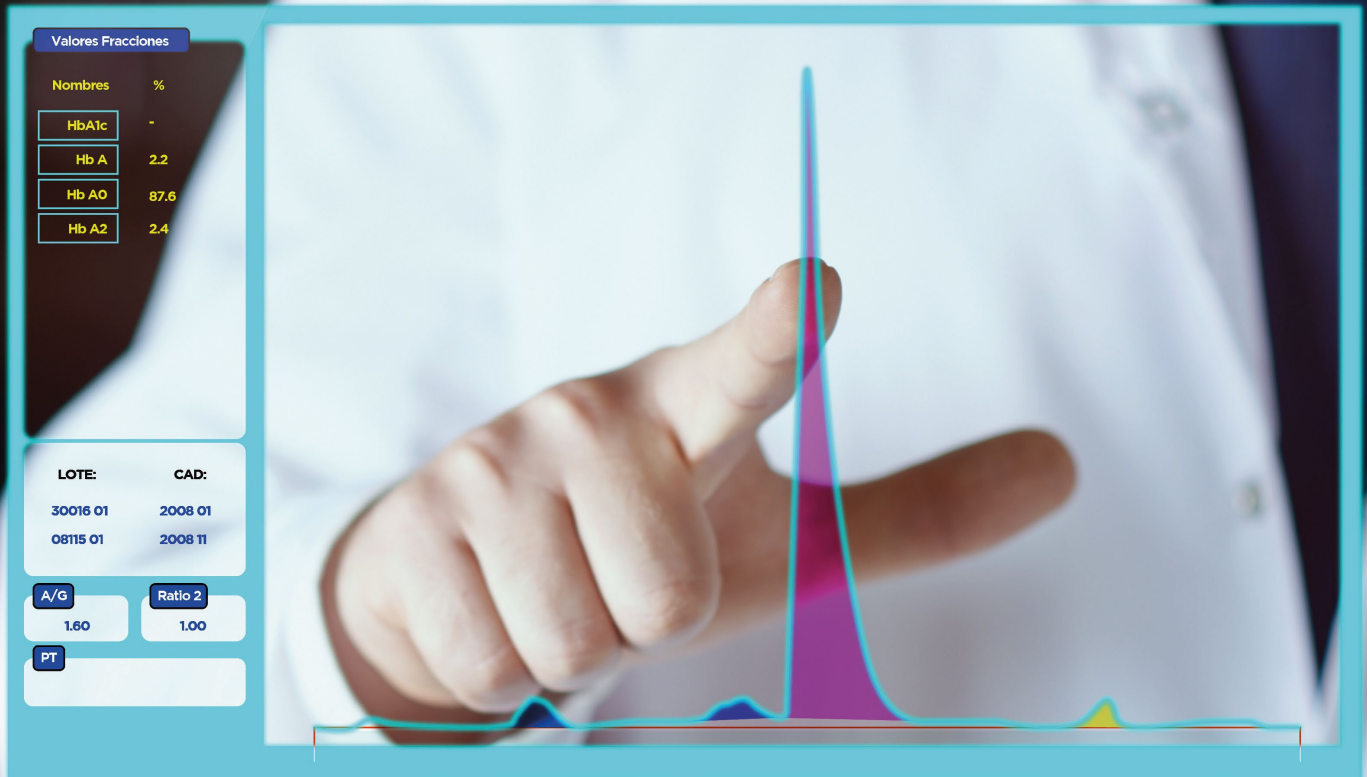


Medición incorrecta de la hemoglobina glicada en pacientes sin Hemoglobina A

Minghuan Suo, et al. División de laboratorio Clínico, Zhongshan Hospital.

Este resumen fue traducido al español y se extrajo del original publicado en Portland Press como:
Minghuan Suo, Dongmei Wen, Weijia Wang, Decai Zhang, Shengnan Xu, Xia Wang, Ting Hu; False measurement of glycosylated hemoglobin in patients without hemoglobin A. Biosci Rep 31 January 2019; 39 (1): BSR20180128. doi: <https://doi.org/10.1042/BSR20180128>



La Hemoglobina glicada (HbA1c), que es una fracción de la hemoglobina A, es un marcador bioquímico. La proteína se forma a través de la glicación no enzimática del residuo de valina en el N-terminal de la cadena β de la hemoglobina con glucosa. La prueba de HbA1c se utiliza de forma rutinaria para monitorizar el control glucémico a largo plazo y evaluar el riesgo de complicaciones^{1, 2}. En la directriz de 2010 de la Asociación Americana de Diabetes, se recomendó la HbA1c como un criterio para la detección y el diagnóstico de diabetes utilizando un valor de corte del 6,5% (48 mmol / mol)³. También se han establecido estrategias terapéuticas, de acuerdo con la prueba de HbA1c⁴. Por lo tanto, la medición precisa de HbA1c es extremadamente crucial para las prácticas clínicas. Actualmente, se utilizan una variedad de métodos basados en diferentes principios para la medición de HbA1c en laboratorios clínicos y estas metodologías incluyen cromatografía líquida de alto rendimiento por intercambio catiónico (CE-HPLC), cromatografía líquida de alto rendimiento por afinidad a Boronato (BAC), electroforesis capilar (EC) e inmunoensayo. Sin embargo, los resultados de la prueba de HbA1c de estos métodos pueden verse influidos por las condiciones fisiopatológicas de los pacientes, como hemólisis, reducción de la vida útil de los eritrocitos, interferencia técnica de ciertas variantes de hemoglobina o expresión elevada de HbF⁵. Más recientemente, varios estudios, informaron que la medición de HbA1c se vio afectada significativamente por pacientes con variantes de Hb (HbAS, HbAE, HbAC, HbAD, HbAJ (Bangkok), HbAG (Taipei)) y la creciente evidencia sugirió que los resultados de HbA1c en Hb las variantes detectadas mediante la implementación del método BAC, así como el inmunoensayo de Roche Tinaquant, se vieron mucho menos afectadas que el resultado del método de referencia de la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC)⁶⁻⁹.

El componente heterocigoto es uno de los elementos críticos para causar enfermedad genética en el ser humano. La medición de HbA1c está estrechamente relacionada con el cribado o diagnóstico de pacientes con heterocigosis compuesta con variantes de Hb. En particular, se informaron pocos estudios en la medición de HbA1c de pacientes heterocigotos compuestos sin expresión de HbA mediante el uso de estos ensayos de examen. En el presente estudio, la HbA1c en las muestras de sangre recolectadas de cinco pacientes homocigotos sin expresión de HbA, fue analizada por cinco sistemas comunes de detección de HbA1c para comprender mejor la medición de HbA1c en la aplicación clínica.

Muestras

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Zhongshan de la Universidad Sun Yat-sen. Un total de 40 muestras de sangre entera con EDTA recolectadas de muestras previamente analizadas fueron destinadas al análisis de HbA1c por la metodología HPLC. Estas muestras también se analizaron mediante electroforesis capilar para confirmar la ausencia de variantes de Hb. La HbA1c en las 40 muestras sin variantes de HA (4.4-14.4% HbA1c) se analizaron luego con diferentes ensayos. Además, cinco muestras de sangre sin expresión de hemoglobina A obtenidas de muestras clínicas previamente analizadas se sometieron a análisis de hemoglobina mediante electroforesis capilar y el tipo de hemoglobina se confirmó mediante análisis de genotipificación. Se recolectaron cinco muestras de componente heterocigoto: el genotipo de la primera muestra fue

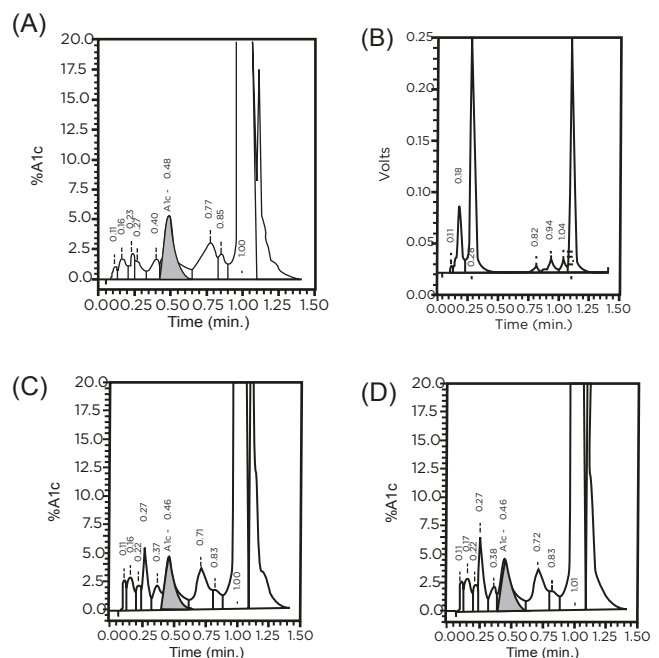
$\alpha\alpha / \alpha\alpha$ y $\beta^{CD26} / \beta^{CD41-42}$, la segunda muestra fue $\alpha\alpha / \alpha\alpha$ y $\beta^{V52-654} / \beta^{NewYork}$, la tercera muestra fue similar a la segunda muestra, $\alpha\alpha / \alpha\alpha$ y $\beta^{CD41-42} / \beta^{NewYork}$, la cuarta muestra fue $\alpha\alpha / \alpha\alpha$ y $\beta^{CD41-42} / \beta^{J-Bangkok}$, la quinta muestra fue $-\text{SEA} / -\alpha^{42-Q-Tailandia}$ y β / β . Los cinco pacientes anteriores eran pacientes no diabéticos con glucemia en ayunas normal. Todas las muestras de sangre fueron alícuotadas por cuadruplicado y congeladas a -70°C antes del análisis.

Discusión y Resultados

El valor de HbA1c refleja el nivel glucémico medio del paciente en las últimas 6 a 8 semanas. La hemoglobinopatía altera la composición y estructura de la hemoglobina y puede dar lugar a una mala interpretación del resultado de la HbA1c. Se ha informado que las variantes de hemoglobina afectan potencialmente la precisión de los métodos de examen actuales para la medición de la HbA1c¹⁰⁻¹². Sin embargo, los valores de HbA1c medidos en pacientes heterocigotos rara vez se informan.

Los valores de HbA1c pueden evaluarse mediante varios métodos basados en la carga molecular (cromatografía líquida de alta resolución de intercambio catiónico (CE-HPLC) y electroforesis) o la estructura molecular (inmunoensayos, cromatografía de afinidad de boronato y espectrometría de masas). En los cinco casos actuales, los dos principios informaron dos de cinco y tres de cinco resultados falsos de HbA1c, respectivamente. Debido a que la Hb New York tiene una carga similar a la HbA y puede eluirse junto con la HbA Hb New York en el segundo y tercer casos, se identificó erróneamente como HbAO debido a la elución en la retención respectiva y Hb (New York) 1c se identificó erróneamente como HbA1c. La Hb J-Bangkok es otra variante de hemoglobina común en China y su carga es diferente a la de la HbA.

Por tanto, los cromatogramas de la metodología HPLC se mostraron anormalmente. Lo et al.¹⁸ informaron de un caso de resultados de HbA1c exageradamente normales debido a la identificación errónea de HbG Taipei como HbAO por metodología HPLC. Estos resultados mostraron que la CE-HPLC fue obviamente interferida por variantes de Hb con diferentes cargas y podría resultar en una concentración errónea de HbA1c. **Figura. 3**



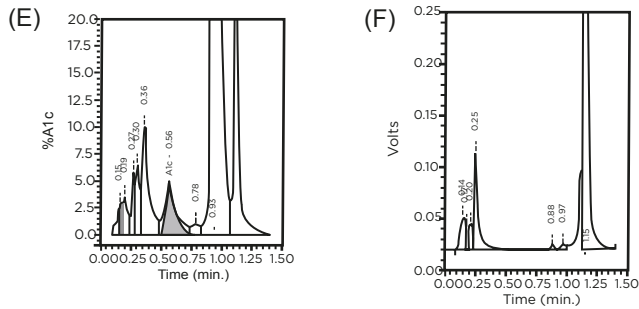


Figura 3. Cromatograma de cinco portadores hetetocigotos dobles por HPLC. (A) Muestra normal; (B) portador β CD26/ β CD41-42; (C) portador β V52-654/ β NewYork; (D) portador β CD41-42/ β NewYork; (E) portador β CD41-42/ β J-Bangkok; (F) portador -SEA/- α 4.2-Q-Thailand.

La electroforesis capilar (EC) es un nuevo ensayo para evaluar la HbA1c basado en la separaci3n de la propiedad y la carga de la Hb por electroforesis capilar. Existe una fuerte coherencia entre los resultados de CE y HPLC. Muchas publicaciones han informado de que la resoluci3n de CE es superior a la CE-HPLC como resultado de permitir la separaci3n de muchas variantes de Hb comunes y raras de la fracci3n de HbA0 [19-21]. De cinco muestras sin expresi3n de HbA, la metodolog3a CE pudo detectar HbA1c hasta cuatro muestras. Aunque el sistema CE identific3 err3neamente la Hb F como HbA0 en la primera muestra y la Hb (Nueva York) O como HbA0 en la segunda y tercera muestra, el sistema no mostr3 los valores de HbA1c, lo que podr3a hacer que los laboratorios presten m3s atenci3n a los pacientes con fracciones de hemoglobina. Sin embargo, en la quinta muestra, el la metodolog3a CE detect3 los valores de HbA1c sin mostrar la expresi3n de HbH e identific3 err3neamente HbQ-Tailandia como HbA0. La literatura hab3a informado que la metodolog3a CE produjo dos resultados inexactos de las 18 variantes raras (Hb Silver Springs y Hb J-Broussais)¹¹. Para HbG Coushatta, el sistema de electroforesis capilar produjo un valor de HbA1c diferente de los resultados detectados por electroforesis capilar-HPLC en t3ndem (m3todo de referencia IFCC)²². Aunque la electroforesis capilar podr3a separar muchas variantes de Hb comunes y raras de la fracci3n de HbA0, tambi3n debemos centrarnos en analizar los datos crudos de las diferentes variantes de Hb y encontrar los problemas de los electroferogramas. **Figura. 4**

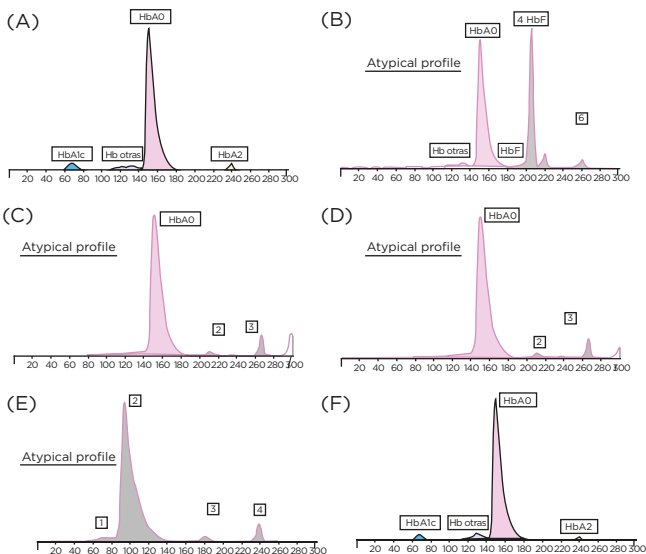


Figura 4. Cromatograma de cinco portadores hetetocigotos dobles por Electroforesis capilar. (A) Muestra normal; (B) portador β CD26/ β CD41-42; (C) portador β V52-654/ β NewYork; (D) portador β CD41-42/ β NewYork; (E) portador β CD41-42/ β J-Bangkok; (F) portador -SEA/- α 4.2-Q-Thailand.

Conclusiones

Cada sistema de examen para la medici3n de HbA1c no pudo eliminar la interferencia de heterocigotos dobles en nuestro trabajo. La implementaci3n de tales m3todos puede no generar resultados confiables para la aplicaci3n cl3nica. Aunque la CE puede ser superior a otros sistemas, es importante saber que la hemoglobinopat3a puede afectar la medici3n de HbA1c. Se sugiere que los pacientes con variantes heterocigotos utilicen un m3todo no basado en Hb, como la fructosamina, la alb3mina glucosilada o la monitorizaci3n continua de la glucosa, para evaluar el control gluc3mico a largo plazo en lugar de la medici3n de la Hb A1c. Debido a las altas frecuencias de variantes de hemoglobina, es importante aclarar estas limitaciones cuando se utilizan estos m3todos para medir la Hb A1c.

BIBLIOGRAF3A

- 1 Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) 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.* 329, 977-986, <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>
- 2 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group (1998) Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352, 837-853, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07019-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07019-6)
- 3 American Diabetes Association (2010) Standards of medical care in diabetes—2010. *Diabetes Care* 33, S11-S61, <https://doi.org/10.2337/dcl0-S011>
- 4 American Diabetes Association (2014) Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 37, S5-S15
- 5 Kutter, D. and Thoma, J. (2006) Hereditary spherocytosis and other hemolytic anomalies distort diabetic control by glycated hemoglobin. *Clin. Lab.* 52, 477-481
- 6 Little, R.R., Vesper, H., Rohlfing, C.L., Ospina, M., Safar-Pour, S. and Roberts, W.L. (2005) Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits. *Clin. Chem.* 51, 264-265, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.043141>
- 7 Connolly, S., Hanson, S., Higgins, T., Rohlfing, C. and Little, R. (2013) Assessment of the validity of Trinity Biotech ultra2 hemoglobin A1c results in the presence of HbE or HbD Punjab trait. *Clin. Chem.* 59, A161
- 8 Wen, D.M., Zhang, X.M., Suo, M.H., Xu, S.N., Zhang, D.C. and Chen, Y.Q. (2016) Effects of hemoglobin J-Bangkok traits on measurements of glycated hemoglobin by five methods. *Natl. Med. J. China* 96, 113-117
- 9 Jaisson, S., Leroy, N., Desroches, C., Tonye-Libby, M., Guillard, E. and Gillery, P. (2013) Interference of the most frequent haemoglobin variants on quantification of HbA1c: comparison between the LC-MS (IFCC reference method) and three routinely used methods. *Diabetes Metab.* 39, 363-369, <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2013.01.004>
- 10 Little, R.R., Rohlfing, C.L., Hanson, S., Connolly, S., Higgins, T. and Weykamp, C.W. (2008) Effects of hemoglobin HbE and HbD traits on measurements of glycated Hb(HbA1c) by 23 methods. *Clin. Chem.* 54, 1277-1282, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.103580>
- 11 Little, R.R., Laulu, S.L., Hanson, S.E., Rohlfing, C.L. and Schmidt, R.L. (2015) Effects of 49 different rare Hb variants on HbA1c measurement in eight methods. *J. Diabetes Sci. Technol.* 9, 849-856, <https://doi.org/10.1177/1932296815572367>
- 12 Lee, S.C., Wang, L.H., Tsai, S.M., Fang, H.Y. and Tsai, L.Y. (2011) Effects of the HbE, HbH and HbG-Taichung variants on HbA1c values by the Bio-Rad variant II turbo analyzer. *Clin. Biochem.* 44, 1338-1342, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.08.907>
- 13 World Health Organization (WHO). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf (accessed July 3, 2012)
- 14 Xu, X.M., Zhou, Y.Q., Luo, G.X. et al. (2004) The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong province: implications for the future health burden and population screening. *J. Clin. Pathol.* 57, 517-522, <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.014456>
- 15 Lin, M., Wang, Q., Zheng, L., Huang, Y., Lin, F., Lin, C.P. et al. (2011) Prevalence and molecular characterization of abnormal hemoglobin in eastern Guangdong of southern China. *Clin. Genet.* 81, 165-171, <https://doi.org/10.1111/j.1365-0004.2011.01627>
- 16 Lou, J.W., Wang, T., Liu, Y.H., He, Y., Zhong, B.M., Liu, J.X. et al. (2014) Prevalence and molecular characterization of structural hemoglobin variants in the Dongguan region of Guangdong province, southern China. *Hemoglobin* 38, 282-286, <https://doi.org/10.3109/03630269.2014.928779>
- 17 Li, D., Liao, C., Xie, X., Zhong, H. and Li, J. (2007) Four cases of Hb Q-H disease found in Southern China. *Hemoglobin* 31, 109-111, <https://doi.org/10.1080/03630260601059340>
- 18 Lo, V.M., Ma, E.S., Chau, E.M. and So, J.C. (2012) A spuriously 'normal' haemoglobin A1c result. *Ann. Clin. Biochem.* 49, 408-411, <https://doi.org/10.1258/acb.2011.011202>
- 19 Dessi, M., Pieri, M., Pignatola, S., Martino, F.G. and Zenobi, R. (2015) Performances of capillary electrophoresis and HPLC methods in HbA1c determination: diagnostic accuracy in HbS and HbD-Iran variants' presence. *J. Clin. Lab. Anal.* 29, 57-60, <https://doi.org/10.1002/jcla.21728>
- 20 Weykamp, C., Waenink-Wiegers, H., Kemna, E. and Siebelder, C. (2013) HbA1c: performance of the Sebia Capillarys 2 Flex Piercing. *Clin. Chem. Lab. Med.* 51, e129-e131, <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0560>
- 21 Jaisson, S., Leroy, N., Meurice, J., Guillard, E. and Gillery, P. (2012) First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing(R) (Sebia) as a new analyzer for HbA1c assay by capillary electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 50, 1769-1775, <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0017>
- 22 Cheng, X., Li, M., Wu, J. and Su, W. (2015) HbG-Coushatta: an unexpected discovery during HbA1c measurement. *Clin. Chim. Acta* 444, 163-166, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.02.010>
- 23 Connolly, S., Hanson, S., Higgins, T., Rohlfing, C. and Little, R. (2013) Assessment of the validity of Trinity Biotech ultra2 hemoglobin A1c results in the presence of HbE or HbD Punjab trait. *Clin. Chem.* 59, A161
- 24 Lin, C.N., Emery, T.J., Little, R.R., Hanson, S.E., Rohlfing, C.L., Jaisson, S. et al. (2012) Effects of hemoglobin C, D, E, and S traits on measurements of HbA1c by six methods. *Clin. Chim. Acta* 413, 819-821, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.12.019>