

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA.
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”**

**COMPARACIÓN DEL MÉTODO INMUNOTURBIDIMÉTRICO Y
ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (HbA1c).**

GABRIEL BECERRIL GARCÍA.

ASESORES:

DRA. CLAUDIA ANGÉLICA SOTO PEREDO

QFB. JUAN REYES BARRERA

Fecha de inicio: 11-may-15

Fecha de término: 11-nov-15

1.- INTRODUCCIÓN.	3
2.- MARCO TEÓRICO.	3
2.1.- Diabetes.	3
2.2.- Criterios para el diagnóstico de diabetes.	6
2.3.- Hemoglobina glucosilada.	7
2.4.- Métodos de cuantificación.	9
2.4.1.- Electroforesis capilar (EC).	10
2.4.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC intercambio iónico.)	10
2.4.3.- Mini columnas.	11
2.4.4.- Inmunoturbidimetría.	11
3.- Planteamiento del problema.	12
4.- Justificación.	13
6.- Hipotesis.	13
7.- Objetivos.	13
7.1.- Objetivo general:	13
7.2.-Objetivo particular:	13
8.- Material y métodos.	14
8.1.- Analizador Cobas 6000.	14
8.1.1.- Principio de la prueba.	14
8.1.2.- Componentes del analizador.	15
8.1.3.- Reactivos utilizados.	15
8.2.-Analizador Sebia2 Capillarys-flex piercing.	16
8.2.1.- Principio de la prueba.	16
8.2.2.- Componentes del analizador.	16
9.- Desarrollo experimental.	17
9.1.- Linealidad (intervalo analítico).	17
9.2.- Precisión.	18
9.3.- Veracidad.	18
9.4.- Incertidumbre	18
10.- Resultados y análisis de resultados.	19
10.1.- Prueba de Linealidad del analizador Cobas 6000	19

10.2.- Prueba de Linealidad del analizador Sebia Capillarys 2 flex-piercing.	20
10.3.- Prueba de Precisión de analizador Cobas 6000.	21
10.4.- Resultados de la prueba de precisión para Sebia Capillarys 2 flex-piercing.	22
10.5.- Prueba de Veracidad para el analizador Sebia Capillarys 2 flex-piercing.	22
10.6.- Prueba de Veracidad para el analizador Cobas 6000.	23
10.7.- Prueba de incertidumbre para el analizador Cobas 6000.	23
10.8.- Prueba de incertidumbre para el analizador Sebia 2 Capillarys-flex piercing.	24
11.- Conclusión.	25
12.- Referencias bibliográficas.	26

1.- INTRODUCCIÓN.

La diabetes mellitus (DM) constituye un problema sanitario de gran magnitud por su prevalencia y morbimortalidad. Las complicaciones microvasculares y macrovasculares de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) varían en función de varios factores y su tratamiento supone un gasto sanitario tres veces superior al del tratamiento y control de la diabetes. Para el seguimiento de la DM2 la variable más ampliamente usada y recomendada es la HbA1c, ya que refleja los valores medios de glucosa en sangre de los 2-3 meses anteriores. Se ha demostrado que un descenso de las concentraciones de HbA1c se relaciona con una disminución importante de las complicaciones de la DM2 y, dentro del ámbito asistencial, las guías de práctica clínica y los protocolos de seguimiento incluyen, como mínimo, 2 determinaciones de HbA1c anuales. Estas medidas suponen varias visitas para obtención y transmisión de un resultado analítico. Anualmente, una HbA1c se solicita junto con otros parámetros bioquímicos, pero el resto sólo se acompañan de la glucemia. Sería útil realizar las determinaciones únicas de la HbA1c durante la visita para reducir el número de desplazamientos de los pacientes, consiguiendo rapidez en la toma de decisiones sobre el seguimiento, tratamiento y mejorando la productividad. ⁽¹⁾

2.- MARCO TEÓRICO.

2.1.- Diabetes.

La DM es uno de los desórdenes metabólicos más comunes en el mundo y la prevalencia que tiene en adultos ha ido incrementando en las últimas décadas. ⁽²⁾ La DM es generada por anomalías en la secreción y/o en la acción de la insulina, que originan diferentes formas de DM, entre las que se encuentra el tipo 2, que es la de más alta prevalencia y se caracteriza por presentar resistencia a la insulina, por lo tanto, el organismo es incapaz de utilizarla eficazmente. ⁽³⁾ El aumento exagerado de la prevalencia de la diabetes mellitus se relaciona con el aumento de la población mundial, el envejecimiento de la misma, la urbanización y, sobre todo, con el incremento de la obesidad y de la inactividad física, situación que explica por qué la epidemia afecta con mayor prevalencia a los países industrializados, sin que sean excluidos los países en vías de desarrollo. ⁽⁴⁾ Los daños que ocasiona van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, en la diabetes tipo 1, con la consiguiente deficiencia de insulina, hasta anomalías que causan resistencia a la acción de la insulina. La base de las anomalías del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las

proteínas en la diabetes son consecuencia de la acción deficiente de la insulina en los tejidos diana. La acción deficiente de la insulina se debe a la inadecuada secreción de esta y/o a la disminución de la respuesta tisular a la insulina en uno o más puntos de las vías complejas de acción hormonal. La alteración de la secreción de insulina y los defectos en la acción de la insulina coexisten con frecuencia en el mismo paciente, y a menudo no está claro qué anomalía, si es que está sola, es la causa principal de la hiperglucemia. ⁽⁵⁾ En su etapa inicial no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente y no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como enfermedades cardiovasculares, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura. ⁽⁶⁾

La DM2 se caracteriza por presentar hiperglucemia, y se asocia con el deterioro en el tiempo, disfunción y falla de órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón, y vasos sanguíneos. ⁽³⁾ De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuando en el año 1985 la población mundial de diabéticos era de 30 millones de pacientes, en el año 2009 había aumentado a 220 millones de individuos con DM2, y se estima que, de continuar con esta tendencia, llegaría a 366 millones en el año 2030. ⁽⁴⁾

Los estilos de vida poco saludables son altamente prevalentes entre niños, adolescentes y adultos mexicanos, propiciando un aumento importante de la obesidad y sobrepeso, principal factor de riesgo modificable de la DM2. Así, la prevalencia de esta la población ha incrementado sustancialmente en las últimas décadas. ⁽⁶⁾

Sin embargo, el estado actual de los diabéticos tipo 2 mexicanos se conoce sólo parcialmente, información que es necesaria para cimentar y fortalecer los esfuerzos que se requieren en prevención a todos los niveles a fin de contender una de las más grandes y emergentes amenazas de la viabilidad de los sistemas de salud, la diabetes. Durante las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes tipo 2 en México se ha incrementado y actualmente es la segunda causa de muerte en el país. ⁽⁶⁾

Del total de la población de adultos en México, 9.17% reportó tener un diagnóstico previo de diabetes tipo 2 por un médico, lo que equivale a 6.4 millones de personas. Por género, este porcentaje fue de 8.60% entre los hombres y 9.67% entre las mujeres, lo que equivale a 2.84 millones de hombres y 3.56 millones de mujeres. ⁽⁷⁾ (fig.1).

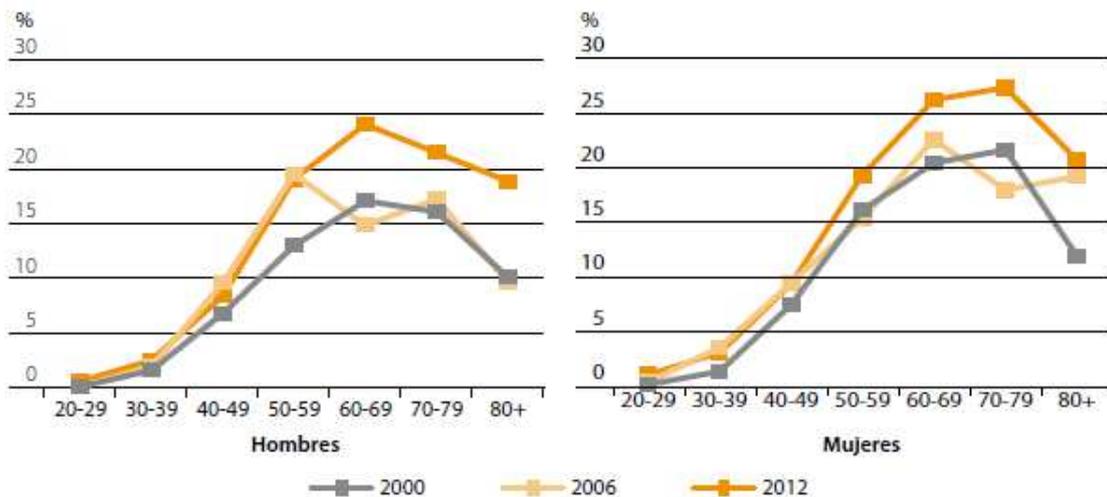


Figura 1. Proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes por sexo y edad. México, ENSA 2000, ENSANUT 2006 y 2012.

Del total de personas con diagnóstico de DM2, únicamente 85.75% atiende esta condición de salud. De ellos, la mayoría acude al IMSS (39.00%), en segundo lugar, a instituciones financiadas por el SPSS (28.27%), seguido del sector privado (21.33%) y otras instituciones de seguridad social (11.40%). Los que no se atienden presentan una importante variación por condición de aseguramiento: en tanto que únicamente 4% de los que reportaron contar con aseguramiento privado no se atiende, 27.5% de los diabéticos que no cuentan con protección en salud (cerca de 280 000 individuos) no ha acudido para atenderse de este padecimiento durante al menos un año. ⁽⁷⁾

Considerando los datos de la Ensa 2000, las Ensanut 2006, 2012, y la Ensanut MC 2016, la prevalencia de DM2 por diagnóstico previo ha aumentado con una tendencia anual positiva de 2.7%. ⁽⁸⁾

En 2016, la prevalencia de diabetes fue de 9.4%, es decir 2.2% relativamente mayor respecto a la de 2012 (diferencia no significativa). Actualmente, en el país hay poco más de 6.4 millones de personas que viven con DM2 diagnosticada, cerca de 60,000 más que en 2012. En ese mismo año la prevalencia se incrementó relativamente en 31.4% respecto a la de 2006; en los adultos de 40 a 59 años se elevó en 39.6%, y en los de 60 años y más de edad, 38.3%. En 2016 la prevalencia se incrementó exclusivamente en los adultos de 60 años y más (13.2% relativamente a la de 2012). ⁽⁸⁾ (Fig.2).

Encuesta [†]	Prevalencia cruda (IC95%)	Prevalencia ajustada por edad (IC95%)*	Población con DM (miles)	Mediana del tiempo de evolución en años (Q1, Q3)	Mediana de la edad de diagnóstica, años (Q1, Q3)	Cambio en la prevalencia de DM %
Ensa 2000	5.7 (5.3-6.1)	7.4 (6.7-8.3)	2 828	6.5 (3.3-13)	47.3 (38.6-56.2)	
Grupo de edad						
20-39	1.4 (1.2-1.7)	1.5 (1.3-1.8)	433	3.3 (1.1-6.5)	29.8 (25.2-33.7)	
40-59	9.8 (9.1-10.7)	10.3 (9.5-11.1)	1 334	5.4 (3.3-10.8)	43.5 (38.0-48.8)	
60+	17.5 (16.1-18.9)	12.3 (10.2-14.8)	1 061	10.8 (4.3-17.3)	57.2 (49.4-62.9)	
Ensanut 2006	7.0 (6.6-7.5)	8.3 (7.5-9.1)	4 212	6.0 (2.0-12.0)	48.0 (39.0-57.0)	22.8
Grupo de edad						
20-39	1.8 (1.5-2.2)	1.8 (1.5-2.2)	545	2.3 (0.6-5.0)	31 (26.0-34.0)	28.6
40-59	9.6 (8.8-10.5)	10.0 (9.2-10.9)	1 905	5 (2.0-10.0)	44 (39.0-49.0)	-2.0
60+	17.5 (16.1-19)	15.3 (12.9-18.1)	1 761	10 (4.0-15.0)	59.0 (52.0-65.0)	0.0
Ensanut 2012	9.2 (8.8-9.5)	9.7 (9.2-10.3)	6 407	6.0 (2.0-12.0)	48.5 (40.0-57.9)	31.4
Grupo de edad						
20-39	1.8 (1.5-2.0)	1.8 (1.5-2.0)	628	2 (0.8-5.0)	31 (26.8-35)	0.0
40-59	13.4 (12.6-14.3)	13.4 (12.6-14.3)	3 175	5 (2.0-10.0)	44 (39-49)	39.6
60+	24.2 (22.7-25.8)	16 (14.4-17.7)	2 604	10 (4.0-17.0)	59 (51-65)	38.3
Ensanut MC 2016	9.4 (8.3-10.8)	9.9 (8.9-10.9)	6 465	7.0 (3.0-15.0)	49.0 (40.0-57.0)	2.2
Grupo de edad						
20-39	1.5 (1.1-2.1)	1.5 (1.1-2.1)	522	3 (0.5-5.0)	31 (28-34)	-16.7
40-59	12.4 (10.5-14.5)	12.8 (11.0-14.8)	2 742	5 (2.0-11.8)	44 (39-49.9)	-7.5
60+	27.4 (23.4-31.7)	18.8 (16.4-21.6)	3 201	10 (5.0-20)	57 (50-62)	13.2

Figura 2. Prevalencia de diabetes mellitus con diagnóstico previo en adultos, por encuesta. México, Ensa 2000, Ensanut 2006 y 2012 y Ensanut MC 2016.

2.2.- Criterios para el diagnóstico de diabetes.

Hasta el año 2009, cuando el Comité Internacional de Expertos, conformado por representantes de la American Diabetes Association (ADA), la European Association for the Study of Diabetes (EASD) y la International Diabetes Federation (IDF), aprobó la hemoglobina A1C (HbA1c) como criterio de diagnóstico de diabetes e inmediatamente después, la ADA, uno de los órganos más representativos a nivel mundial en la diabetología, la incorporó por primera vez como criterio de diagnóstico de la diabetes en la revisión de los “Estándares de Cuidado Médico en Diabetes”, correspondiente al año 2010; anteriormente, desde el consenso de 1997, el diagnóstico de esta enfermedad se fundamentaba en el valor de la glucemia en ayunas (mayor de 126 mg/dL, en dos ocasiones) o en la prueba de tolerancia a la glucosa, tras la ingesta de 75 gramos de glucosa, (mayor de 200 mg/dL, en dos ocasiones), o en el caso de presentar un valor superior a 200 mg/dL, en cualquier momento del día, y síntomas compatibles de diabetes (como poliuria, polidipsia o pérdida de peso), criterios que se habían consensuado con base en los resultados de estudios epidemiológicos, en los que se había observado un incremento en el desarrollo de retinopatía a largo plazo, como una de las primeras manifestaciones relacionadas con la enfermedad. ⁽⁴⁾

Según la definición de la National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III (ATP III), la diabetes mellitus está presente si tres o más de los siguientes cinco criterios se cumplen: la circunferencia de la cintura es mayor a 40 pulgadas (hombres) o 35

pulgadas(mujeres), presión arterial superior a 130/85 mmHg, triglicéridos en ayunas(TG) mayor a 150 mg/dL, lipoproteínas de alta densidad en ayunas (HDL), nivel de colesterol inferior a 40 mg/dL (hombres) o 50 mg/dL (mujeres) y glucosa en la sangre en ayunas de más de 100 mg/dL. Incorpora también las características clave de hiperglucemia/resistencia a la insulina, obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica e hipertensión. ⁽⁵⁾

La prueba de medición de HbA1c debe realizarse utilizando un método que esté certificado por el National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) y que esté estandarizado o sea rastreable, según el ensayo de referencia de la Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Este tipo de ensayos tienen varias ventajas en comparación con el ensayo de glucosa en plasma rápida y el de tolerancia a la glucosa oral, que incluyen mayor conveniencia (no se requiere ayuno), mayor estabilidad preanalítica y menos perturbaciones diarias como el estrés y enfermedades.

Los datos de la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) indican que un punto de corte de HbA1c de 6.5% (48 mmol / mol) identifica una prevalencia de diabetes no diagnosticada. A menos que haya un diagnóstico clínico claro, se requiere una segunda prueba para la confirmación. Se recomienda que se repita la misma prueba o que se realice una prueba diferente sin demora usando una nueva muestra de sangre para confirmación. Por ejemplo, si la A1C es de 7.0% (53 mmol / mol) y el resultado de repetición es de 6.8% (51 mmol / mol), se confirma el diagnóstico de DM. ⁽⁹⁾

2.3.- Hemoglobina glucosilada.

Desde el punto de vista químico, la glucosilación se define como la reacción de grupos aminos primarios de aminoácidos, péptidos y proteínas con el grupo carbonilo de los azúcares reductores. A lo largo de esta reacción se pueden distinguir tres etapas: inicialmente se produce la asociación del azúcar con la proteína, formando un compuesto denominado base de Schiff. ⁽¹⁰⁾

En condiciones fisiológicas la aparición de estos compuestos está determinada por la concentración de azúcares reductores y por el tiempo de exposición de la proteína a los mismos (vida media de la proteína). En proteínas de recambio rápido, el proceso de glucosilación no enzimática no supera, en general, las etapas iniciales (formación de la base de Schiff y eventualmente del producto de Amadori), mientras que las de vida media larga llegan a formar los productos de glucosilación avanzada. ⁽¹¹⁾ (Figura 2 y 4).

La glucosa es el azúcar reductor más abundante en el organismo. Su concentración en la sangre está sometida a un cuidadoso mecanismo de regulación en individuos sanos y, en personas que padecen DM, aumenta sustancialmente. Esto conlleva a que sea el azúcar

reductor generalmente considerado en las reacciones de glucosilación no enzimática de interés biológico. ⁽¹⁰⁾

La HbA1c se define como la glucosilación no enzimática irreversible en uno o ambos grupos NH₂-terminales de la cadena b. Las subfracciones de hemoglobina (Hb), formadas por la glicosilación de las cadenas a y b en la HbA, son colectivamente las glicohemoglobinas (GHb). La formación de HbA1c se produce durante la vida útil promedio de los eritrocitos (120 días) y la cantidad de HbA1c depende de la concentración de glucosa promedio durante este tiempo. La medición de HbA1c se expresa como porcentaje de Hb total. ⁽¹²⁾ (Figura 3 y 4).

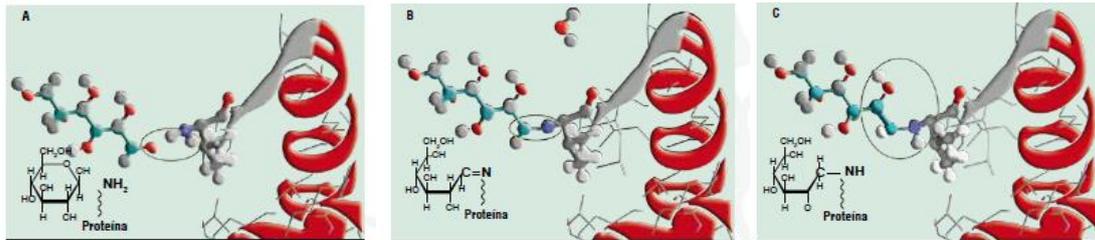


Figura 2. Proceso de reacción entre la cadena β de la hemoglobina y la glucosa. Cuando las moléculas de glucosa se ponen en contacto con el grupo amino libre en la cadena β de la hemoglobina (A), se produce una unión entre el aminoácido valina de la hemoglobina y la molécula de glucosa. (B) En la primera reacción reversible se forma una aldimina. Esta unión provoca un reajuste Amadori (C).

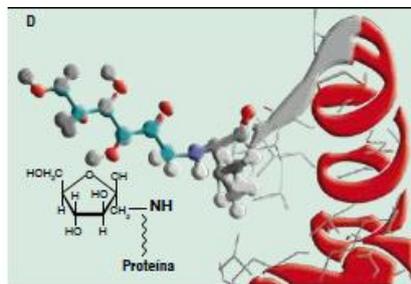


Figura 3. El reajuste Amadori genera de forma irreversible una cetamina (D), que permanecerá unida durante toda la vida del eritrocito.

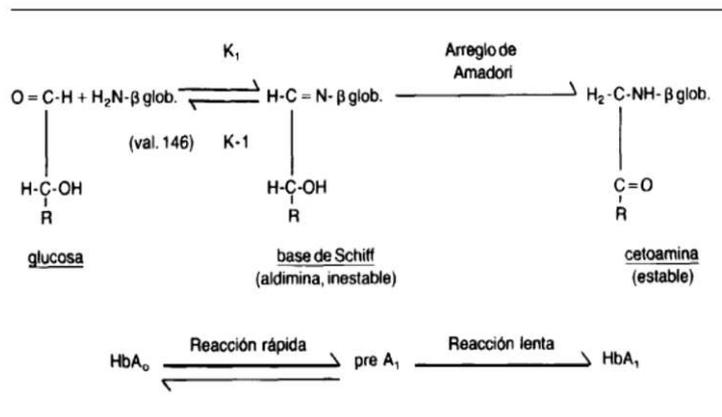


Figura 4. Reacción de glucosilación de las cadenas β de la Hemoglobina.

A pesar de los avances en la estandarización de los métodos para la determinación de GHb, un número creciente de hemoglobinopatías causan resultados falsos de HbA1. La Hb está conformada por cuatro cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo. La principal Hb que se encuentra en adultos sanos es la hemoglobina A (HbA), que consta de dos cadenas α , cada una con 141 aminoácidos y dos cadenas β , cada una con 146 aminoácidos. Al crearse, se expresan muy pocas cadenas β y la cadena predominante es la cadena γ , que forma dos cadenas α para formar la Hb fetal (HbF). Esta HbF migra o co-eluye con la HbA1c y puede causar elevaciones falsas en pacientes diabéticos adultos. Para uso clínico, se requiere una determinación de HbA cada 3 meses para determinar si el control metabólico de un paciente se ha mantenido continuamente dentro del rango objetivo. ⁽¹²⁾

2.4.- Métodos de cuantificación.

Los métodos utilizados para medir las glicohemoglobinas en la sangre aprovechan las diferencias entre las hemoglobinas glucosiladas y no glucosadas para cuantificarlas.

La cromatografía iónica y los métodos electroforéticos de separación trabajan de acuerdo a la diferencia de carga entre los diferentes tipos de hemoglobina, y la interacción cis-diol específica de sacáridos con el grupo ácido borónico es utilizado en cromatografía de afinidad. Los métodos inmunológicos están basados en anticuerpos que reaccionan con el extremo N glucosilado de la cadena β , en la que se encuentran los primeros 4 a 8 aminoácidos. Hasta la fecha, se comercializaron más de 20 kits diferentes para la determinación de HbA1c utilizando uno de los métodos mencionados anteriormente. Sin embargo, los niveles de HbA1c medidos difieren considerablemente. Esto puede explicarse por la diferente selectividad de los métodos analíticos y una multitud de posibles interferencias, como otras glicohemoglobinas, variantes

de hemoglobina, envejecimiento (HbA3), formas carboxiladas o acetiladas y reactividad cruzada de anticuerpos. ⁽¹³⁾

Al seleccionar un método de separación, la evaluación de los métodos disponibles se realiza a menudo con énfasis en la capacidad de separación, la practicidad y la rutina del laboratorio clínico; aplicabilidad y aspectos relacionados con el aseguramiento de la calidad. Sin embargo, estos elementos a veces son parámetros divergentes que no siempre se pueden combinar y optimizar en un solo método.

La siguiente es una breve descripción de las técnicas de separación utilizadas en el análisis de Hb, centrándose en la capacidad de separación, los beneficios y las limitaciones. ⁽¹⁴⁾

2.4.1.- Electroforesis capilar (EC).

La EC constituye una técnica de separación basada en la migración diferencial de moléculas (ADN, proteínas, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, fármacos, etc.) sujetas a un campo eléctrico (de 100 a 500 V/cm) a través de un capilar de menos de 50 μm de diámetro. El interior del capilar se encuentra formado por grupos silanol (Si-OH), los cuales al ser desprotonados (Si-O), elevan considerablemente el potencial de hidrógeno (pH) y favorecen la presencia de analitos específicos. Como en toda electroforesis, los cationes fluyen hacia la terminal negativa, mientras que los aniones fluyen hacia la positiva, pero la inducción del alto potencial eléctrico permite que: 1) la separación sea más sensible entre las diferentes moléculas (resolución) y 2) el tiempo de análisis sea más corto. Estas características hacen de la EC un método eficiente y económico con capacidad de separar cientos de componentes de forma simultánea, empleando mínimas cantidades de muestras y reactivos, razones suficientes para ser la herramienta de elección en el análisis bioquímico. ⁽¹⁵⁾

2.4.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC intercambio iónico.)

La Hb modificada en la terminal N de la cadena β , ya sea por glicación u otras modificaciones post-traducción, resulta en distintas diferencias de carga en comparación con la HbA0 sin modificaciones y la Hb modificada por la e-lisina modificada. La carga reducida de algunas formas modificadas de Hbs son la base fundamental para su separación. Usando intercambiadores de cationes a pH neutro se permite la separación de la variante glicosilada HbA1c de HbA0 y también una parcial separación de la terminal N glicada de la cadena α . ⁽¹³⁾

2.4.3.- Mini columnas.

La diferencia de carga entre HbA0 y la fracción glucosilada de HbA1 es la base del método clásico para la determinación rápida de HbA1a, HbA1b y HbA1c. Usando el intercambiador de cationes débiles Biorex 70 (Bio-Rad) pudieron separar HbA1c de HbA0 y también separarlo en parte de otras fracciones de HbA1. Las modificaciones de este método que se enfocan en la velocidad y la simplicidad han resultado en minicolumnas desechables con tasas de flujo más altas basadas en cationes débiles intercambiadores. Estas mini-columnas dedicadas a la separación y cuantificación de la fracción de HbA1 han estado disponibles durante varios años (Bio-Rad, Helena, Isolab). Aunque es de uso generalizado, porque la separación es fácil, rápida de realizar y no requiere equipo especializado, tiene varios inconvenientes. En los sistemas manuales, las variaciones en las condiciones del ensayo son difíciles de evitar e incluso pequeñas variaciones en la temperatura, el pH y la carga de la muestra afectan las características de elución de las columnas. ⁽¹³⁾

2.4.4.- Inmunoturbidimetría.

Los métodos inmunológicos utilizan anticuerpos contra una secuencia de aminoácidos que varían de 3 a 8 de la fracción N-terminal de la hemoglobina glicada. Tienen como ventaja el que son específicos contra la HbA1c y pueden ser incorporados a los autoanalizadores de química clínica ya sea por métodos de inmunoturbidimetría, o de inmunoanálisis enzimático, en donde se utiliza una proteasa para digerir la hemoglobina y producir fructosil-aminoácido que por la acción de una oxidasa produce peróxido de hidrógeno. ⁽⁴⁾

En la determinación por inmunoturbidimetría se cuantifican tanto la hemoglobina total como la HbA1c. Para la cuantificación de la hemoglobina total se hemoliza la muestra y la solución se somete a un amortiguador alcalino de un detergente no iónico, convirtiendo la hemoglobina en hematina y estabilizando la molécula. La hematina torna la solución de un color verde, que es cuantificado a una longitud de onda de 604 nanómetros (nm). Para la cuantificación de la HbA1c igualmente se debe hemolizar la muestra y se procede con dos pasos elementales: 1) la solución es incubada con micropartículas cubiertas con anticuerpos específicos dirigidos contra la HbA1c; en esta reacción se une un solo anticuerpo a cada sitio de glicación presente en la hemoglobina. 2) Una vez terminado este paso, se introduce en la solución un hapteno aglutinante que posee varios sitios inmunoreactivos, que unirá las micropartículas con anticuerpos que han quedado libres; en este paso se pueden unir varios anticuerpos a una

sola molécula de haptenos y darse el fenómeno de aglutinación. La determinación requiere de la cuantificación de la turbidez de la suspensión a una longitud de onda de 700 nm. En este sentido a mayor aglutinación, mayor cantidad de anticuerpos libres y menor concentración de HbA1c disponible para unir las micropartículas a los anticuerpos, lo anterior como consecuencia de que la HbA1c compite con el hapteno por la unión del anticuerpo. ⁽⁴⁾

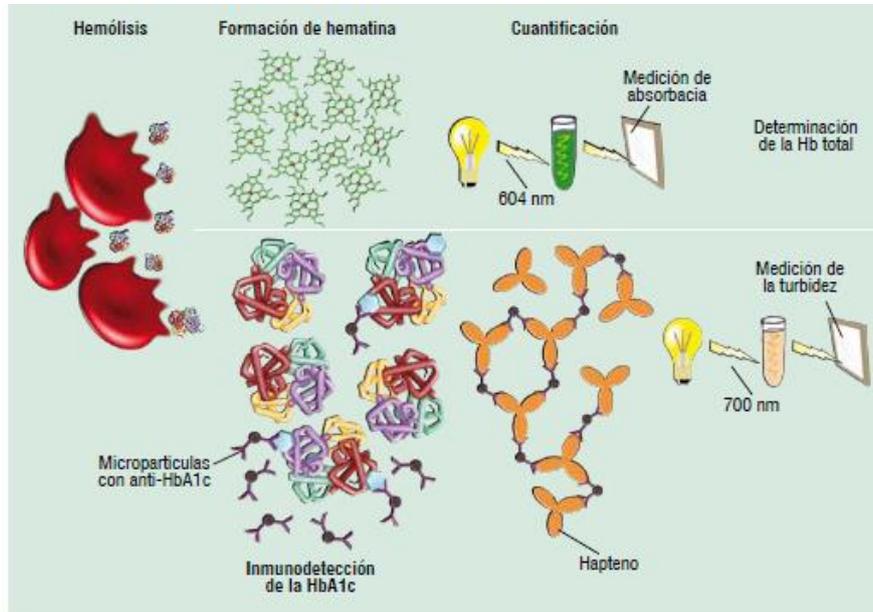


Figura 5. Proceso de unión de HbA1c con anticuerpos.

3.- Planteamiento del problema.

La determinación de HbA1c en el laboratorio clínico se ha establecido en los últimos años como parte de las pruebas utilizadas para realizar el diagnóstico de DM2, además diferentes asociaciones y guías de práctica clínica han incluido dicha prueba, sin embargo, debido a la falta de consenso en las metodologías para la determinación y la ausencia de una prueba estándar de oro, surge la necesidad de comparar y verificar técnicas que brinden resultados precisos y exactos a través de procesos controlados en el laboratorio clínico y que por consiguiente generen resultados a los pacientes y médicos, de la más alta calidad.

4.- Justificación.

La comparación de la técnica de inmunturbidimetría contra la electroforesis capilar para la determinación de HbA1c se llevará a cabo con el fin de evaluar el desempeño de dichas técnicas y posteriormente decidir cuál de las dos cubre en mayor medida las necesidades del laboratorio de control de calidad.

5.- Pregunta de investigación.

¿El analizador Sebia 2 Capillaryflex-piercing tiene un desempeño superior, con base en los criterios que establece la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico Entidad Mexicana de Acreditación (linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre), en comparación con el equipo Cobas C6000?

6.- Hipotesis.

El equipo Sebia 2 Capillaryflex-piercing tiene un desempeño superior, con base en los criterios que establece la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico (EMA) (linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre), en comparación con el equipo Cobas C6000.

7.- Objetivos.

7.1.- Objetivo general: Comparar el método de electroforesis capilar e inmunturbidimetría para la determinación de HbA1c.

7.2.-Objetivo particular: Comparar las técnicas de electroforesis capilar e inmunturbidimetría para la medición de HbA1c, con base a los criterios que establece la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.

8.- Material y métodos.

La comparación de métodos analíticos tiene como objetivo comprobar con evidencia documentada, que ambos métodos cumplen con los parámetros requeridos en la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico para la medición de HbA1c.

Roche/Hitachi Cobas 6000 y Sebia Capillarys 2 flex-piercing.

Se realizó la verificación y comparación del equipo Cobas 6000 y Sebia Capillarys 2 flex-piercing en la prueba para HbA1c, basándose en la Guía para la Validación y la Verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico, emitida por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) para evaluar la linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre. (Fig.6)

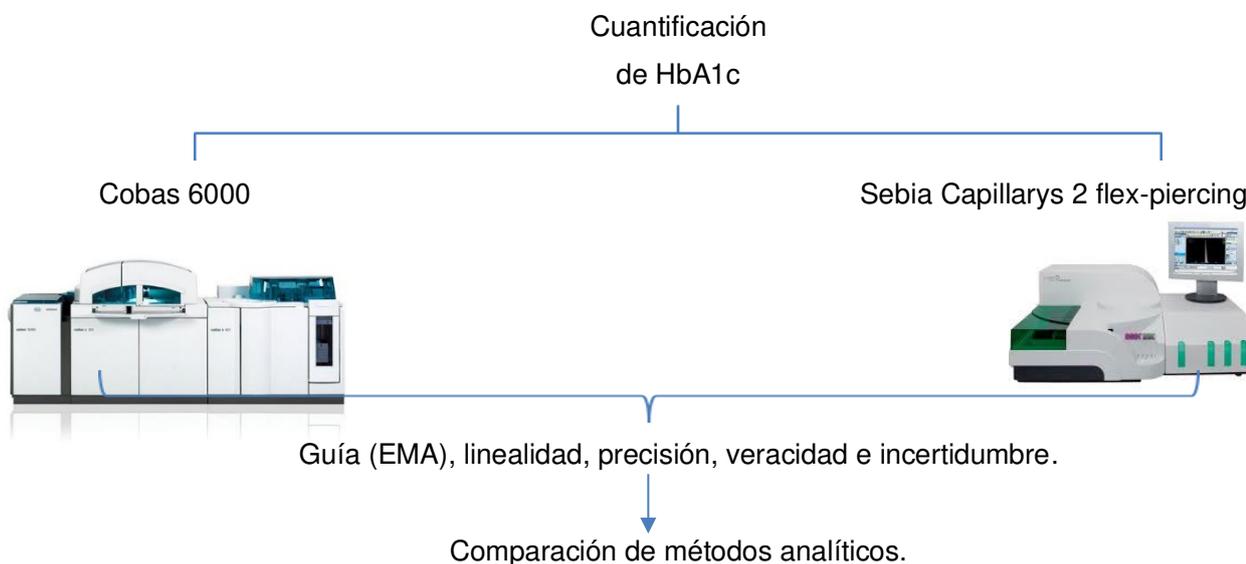


Figura 6. Esquema general de la comparación de los analizadores.

8.1.- Analizador Cobas 6000.

8.1.1.- Principio de la prueba.

El presente método emplea TTAB (bromuro de tetradeciltrimetilamonio) como detergente en el hemolizante para eliminar interferencias por leucocitos, ya que el TTAB no los lisa. La muestra no requiere ser pretratada para retirar la HbA1c lábil. Con el presente ensayo se miden todas las variantes de la hemoglobina glucosiladas en el término N de la cadena beta cuyas regiones reconocibles por anticuerpos sean idénticas a las de la HbA1c. De este modo,

la prueba puede emplearse para averiguar tanto el estado metabólico de pacientes con uremia como las hemoglobinopatías más frecuentes.

La determinación de HbA1c se basa en el inmunoensayo turbidimétrico de inhibición (TINIA) para sangre completa hemolizada. ⁽¹⁶⁾

8.1.2.- Componentes del analizador.

El analizador Cobas 6000 está compuesto de una serie de módulos analíticos con un sistema común de transporte de muestras. Esta plataforma tiene la capacidad de realizar validaciones técnicas y pruebas reflejo en tiempo real.

Los módulos que lo componen son:

- Unidad de carga de muestras Core CA 150: Es el módulo utilizado para recibir y transportar las muestras. Cuenta con un sistema continuo de carga por medio de racks Hitachi de 5 tubos. Posee una vía general, de entrada, a cada módulo y de retorno.
- Cobas e 601: Es un módulo de inmunoanálisis heterogéneo multicanal, realiza determinaciones inmunoquímicas selectivamente (hormonas, marcadores tumorales, perfil cardiaco y óseo, anemias, diabetes y serología infecciosa)

8.1.3.- Reactivos utilizados.

- Control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 1”, Lote: 25431, caducidad: 27/08/2016; constituido de suero de origen humano y animal, conservadores y estabilizadores.
- Control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 2”, Lote: 25432, caducidad: 27/08/2016; constituido de suero de origen humano y animal, conservadores y estabilizadores.
- Calibrador HbA1c nivel 1 Roche/Cobas liofilizado, Lote: 186261, caducidad: 05/2016.
- Calibrador HbA1c nivel 2 Roche/Cobas liofilizado, Lote: 186262, caducidad: 05/2016.
- Control HbA1c Sebia liofilizado 1, Lote: 16014/01, caducidad: 01/2017. Constituido de suero de origen humano y animal, conservadores y estabilizadores.
- Control HbA1c Sebia liofilizado 2, Lote: 16014/02, caducidad: 01/2017. Constituido de suero de origen humano y animal, conservadores y estabilizadores.
- Calibrador HbA1c nivel 1 Sebia liofilizado, Lote: 04093/01, caducidad: 06/2018.
- Calibrador HbA1c nivel 2 Sebia liofilizado, Lote: 05093/01, caducidad: 06/2018.
- Agua inyectable PLASTI-ESTERIL, Lote: 03CD21, caducidad: 02/2019

- R1 Reactivo de anticuerpo. Amortiguador MES: 0.025 mol/L; Amortiguador TRIS: 0.015 mol/L, pH 6.2; anticuerpo anti-HbA1c (suero ovino) \geq 0.5 mg/mL; detergente, estabilizadores, conservadores.
- R2 Reactivo de polihaptenos. Amortiguador MES: 0.025 mol/L; Amortiguador TRIS: 0.015 mol/L, pH 6.2; polihapteno HbA1c: \geq 8 μ g/mL; estabilizadores, detergente, conservantes.

8.2.-Analizador Sebia2 Capillary-flex piercing.

8.2.1.- Principio de la prueba.

El analizador Sebia 2 Capillary-flex piercing utiliza el principio de electroforesis capilar en solución libre. Con esta técnica las moléculas cargadas eléctricamente son separadas de acuerdo a su movilidad electroforética en un amortiguador alcalino con un pH específico. La separación también ocurre dependiendo del electrolito, el pH y el flujo electro osmótico.

El analizador Sebia 2 Capillary-flex piercing posee capilares que funcionan en paralelo, lo que permite 8 análisis simultáneos para la cuantificación de la hemoglobina en la muestra de sangre completa. Se prepara una dilución de muestra con solución hemolizante y se inyecta por aspiración en el extremo anódico del capilar. Luego se realiza la separación de proteínas con ayuda de una descarga de alto voltaje y se lleva a cabo la detección directa de las hemoglobinas en el extremo catódico del capilar.

Antes de cada corrida, los capilares se lavan con una solución de lavado y se preparan para el próximo análisis con tampón. Las hemoglobinas, separadas en capilares de sílice, se detectan directa y específicamente a una longitud de onda de absorbancia de 415 nm que es específica para hemoglobinas.

La detección directa proporciona una cuantificación relativa precisa de la fracción de hemoglobina individual, con particular interés, como la HbA1c. Además, la alta resolución de este procedimiento debería permitir la identificación de variantes de hemoglobina, en particular, para diferenciar las hemoglobinas S de D y E de C.

Al usar un tampón de pH alcalino, se detectan hemoglobinas normales y anormales (o variantes) en el siguiente orden, de cátodo a ánodo: δ A'2 (A2 variante), C, A2 / O-Arab, E, S, D, G-Philadelphia, F, A, Hope, Bart's, J, N-Baltimore y H. ⁽¹⁷⁾

8.2.2.- Componentes del analizador.

El analizador Sebia 2 Capillary-flex piercing está conformado por diversos componentes en los que se lleva a cabo la cuantificación de la HbA1c, dichos componentes se encuentran alojados dentro de un solo módulo. Los componentes son los siguientes:

- Sistema de transporte de muestras: Consiste en un riel por el que circula una gradilla con capacidad para cinco tubos. Está encargado de distribuir las muestras a través del analizador.
- Lector de código de barras: Identifica por medio de códigos de barras los tubos que contienen las muestras.
- Jeringa/inyector: Consiste en una jeringa que realiza la toma de muestra, diluciones y enjuagues que el análisis requiere.
- Capilares: Tubos capilares rellenos de amortiguador en los que se lleva a cabo la separación electroforética de las proteínas.
- Detector: Es el componente en el que se lleva a cabo la detección, por medio de una longitud de onda determinada.

9.- Desarrollo experimental.

9.1.- Linealidad (intervalo analítico).

Se preparó una solución estándar reconstituyendo el contenido de tres viales del calibrador de concentración alta (11%) y tres viales del calibrador de concentración baja (0 %) (1 ml de agua inyectable para reconstituir cada vial). Posteriormente se prepararon 5 diluciones con diferente nivel de concentración, los cuales se describen en la siguiente tabla:

Número de dilución	Proporción en volumen de calibrador 1 (bajo)	Proporción en volumen del calibrador 2 (alto)	Concentración en % del calibrador 2
1	700 µL	0 µL	0 %
2	525 µL	175 µL	25%
3	350 µL	350 µL	50 %
4	175 µL	525 µL	75 %
5	0 µL	700 µL	100 %

Tabla 1. Preparación de las diluciones.

La tabla 1 expone las proporciones del calibrador 2 utilizadas para evaluar la linealidad de los métodos analíticos.

9.2.- Precisión.

Se prepararon tres viales de control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 2” y tres viales de Control HbA1c Sebia liofilizado 2.

Los viales de los controles se conservaron a -22° C por lo que fue necesario atemperar por 30 minutos previo a su uso.

Se cuantificó la concentración 20 veces del control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 2” y 20 veces del Control HbA1c Sebia liofilizado 2. Con los resultados obtenidos se calculó la media, la desviación estándar, y el coeficiente de variación para cada uno de los métodos.

9.3.- Veracidad.

Se determinó la veracidad de los métodos analíticos utilizando el cálculo de % de recuperación. Para ello se realizó la medición del calibrador 2 para cada equipo con una concentración conocida; se realizaron veinte lecturas del calibrador (95 µL por muestra) para cada método y se calculó la media aritmética, desviación estándar y el coeficiente de variación. Aplicando la siguiente fórmula se obtuvo el porcentaje de recuperación:

$$\% \text{ de recuperación} = \sqrt{\frac{\text{valor de la medición}}{\text{valor real}}} (100)$$

9.4.- Incertidumbre.

La incertidumbre se evaluó con los datos del sesgo mensual del control de calidad interno para Hba1c; así como la desviación estándar de resultados del control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control” y Control HbA1c Sebia liofilizado con 30 muestras.

Con los datos recabados del control de calidad interno se determinó el Error del Cuadrado Medio (ECM) aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{ECM} = \sqrt{b^2 + s^2}$$

Dónde:

b: Promedio del sesgo mensual de los últimos 6 meses.

s: Desviación estándar de resultados del control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 2” o Control HbA1c Sebia liofilizado 2, en las 30 muestras.

El criterio de aceptación de esta prueba se basa en el error total aceptable y el sesgo aceptable según la especificación para el control de calidad interno del laboratorio.

10.- Resultados y análisis de resultados.

10.1.- Prueba de Linealidad del analizador Cobas 6000

NÚMERO DE DILUCIÓN.	RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE HbA1c (%)			MEDIA (%)	CONCENTRACIÓN DEL CALIBRADOR 2 (%)
	1	2	3		
	1	0	0		
2	2.8	2.7	2.7	2.6	25
3	5.5	5.4	5.5	5.5	50
4	8.3	8.3	8.2	8.2	75
5	10.9	11.1	11.1	11.0	100

Tabla 2. Resultados de concentración de las diluciones y media de las repeticiones en el equipo Cobas 6000.

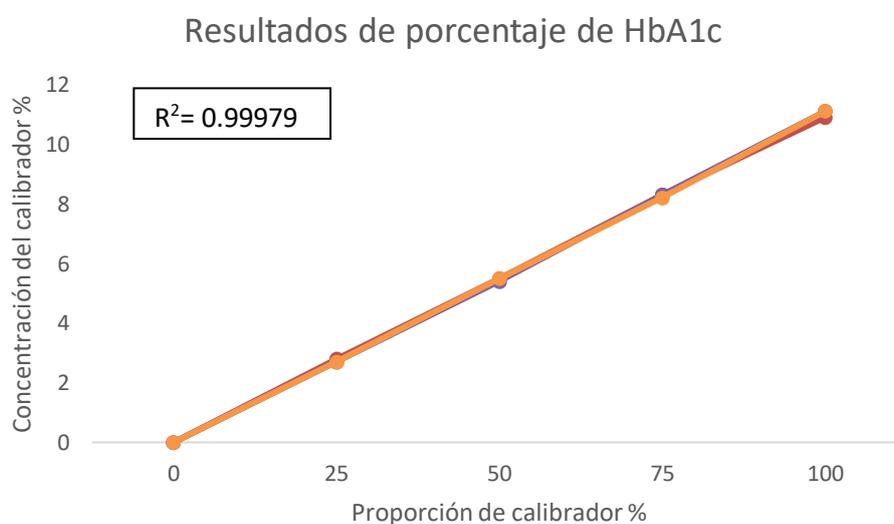


Figura 7. Gráfico de linealidad, concentración en % del Calibrador HbA1c nivel 2 Roche/Cobas liofilizado, comparado con el promedio de las mediciones de la concentración de HbA1c.

En la figura 7 se observa que el promedio de las mediciones de las diluciones y el porcentaje de calibrador 2 tienen un $R^2= 0.99979$, mayor a 0.99, determinando así que siguen una función lineal, por lo tanto, el método cumple con las especificaciones.

10.2.- Prueba de Linealidad del analizador Sebia Capillarys 2 flex-piercing.

NÚMERO DE DILUCIÓN.	RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE HbA1c (%)			MEDIA (%)	CONCENTRACIÓN DEL CALIBRADOR 2 (%)
	1	2	3		
1	0	0	0	0	0
2	2.8	2.8	2.7	2.8	25
3	5.5	5.5	5.5	5.5	50
4	8.3	8.3	8.3	8.3	75
5	11.0	11.1	11.0	11.0	100

Tabla 3. Resultados de concentración de las diluciones y media de las repeticiones en el equipo.

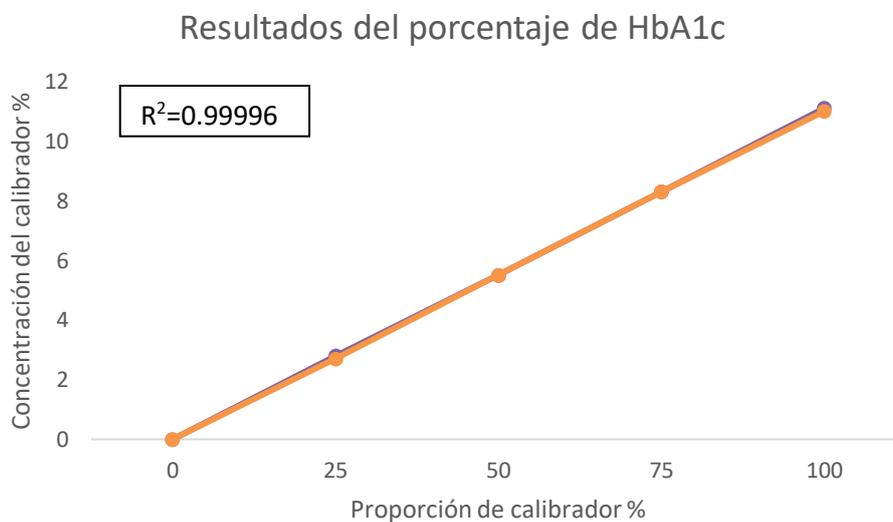


Figura 8. Gráfico de linealidad, concentración en % del Calibrador HbA1c nivel 2 Sebia liofilizado comparado con el promedio de las mediciones de la concentración de HbA1c.

En la figura 8 se observa que el promedio de las mediciones de las diluciones y el porcentaje de calibrador 2 tienen un $R^2= 0.99996$, mayor a 0.99, determinando así que siguen una función lineal, por lo tanto, el método cumple con las especificaciones.

10.3.- Prueba de Precisión de analizador Cobas 6000.

Repetición	Concentración (%)	Repetición	Concentración (%)		
1	11.1	11	11.2		
2	11.2	12	11.1		
3	11.1	13	11.3		
4	11.2	14	11.1		
5	11.2	15	11.1		
6	11.1	16	11.1		
7	11.3	17	11.1	Media (%)	11.17
8	11.2	18	11.1	D.E.	0.07
9	11.3	19	11.2	CV	0.01
10	11.2	20	11.2	CV%	1.0

Tabla 4. Resultados de la medición del Control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 2”.

De acuerdo a los criterios de aceptación para la prueba de HbA1c, el CV debe ser igual o menor a 1.5% (información proporcionada por el fabricante, contenida en el inserto correspondiente a la prueba para determinar HbA1C en el analizador Cobas 6000). El método cumple con la especificación requerida por el fabricante.

10.4.- Resultados de la prueba de precisión para Sebia Capillarys 2 flex-piercing.

Repetición	Concentración (%)	Repetición	Concentración (%)		
1	11.3	11	11.1		
2	11.2	12	11.2		
3	11.1	13	11.2		
4	11.1	14	11.3		
5	11.3	15	11.1		
6	11.1	16	11.2		
7	11.2	17	11.2	Media (%)	11.14
8	11.0	18	11.2	D.E.	0.05
9	11.1	19	11.1	CV	0.00
10	11.2	20	11.1	CV%	0.4

Tabla 5. Resultados de la medición del Control HbA1c Sebia liofilizado 2, vial 1.

De acuerdo con los criterios de aceptación para la prueba de HbA1c, el CV debe ser igual o menor a 1.5% (información proporcionada por el fabricante, contenida en el inserto correspondiente a la prueba para determinar HbA1C en el analizador Sebia Capillarys 2 flex-piercing). El método cumple con la especificación requerida por el fabricante.

10.5.- Prueba de Veracidad para el analizador Sebia Capillarys 2 flex-piercing.

No.de lectura.	Concentración (%)	No.de lecturas.	Concentración (%)	No.de lecturas.	Concentración (%)
1	11.2	9	11.1	17	11.1
2	11.2	10	11.2	18	11.2
3	11.1	11	11.1	19	11.1
4	11.2	12	11.2	20	11.2
5	11.1	13	11.1	Media	11.15
6	11.1	14	11.2	DE	0.05
7	11.2	15	11.1	CV	0.00
8	11.1	16	11.2	CV%	0.5

Tabla 6. Serial de mediciones del Calibrador HbA1c nivel 2 Sebia liofilizado con concentración 11%.

$$\% \text{ de recuperación} = 11.15\% / 11.0\% (100) = 101.4\%$$

El fabricante establece que el porcentaje de recuperación se debe encontrar entre 98% y 102%. El porcentaje de recuperación obtenido en esta prueba se encuentra dentro de este rango, por lo tanto, el método cumple con la especificación del fabricante.

10.6.- Prueba de Veracidad para el analizador Cobas 6000.

No.de lecturas.	Concentración (%)	No.de lecturas.	Concentración (%)	No.de lecturas.	Concentración (%)
1	11.3	9	11.1	17	11.1
2	11.2	10	11.2	18	11.2
3	11.2	11	11.3	19	11.2
4	11.2	12	11.2	20	11.1
5	11.0	13	11.1	MEDIA	11.17
6	11.3	14	11.2	DE	0.08
7	11.1	15	11.1	CV	0.01
8	11.1	16	11.2	CV%	0.7

Tabla 7. Serial de mediciones del Calibrador HbA1c nivel 2 Roche/Cobas liofilizado con concentración 11%.

$$\% \text{ de recuperación} = 11.17\% / 11.0\% (100) = 101.5\%$$

El fabricante establece que el porcentaje de recuperación se debe encontrar entre 98% y 102%. El porcentaje de recuperación obtenido en esta prueba se encuentra dentro de este rango, por lo tanto, el método cumple con la especificación del fabricante.

10.7.- Prueba de incertidumbre para el analizador Cobas 6000.

Mes	Sesgo	Mes	Sesgo
Mayo	1.2	Agosto	1.2
Junio	1.2	Septiembre	1.3
Julio	1.1	Octubre	1.2
Media sesgo= 1.2			

Tabla 8. Sesgo mensual de las mediciones del control BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 2”, correspondiente a los últimos 6 meses, obtenido por el laboratorio de control de calidad interno.

Resultados obtenidos en el mes de octubre para BIO-RAD “Lyphocheck Assayed Chemistry Control 2”.

Lectura	(%)	Lectura	(%)	Lectura	(%)	Lectura	(%)	Lectura	(%)
1	11.3	8	11.3	15	11.1	22	11.2	29	11.3
2	11.2	9	11.2	16	11.1	23	11	30	11.2
3	11.2	10	11.2	17	11.3	24	11.1	31	11.2
4	11.1	11	11.3	18	11.1	25	11.2	DESV. ESTD. 0.09	
5	11.1	12	11.3	19	11.3	26	11.2		
6	11.3	13	11.2	20	11.1	27	11		
7	11.1	14	11.3	21	11.2	28	11.1		

Tabla 9. Resultados del mes de octubre en equipo Cobas 6000.

Media del sesgo= 1.2

DE del mes de octubre= 0.09

$$ECM = \sqrt{1.2^2 + 0.09^2} = 1.2$$

El ECM (1.2) obtenido corresponde a la incertidumbre del método para cuantificar HbA1c. El error total aceptable es de 2.0 y el sesgo aceptable 1.5; ambos datos son proporcionados por el control de calidad interno del laboratorio. El valor de la incertidumbre se encuentra dentro de los parámetros del valor del error aceptable y valor de sesgo aceptable.

10.8.- Prueba de incertidumbre para el analizador Sebia 2 Capillary-flex piercing.

Mes	Sesgo	Mes	Sesgo	
Mayo	0.8	Agosto	0.9	
Junio	0.8	Septiembre	0.8	
Julio	0.9	Octubre	0.8	MEDIA SESGO= 0.8

Tabla 10. Sesgo mensual de las mediciones del Control HbA1c Sebia liofilizado 2, correspondiente a los últimos 6 meses, obtenido por el laboratorio de control de calidad interno.

Resultados obtenidos en el mes de octubre para Control HbA1c Sebia liofilizado 2.

Lectura	(%)	Lectura	(%)	Lectura	(%)	Lectura	(%)	Lectura	(%)
1	11.1	8	11	15	11	22	11.1	29	11.1
2	11	9	11.2	16	11.1	23	11.2	30	11.1
3	11.1	10	11.2	17	11.1	24	11	31	11.2
4	11	11	11.1	18	11	25	11	DESV. EST. 0.08	
5	11.2	12	11.1	19	11.2	26	11.2		
6	11.1	13	11	20	11.2	27	11.2		
7	11.1	14	11	21	11	28	11.1		

Tabla 11. Resultados del mes de octubre en equipo Sebia Capillarys 2 flex-piercing.

Media del sesgo= 0.8

DE del mes de octubre= 0.08

$$ECM = \sqrt{0.8^2 + 0.08^2} = 0.81$$

El ECM (0.81) obtenido corresponde a la incertidumbre del método para cuantificar HbA1c. El error total aceptable es de 2.0 y el sesgo aceptable 1.5; ambos datos son proporcionados por el control de calidad interno del laboratorio. El valor de la incertidumbre se encuentra dentro de los parámetros del valor del error aceptable y valor de sesgo aceptable.

11.- Conclusión.

La prueba de HbA1c juega un papel muy importante en el diagnóstico de la diabetes mellitus (DM), permitiendo dar un seguimiento y tratamiento oportuno a pacientes con este padecimiento.

Actualmente, el laboratorio Central del Instituto Nacional de Cardiología lleva a cabo la medición de hemoglobina glucosilada; debido a que existe la necesidad de contar con analizadores que provean de resultados oportunos y confiables, cumpliendo con los parámetros que establece la EMA en la Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.

Se realizó la comparación de los dos analizadores basándose en las pruebas que establece la guía mencionada anteriormente (linealidad, precisión, veracidad e incertidumbre); los

resultados que se obtuvieron durante esta comparación indican que el analizador Sebia 2 Capillaryflex piercing y el Cobas 6000 cumplen con los requisitos que indica la guía, sin embargo se puede concluir que el analizador Sebia tiene un desempeño superior al del Cobas 6000 ya que los resultados de las pruebas de verificación se encontraban más alejados de los límites establecidos, por lo cual se podría tomar la decisión de llevar a cabo los análisis de rutina únicamente con el analizador Sebia 2 Capillaryflex piercing. Debido a la creciente necesidad de entregar resultados precisos y exactos, el presente trabajo demuestra que migrar a tecnología más reciente, como la electroforesis capilar, esta nos permite proporcionar resultados adecuados que favorecen a un diagnóstico oportuno y certero; si bien el método utilizado por el equipo Cobas, cumple con los requisitos mínimos de la guía, el cambio de un equipo en cualquier laboratorio debe contemplar un plan de implementación que considere la parte analítica que aquí se describe además de la parte operacional y costos. Una limitante del presente es que solo se evalúa la parte analítica y se deja de lado el impacto y tiempo de adaptación de un nuevo equipo. El presente representa una evaluación objetiva que nos permite asegurar que no hay inferioridad del equipo Sebia 2 Capillaryflex piercing con respecto al Cobas 6000, por lo cual es viable el determinar la hemoglobina glicosilada con esta nueva metodología.

12.- Referencias bibliográficas.

- 1.- María Teresa Carrera Font, María Claustre Solé Brichs, María Clara Sala Álvarez, José María Navarro Olivella, Josefina Servent Turó y María Pilar Felipe Fernández. Estudio de la determinación de la hemoglobina glucosilada en pacientes con diabetes mellitus 2 en sangre capilar en un centro de atención primaria. *Aten Primaria*. 2011;43(10):536--543
- 2.- L. Guariguata, D.R. Whiting, I. Hambleton, J. Beagley, U. Linnenkamp, J.E. Shaw. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035, *Diabetes research and clinical practice* 103 (2014) 137–149.
- 3.- María Isabel Múnera-Jaramillo, Mary Alejandra Restrepo-Lozada, Lina María Gómez-Bahamón, Doris del Rosario Mesa-Suarez, Blanca Susana Ramirez-Puerta. Glycosylated hemoglobin A1c compared to fasting plasma glucose in outpatients referred to a medical laboratory. *Rev. salud pública*. 13 (6): 980-989, 2011.
- 4.- Germán Campuzano-Maya, Guillermo Latorre-Sierra. La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes. *Medicina & Laboratorio*, Volumen 16, Números 5-6, 2010.
- 5.- Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *DIABETES CARE*, VOLUME 33, SUPPLEMENT 1, JANUARY 2010. American Diabetes Association.
- 6.- Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Publica Mex* 2013;55 supl. 2: S129-S136.

- 7.- Gutierrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernandez S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martinez M, Hernandez-Avila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutricion 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, Mexico: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
- 8.- Rosalba Rojas-Martínez, PhD, Ana Basto-Abreu, MSc, Carlos A Aguilar-Salinas, PhD, Emiliano Zárate-Rojas, Mr, Salvador Villalpando, PhD, Tonatiuh Barrientos-Gutiérrez, PhD. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. Salud Pública de México, vol. 60, 2018, pp. 1-9 Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México.
- 9.- Classification and Diagnosis of Diabetes:Standards of MedicalCare in Diabetes-2018. Diabetes Care, Volume 41, Supplement 1, January 2018. American Diabetes Association.
- 10.- Dra. Liudmila Aponte Ramírez; Dr. Roger Ramírez Zayas; Dra. Silvia Hernández González; Dr. Dariel Somontes Zamora. Los procesos de glucosilación no enzimática. Revista Archivo Médico de Camagüey v.13 n.6 Camagüey nov.-dic. 2009.
- 11.-F. Luis González Flecha, Pablo R. Castello, Juan J. Gagliardino y Juan Pablo F.C. Rossi. La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. Ciencia al Día Internacional © junio 2000, Vol. 3, No. 2. ISSN 0717-3849.
- 12.- Wolfgang J. Schnedl, Andrea Liebminger, Regina E. Roller, Rainer W. Lipp, Guenter J. Krejs. Hemoglobin variants and determination of glycated hemoglobin (HbA1c). DIABETES/METABOLISM RESEARCH AND REVIEWS Diabetes Metab Res Rev2001;17: 94–98.
- 13.- Dušan Koval, Vaclav Kašic̣ka , Herve Cottet. Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing. Analytical Biochemistry 413 (2011) 8–15.
- 14.- Frank Frantzen. Chromatographic and electrophoretic methods for modified hemoglobins. Journal of Chromatography B, 699 (1997) 269-286.
- 15.- Jonathan J Magaña, María de la Luz Arenas Sordo, Rocío Gómez. La electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. Rev Méd Chile 2009; 137: 946-956.
- 16.- Tina-quant Hemoglobin A1c Gen.3 — Hemolysate and Whole Blood Application. Sistemas Cobas c. 2011-09, V 3 Español. Inserto del fabricante.
- 17.- Capillarys hemoglobin(e) using the capillarys 2 flex-piercing instrument. Sistema Sebia. Inserto del fabricante.