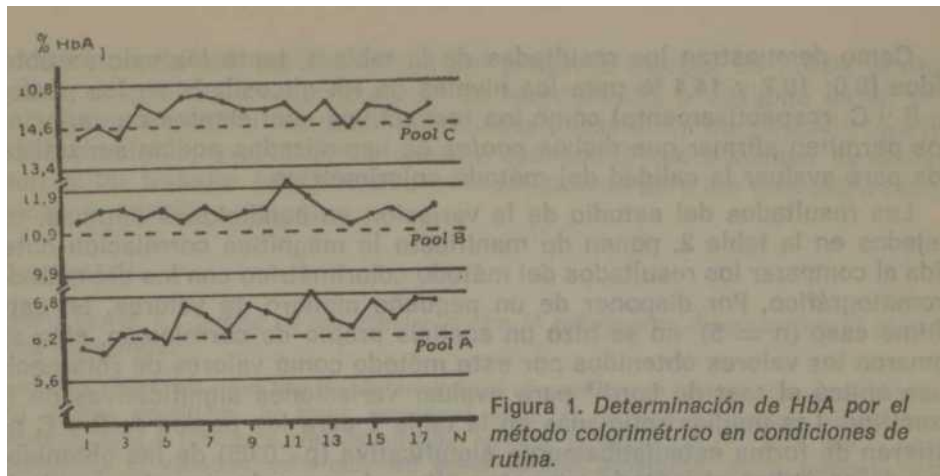
Tabla 2. *Determinación de HbA_x por el método colorimétrico en condiciones óptimas*

	N	X (% HbA _x)	DS	CV (%)
<i>Pool A</i>	20	6,23	0,26	4,1
<i>Pool B</i>	19	10,88	0,47	4,3
<i>Pool C</i>	19	14,64	0,61	3,6

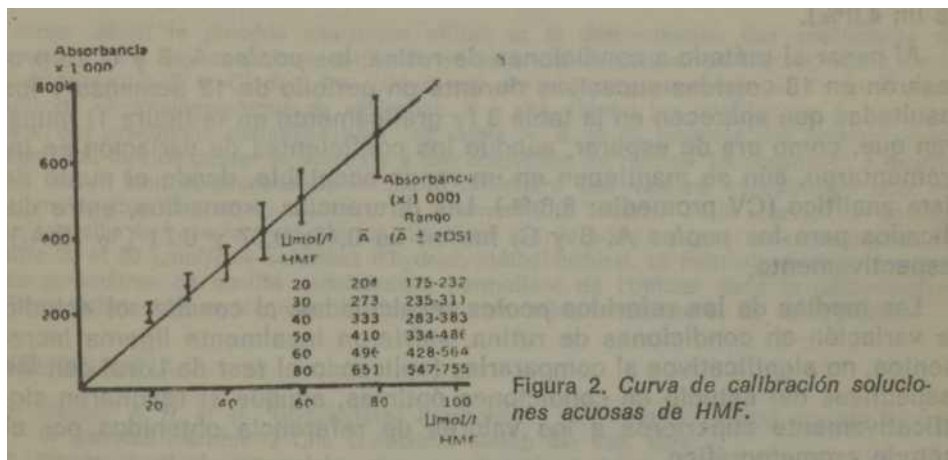
En la tabla 3 se presentan los resultados del estudio de variación en condiciones de rutina, que se obtienen al procesar por duplicado cada uno de los *pool*es (A, B y C) durante 18 corridas analíticas sucesivas en un período de 12 semanas. La figura 1 resume los resultados anteriores en la forma del gráfico clásico de Levy-Jennings.

Tabla 3. *Determinación de HbA₁ por el método colorimétrico en condiciones de rutina*

	N	I (% HbA ₁)	DS	CV{}
<i>Pool A</i>	18	6,31	0,47	7,4
<i>Pool B</i>	18	10,94 -	0,72	6,6
<i>Pool C</i>	18	14,86	0,95	6,4



En la figura 2 se presenta la curva de calibración obtenida después de 10 corridas sucesivas con patrones de HMF en el rango de 20-80 $\mu\text{mol/l}$. Cada punto representa el promedio de los 10 valores de absorbancia y el rango ± 2 DS obtenidos en dichas corridas, usando soluciones de trabajo de HMF preparadas a partir de la misma solución madre.



DISCUSION

La posibilidad de disponer de una limitada cantidad de resina de intercambio catiónico Bio-Rex 70, 100-200 mesh (Biorad) utilizada en el método cromatográfico de determinación de HbA (el más ampliamente empleado según la literatura) nos llevó a utilizar dicho método como referencia, para corroborar que los *pools* preparados contenían niveles de HbA diferentes entre sí y pertenecientes al rango común de medición de este parámetro.

Como demuestran los resultados de la tabla 1, tanto los valores obtenidos (6,0; 10,7 y 14,4 % para los niveles de Hb glicosilada en los *pooles* A, B y C, respectivamente) como los respectivos coeficientes de variación nos permiten afirmar que dichos *pooles* de hemolizados podían ser utilizados para evaluar la calidad del método colorimétrico.

Los resultados del estudio de la variación en condiciones óptimas, reflejados en la tabla 2, ponen de manifiesto la magnífica correlación obtenida al comparar los resultados del método colorimétrico con los del método cromatográfico. Por disponer de un pequeño número de valores, en este último caso ($n = 5$), no se hizo un análisis propio de correlación, sino se tomaron los valores obtenidos por este método como valores de referencia y se aplicó el *test* de Lord⁴ para evaluar variaciones significativas de la exactitud. Las medias reflejadas en la tabla 2 para los *pooles* A, B y C no difieren de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de las obtenidas cuando se utilizó el método cromatográfico, de acuerdo con el valor de L, obtenido aplicando el *test* de Lord.

Los coeficientes de variación en condiciones óptimas, obtenidos para los 3 *pooles* [4,1; 4,3 y 3,6%), reflejan una adecuada precisión del método para todo el rango de valores de hemoglobina glicosilada entre 6 y 15 %.

La sensibilidad del método, definida como $x2DS$ resultó igualmente satisfactoria, pues aún considerando la DS obtenida para el pool de nivel más alto (Pool C: 14,6%, DS = 0,61) se obtiene un límite mínimo de detección de 1,2% que es muy inferior al menor valor registrado en la literatura para los niveles de hemoglobina glicosilada en sujetos normales (alrededor de un 4,0%).

Al pasar el método a condiciones de rutina, los *pooles* A, B y C se procesaron en 18 corridas sucesivas durante un período de 12 semanas y los resultados que aparecen en la tabla 3 (y gráficamente en la figura 1) muestran que, como era de esperar, aunque los coeficientes de variación se incrementaron, aún se mantienen en un rango aceptable, desde el punto de vista analítico (CV promedio: 6,8 %). Las diferencias promedios, entre duplicados para los *pooles* A, B y C, fueron de 0,45; 0,67 y 0,71 (% HbA), respectivamente.

Las medias de los referidos *pooles* recalculadas, al concluir el estudio de variación en condiciones de rutina, sufrieron igualmente ligeros incrementos, no significativos al compararlas (aplicando el *test* de Lord) con las respectivas del estudio en condiciones óptimas, aunque sí resultaron significativamente superiores a los valores de referencia obtenidos por el método cromatográfico.

El estudio de linealidad (figura 2) muestra que, aunque las lecturas de absorbancia para cada una de las concentraciones individuales de HMF varía en un rango amplio, se obtiene una respuesta lineal para el rango de concentraciones de HMF de 20-28 mol/l. Se observa que a bajas concentraciones de HMF (20-30 mol/l), las lecturas tienden a dar valores situados por encima de la recta, lo que pudiera estar relacionado con la estabilidad de las soluciones diluidas de HMF. Teniendo esto en cuenta, se recomienda que las soluciones de trabajo de HMF se preparen a partir de la solución madre, el mismo día que van a ser utilizadas.

De acuerdo con los resultados del presente trabajo, se puede afirmar que la determinación colorimétrica de hemoglobina glicosilada es un procedimiento analítico que posee adecuados parámetros de calidad (sensibilidad, precisión, exactitud, sencillez y economía) que permiten su utilización en los trabajos asistenciales e investigativos para los que dicha determinación resulta relevante.

SUMMARY

Ezcurra Ferrer, E.: *Setting up and standardization of colorimetric determination of glycosylated hemoglobin.*

Analytical procedure used and the determination of coefficients of variation, under optimal and routine conditions, of three hemolized pools (A, B and C), whose values were obtained using a reference chromatographic method, is described. For A, B and C pools, coefficients of variation were obtained under optimal conditions, which furtherly were increased at the method turned out to routine conditions. Sensitivity presented a considerably minor value than that of lower range limit registered for this parameter in normal subjects. Lineation of color reaction, in which the method is based, was monitored, resulting it appropriate for a concentration range of 20-80 **pmol/l** of hydroxymethyl-furfural solutions. As conclusion it is stated that the valued method has parameters of satisfactory quality which allow to use them in the determination of glycosilated hemoglobin with assistance and investigative purposes.

RÉSUMÉ

Ezcurra Ferrer, E.: *Mise sur pied et standardisation de la détermination colorimétrique d'hémoglobine glycosylée.*

L'auteur décrit le procédé analytique utilisé et la détermination des coefficients de variation, dans des conditions optimales et dans des conditions de routine, sur 3 pools d'hémolisés (A, B et C) dont les valeurs ont été obtenues au moyen de l'emploi d'une méthode chromatographique de référence. Il a été obtenu les coefficients de variation dans des conditions optimales pour les **pools** A, B et C, lesquels ont ultérieurement augmenté, lors de passer la méthode à des conditions de routine. La sensibilité a montré une valeur bien au-dessous de la limite inférieure des valeurs enregistrées pour ce paramètre chez des sujets normaux. On a surveillé la linéarité de la réaction de couleur sur laquelle se base la méthode, et elle s'est avérée adéquate pour des concentrations entre 20 et 80 $\mu\text{mol/l}$ de solutions d'hydroxy-méthyl-furfural. La méthode évaluée possède des paramètres de qualité satisfaisants, permettant de l'utiliser dans la détermination d'hémoglobine glycosylée dans le domaine des soins médicaux et de la recherche.

BIBLIOGRAFIA

1. Gabbay, I. H. et al.: Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 44: 859, 1977.
2. Gonen, B. et al.: Hemoglobin A_{1c}: an indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet* 3: 734, 1976.
3. Graf, F.; J. B. Halter; D. Porte: Glycosilated hemoglobin in normal subjects and subjects with maturity-onset diabetes. *Diabetes* 27: 834, 1978.
4. Welch, S. G.; B. J. Boucher: A rapid microscale method for the measurement of HbA_{1c}. *Diabetol* 14: 209, 1978.
5. Cole, F. A. et al.: A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobin using high pressure liquid chromatography. *Metabolism* 27: 289, 1978.
6. Thornton, W. E.; A. P. Schellekens; G. T. Sanders: Assay of glycosylated hemoglobin using agar electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 18: 182, 1981.
7. Kynoch, P. A.; H. Lehman: Rapid estimation (2.5 hr) of glycosylated hemoglobin for routine purposes. *Lancet* 2: 16, 1977.

8. *Fischer, R. W. et al.*: The colorimetric determination of HbA_{1c} in normal and diabetic subjects. Clin Lab Haematol 2: 129, 1980.
9. *Klenk, D. C. et al.*: Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods and effects of common interferences. Clin Chem 28: 2088, 1982.
10. *Fluckiger, R.; K. H. Winterhalter*: In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. FEBS Lett 71: 356, 1976.
11. *Drabkin, D. L.*: A simplified technique for large scale crystallization of human hemoglobin. Isomorphous transformation of hemoglobin and myoglobin in the crystalline state. Arch Biochem Biophys 21: 224, 1949.
12. *Trivelli, L. A.; H. M. Ranney; H. T. Lai*: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. N Eng J Med 284: 353, 1971.
13. *Whitehead, T. P.*: Quality Control in Clinical Chemistry New York, John Wiley, 1977.
14. *Thielman, K.*: Principios de Metodología en Bioquímica Clínica. La Habana, Editorial Organismos, 1973.

Recibido: 9 de septiembre de 1985

Aprobado: 8 de diciembre de 1985

Lic. Enrique Ezcurra Ferrer

Instituto Nacional de Endocrinología

Zapata y D.

Vedado

Ciudad de La Habana

Cuba