

# Beneficios de la metodología HPLC en la determinación de A1c estable, y tamizaje de variantes de hemoglobinas



**Dr. Joaquín Marchena A.**  
**Especialista en Hematología**  
**Costa Rica**



No tengas miedo de aprender...  
**El conocimiento no pesa**

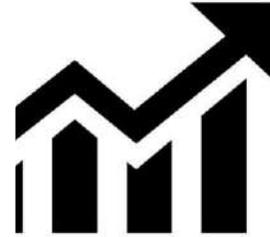
Es un TESORO que puedes llevar a todos lados.

# Hoy hablaremos

- Estadísticas
- Diabetes
- La prueba de A1c
- Hemoglobinopatías
- Entender la tecnología HPLC – visualizar el principio del sistema y su excelente calidad
- El poder del CROMATOGRAMA
- Experiencia en Área de Salud de Alajuelita, CCSS



# Diabetes: Solo algunos hechos

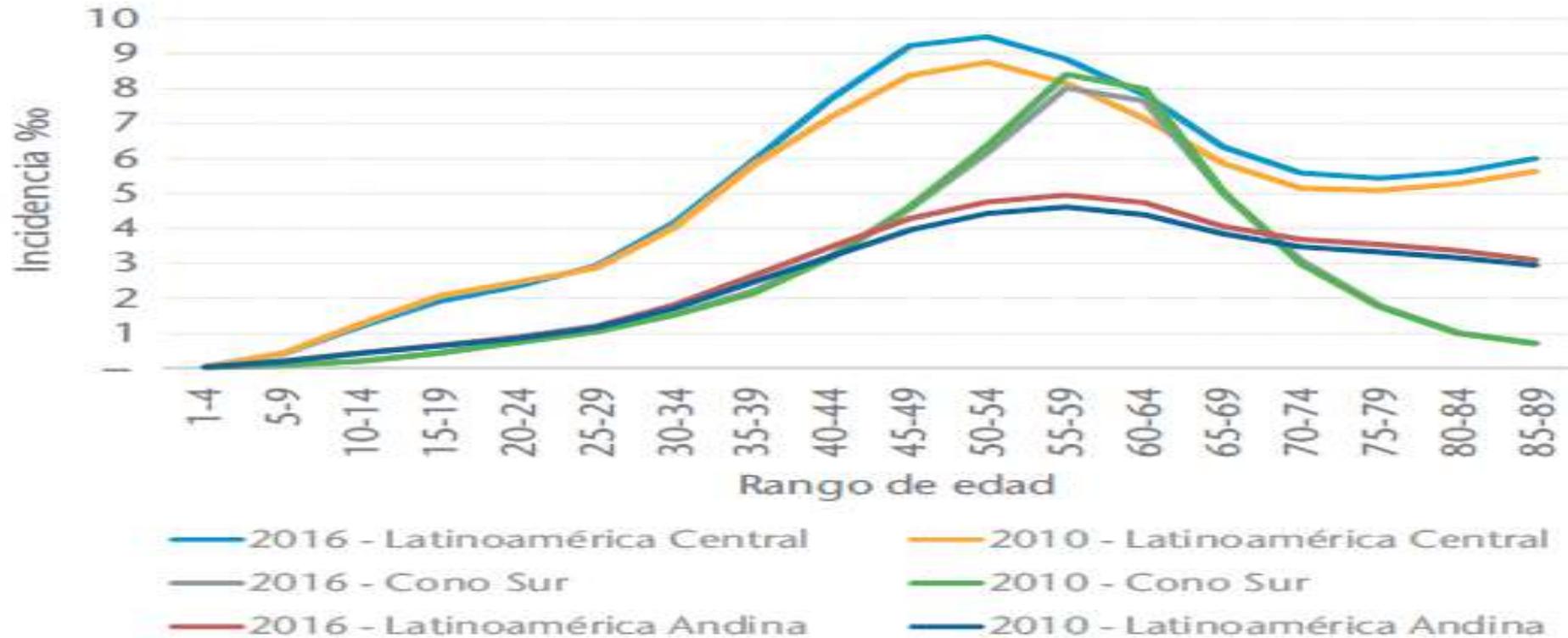


**DIAGNOSTICADOS: 26 millones**  
**NO DIAGNOSTICADOS: 14.9 millones**  
**PROYECTADO (2045): 64 millones**





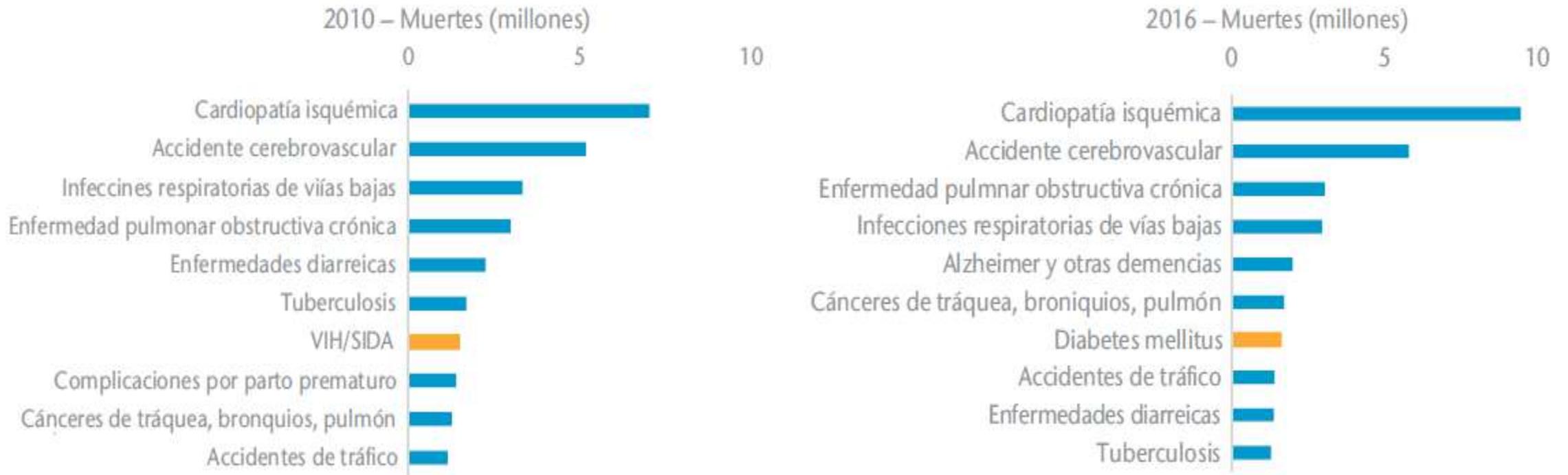
# Incidencia de diabetes por regiones en Latinoamérica



Fuente: Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). Global Burden of Disease Study 2016, Incidence, University of Washington, Seattle 2017.



# Las 10 causas de muerte más frecuentes, 2010 y 2016

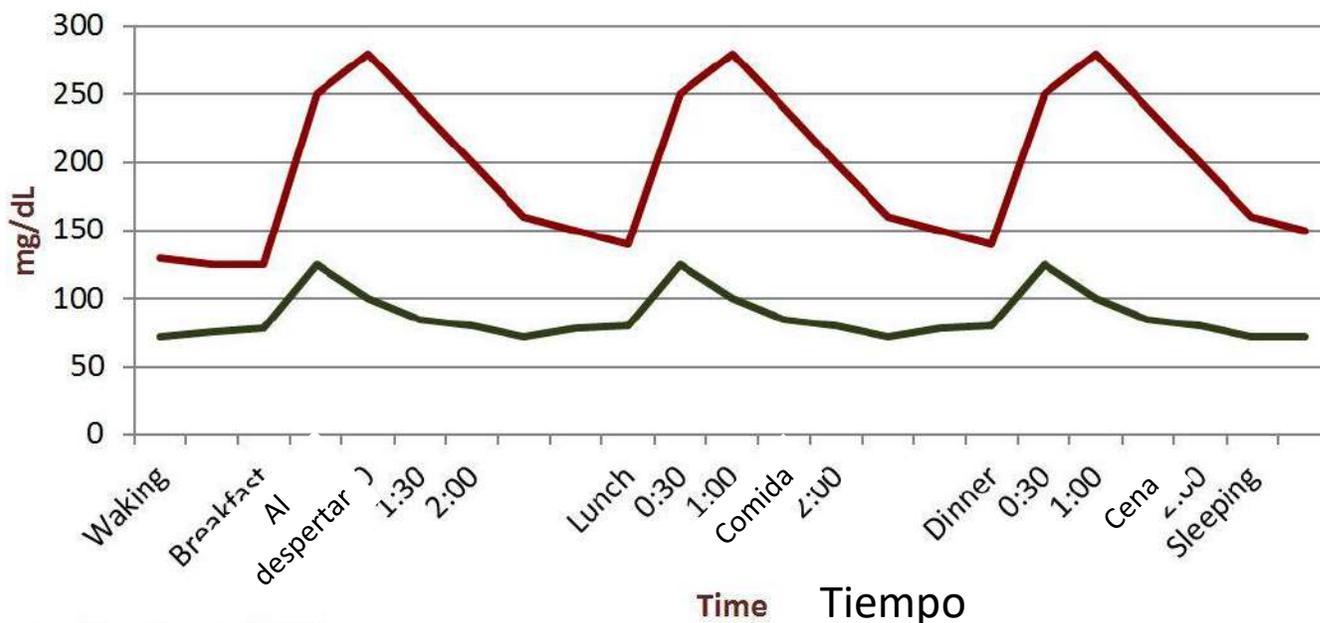


Fuente: Global Health Estimates 2016: Deaths by cause, age, gender; by country and by region, 2000-2016. Ginebra, Organización Mundial de la Salud, Ginebra 2018.

# ¿Qué es la diabetes?

Destrucción del sistema que mantiene en equilibrio los niveles de glucosa en la sangre.

Niveles de glucosa **Diabético vs No diabético**



Hiperglicemia continua

La insulina no tiene efecto y en consecuencia no hay un control adecuado de los niveles de glucosa en la sangre.

— Diabetic Diabético  
— Optimal Óptimo

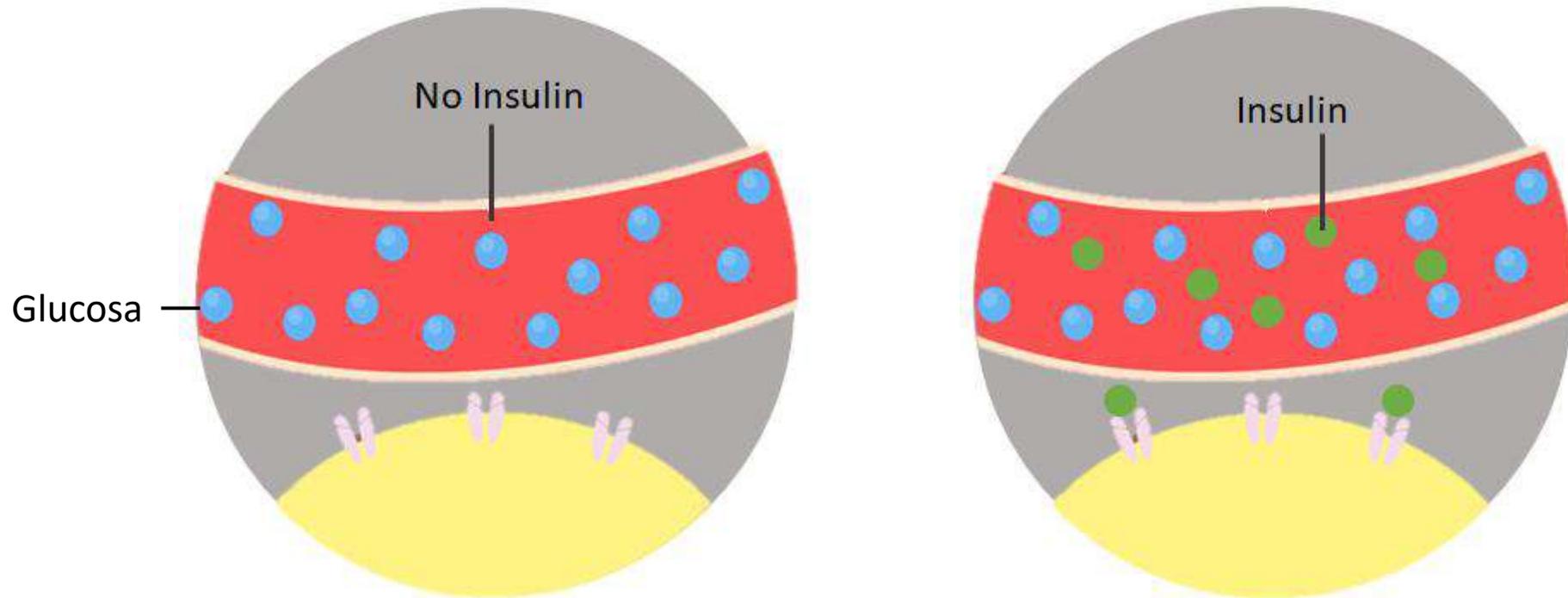
# Tipos de Diabetes

“Una enfermedad de inanición en medio de la abundancia”

	CAUSA	FACTORES DE RIESGO	TRATAMIENTO	PREVALENCIA *
TIPO I	<p><b>Principales tipos de diabetes</b></p>  <p><b>DIABETES DE TIPO 1</b> El cuerpo no produce suficiente insulina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Historia Familiar.</li> <li>Se puede desarrollar a cualquier edad.</li> <li>No se conoce una forma de prevenirla.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inyecciones diarias de insulina.</li> <li>Dieta y ejercicio.</li> </ul>	<p>10%</p>
	 <p><b>DIABETES DE TIPO 2</b> El cuerpo produce insulina pero no la utiliza apropiadamente</p>			
TIPO II	 <p><b>DIABETES GESTACIONAL</b> Una condición temporal durante el embarazo</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sobrepeso/estilo de vida inactiva.</li> <li>La mayoría de los casos pueden ser prevenidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Dieta y ejercicio.</b></li> <li>Medicación (metformina etc).</li> <li>Inyecciones de insulina.</li> </ul>	<p>90%</p>

\*en diabeticos

# Diabetes Tipo I vs. Tipo II



**Diabetes tipo I**

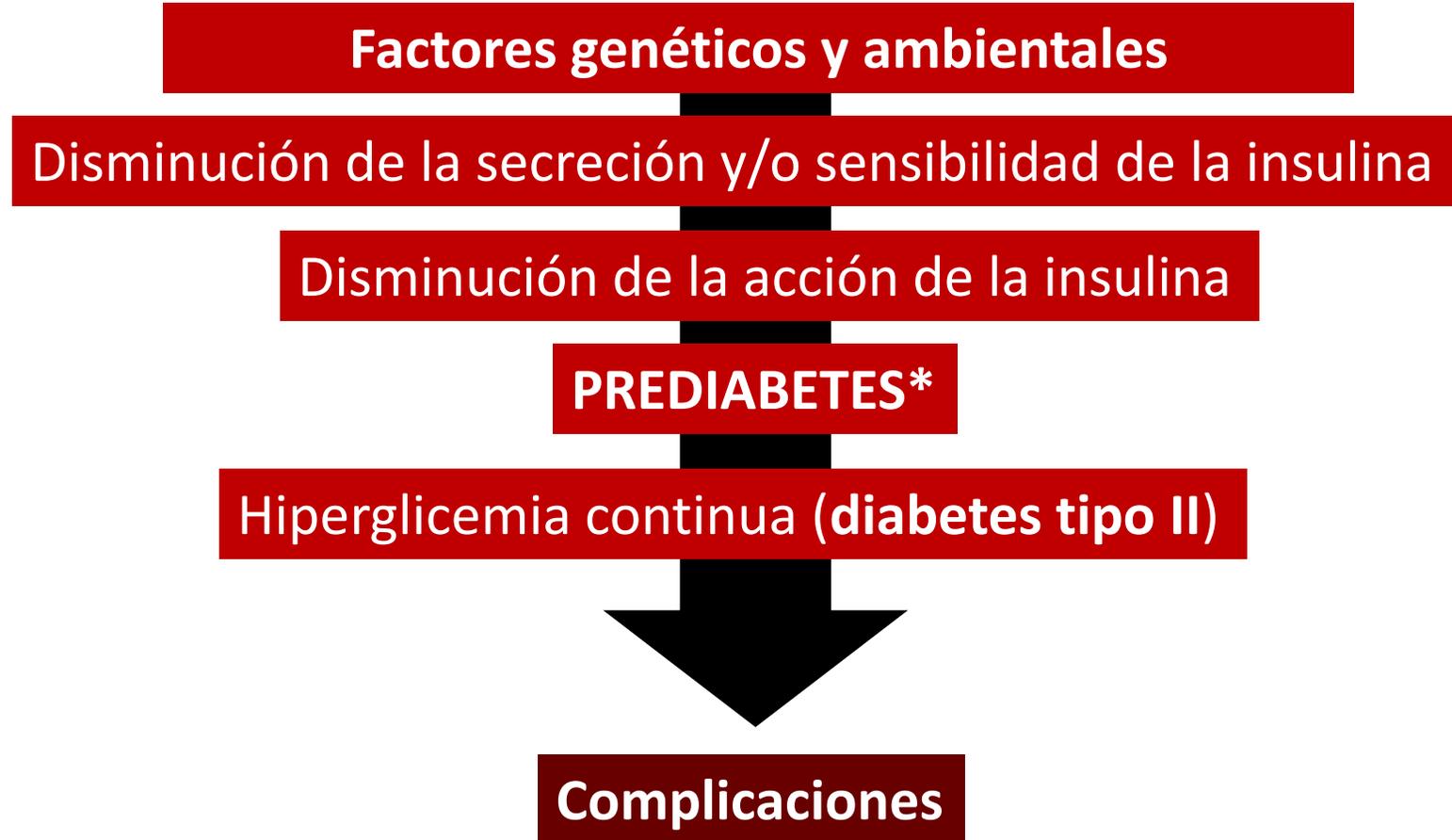
No hay señal

**Diabetes tipo II**

No hay respuesta

**Las células no absorben glucosa**

# Causas multi-factoriales conducen a complicaciones

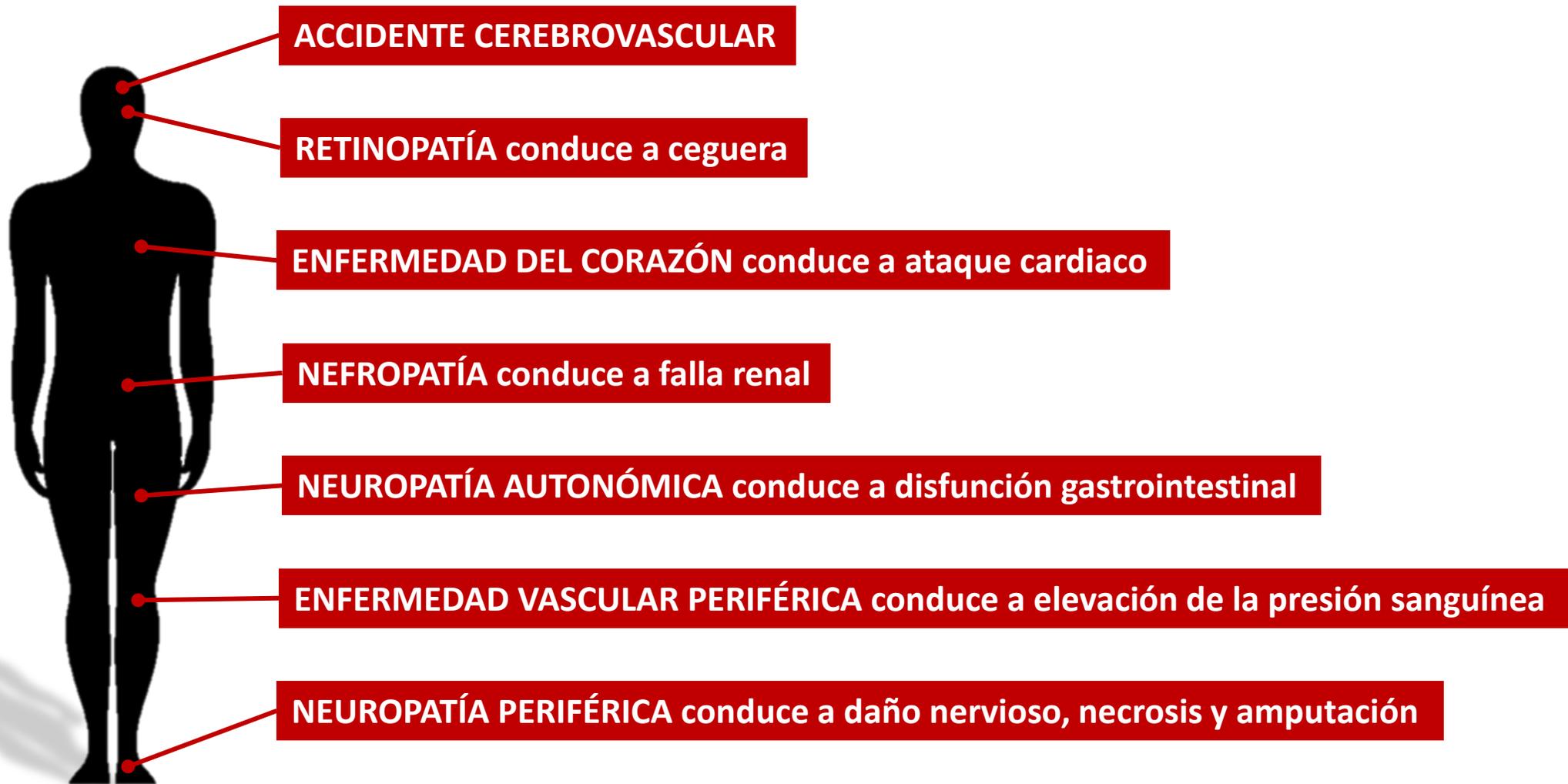


# Prediabetes



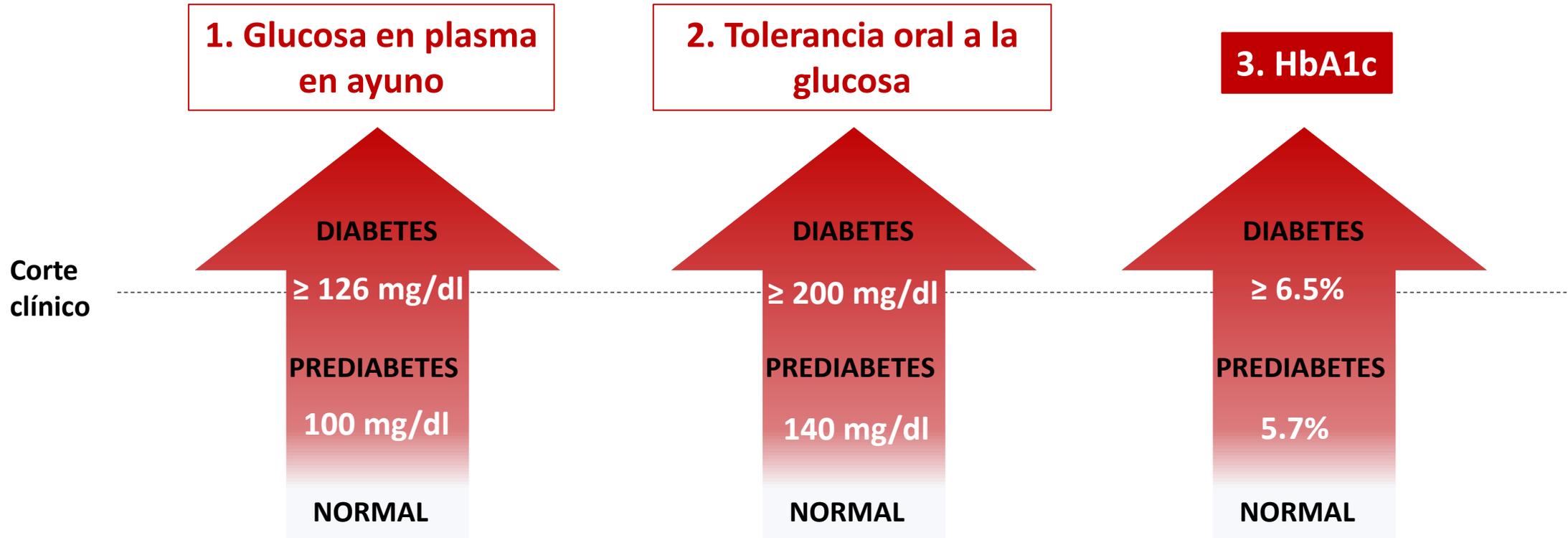
- Es una condición en la cual los niveles de glucosa en la sangre son más altos de lo normal pero no lo suficientemente altos para ser diagnosticado como diabetes.
- Personas con prediabetes se encuentran en **riesgo potencial de desarrollar diabetes tipo II, así como enfermedades del corazón y accidente cerebrovascular.**
- Tratamiento: modificaciones en el estilo de vida.

# Complicaciones de la diabetes



# Diagnóstico de la Diabetes

Existen varias pruebas para diagnosticar la diabetes:

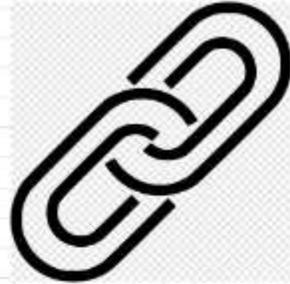




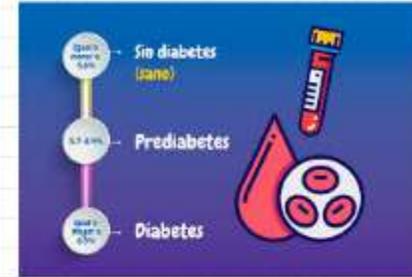


# Historia de la prueba A1c

Relación



Diagnóstico



1

1958-1968

2

1969- 1976

3

2009-2010

4

2013

5

2014

Identificación



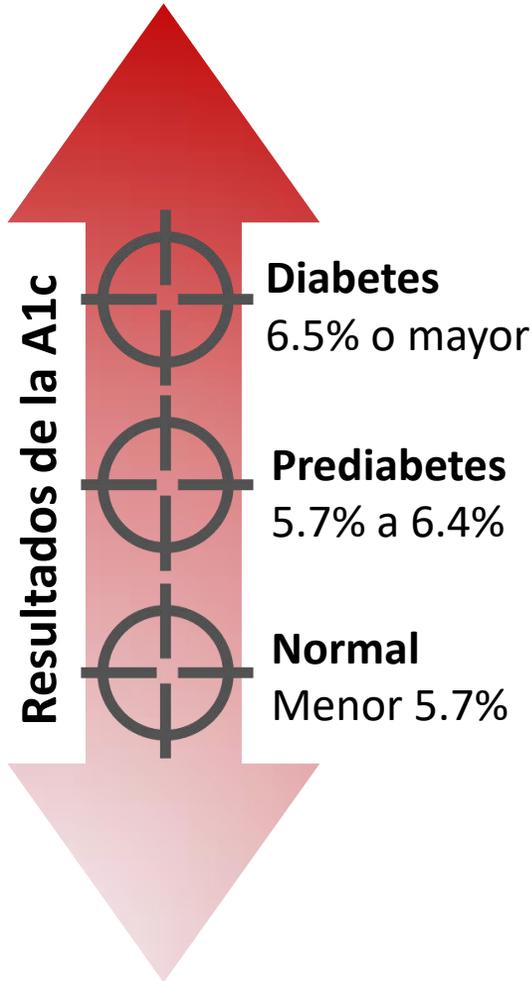
IEC, ADA y FDA



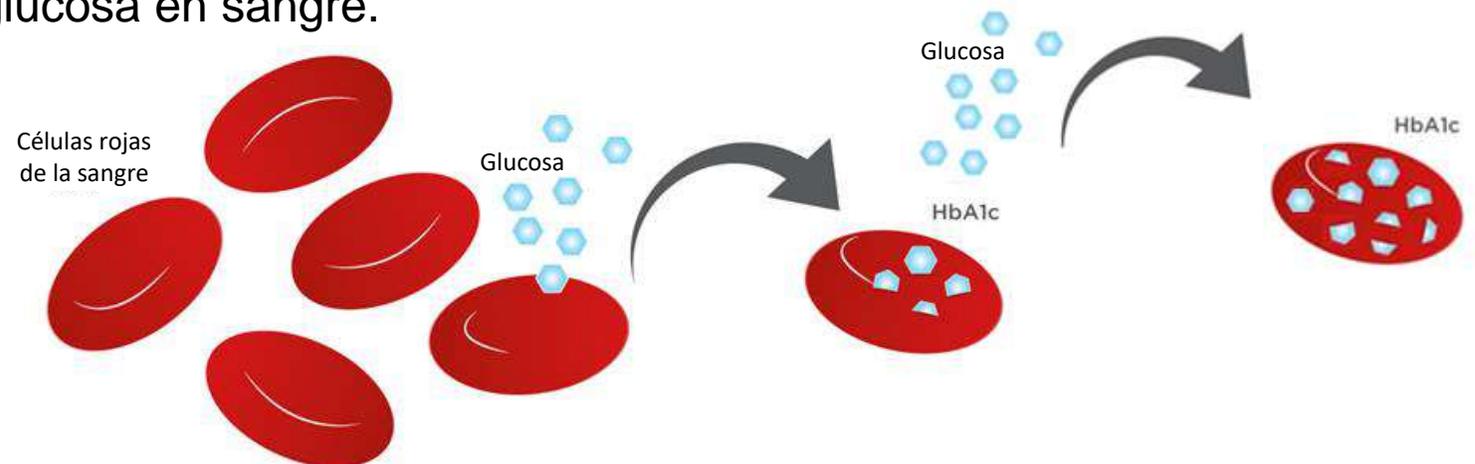
G8



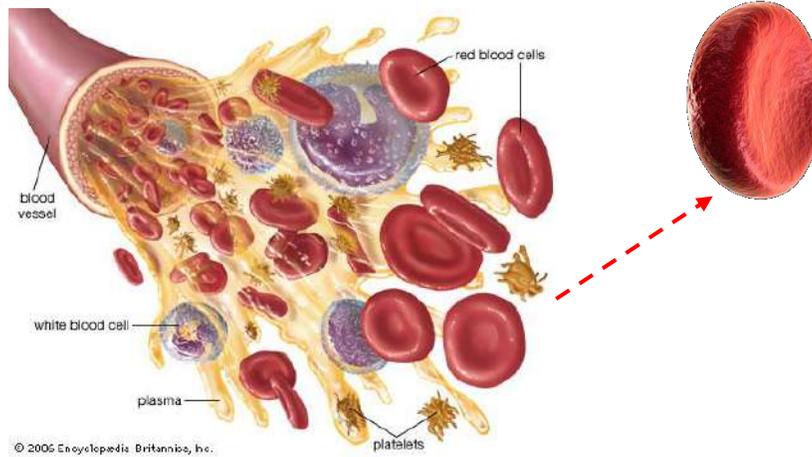
# ¿Qué es la prueba de A1c?



- La prueba de A1C mide el promedio de los niveles de glucosa en sangre de una persona de los últimos **1 a 3 meses**.
- Hemoglobina es la parte de las células rojas que acarrea oxígeno a otras células del cuerpo y es capaz de unirse a la glucosa en el torrente sanguíneo.
- También llamada hemoglobina A1C, hemoglobina glicada o HbA1c.
- La prueba muestra la cantidad de glucosa que se une a las células rojas presentes en la sangre, dicha cantidad es proporcional a la cantidad de glucosa en sangre.



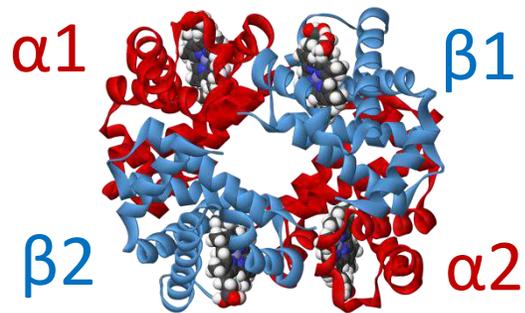
# Globulo Rojo & Hemoglobina



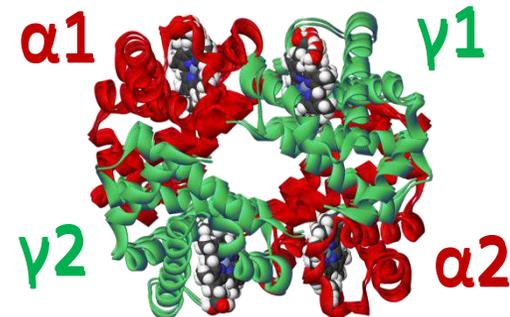
## Globulo Rojo

- Discos Bicóncavo
- Sin núcleos ni mitocondrias.
- 1/3 Hemoglobina

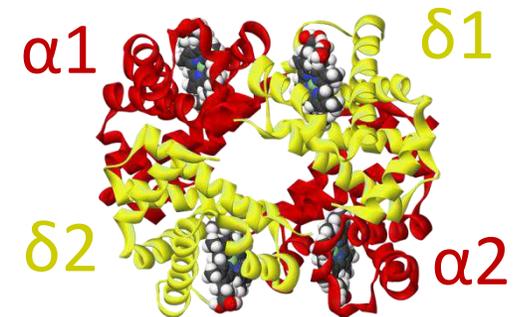
**HbA: +/-95%**



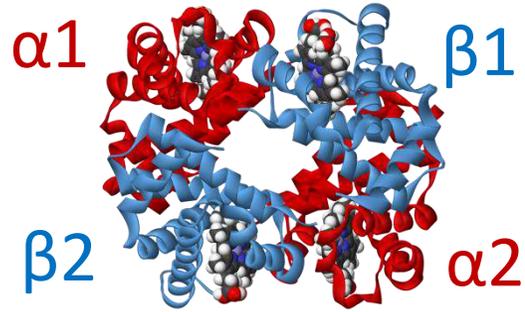
**HbF < 2%**



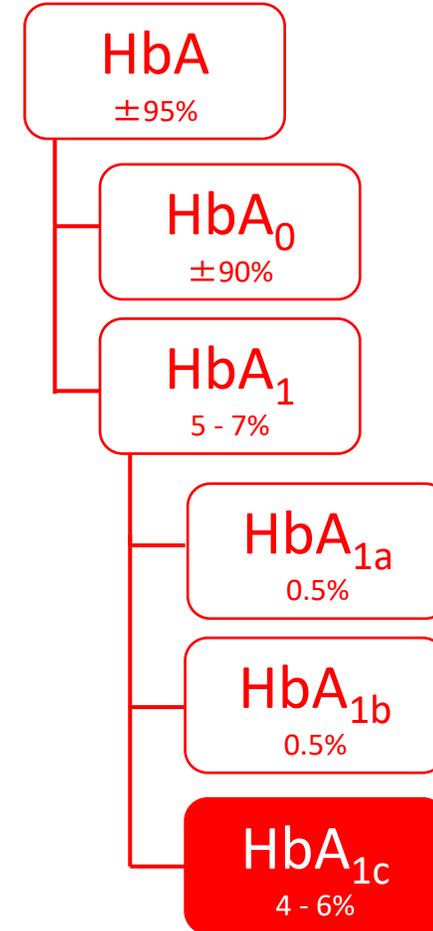
**HbA2: 2,0-3,5%**



# RBC & Hb: Haemoglobin A

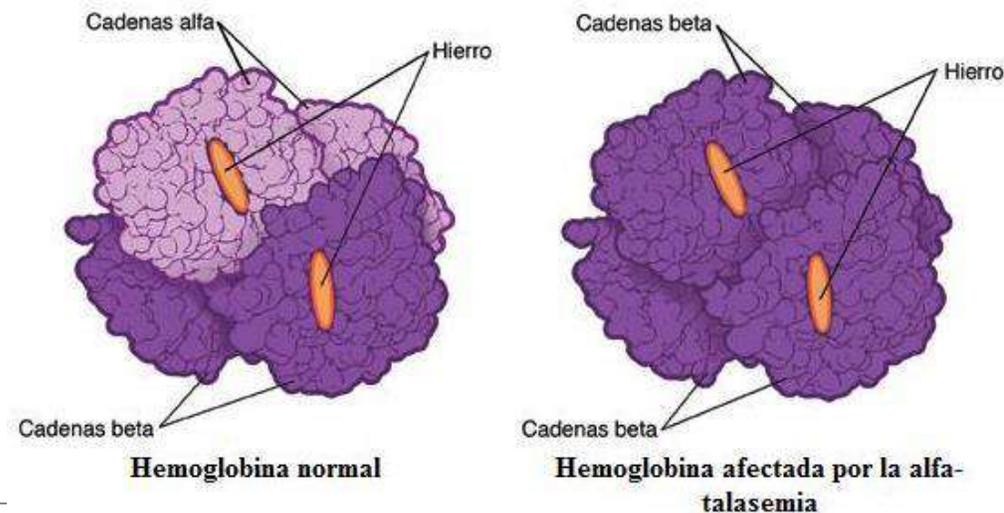


- 2  $\alpha$  chains
- 2  $\beta$  chains



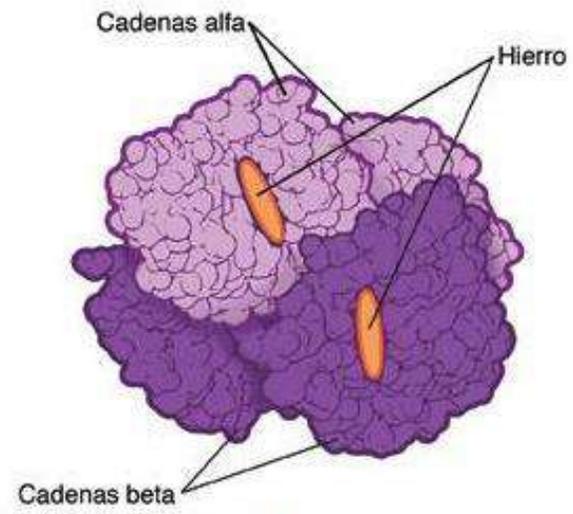
# Hemoglobinopatías

- Hemoglobinopatía: **grupo de enfermedades hereditarias, caracterizada por anomalías, tanto cuantitativas como cualitativas, en la síntesis de hemoglobina:**
  - Defectos en la cantidad de cadenas alfa o beta normales - ***Talasemias***.
  - Cambio en la estructura de los genes de globina alfa o beta. **variante de hemoglobina.**
- Más de 1586 anomalías caracterizadas:
  - Base de datos de variantes: <http://globin.cse.psu.edu/globin/hbvar/>

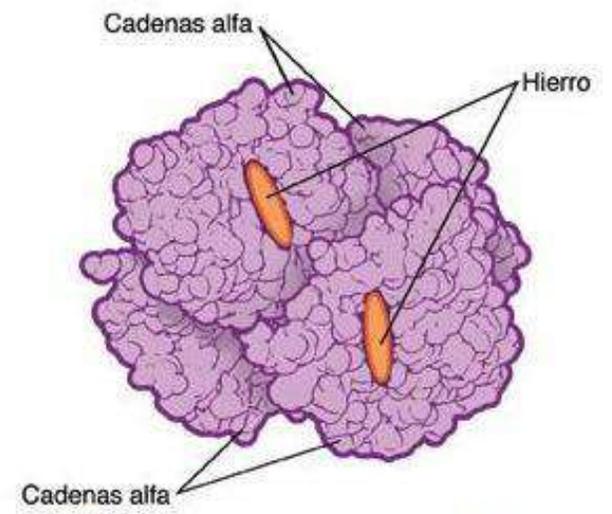


Hemoglobinopatía = defecto cualitativo  
 Talasemia = defecto cuantitativo

Residuo	Hb A	Hb S
1	Val	Val
2	His	His
3	Leu	Leu
4	Treo	Treo
5	Pro	Pro
6	Glu	Val
7	Glu	Glu



Hemoglobina normal

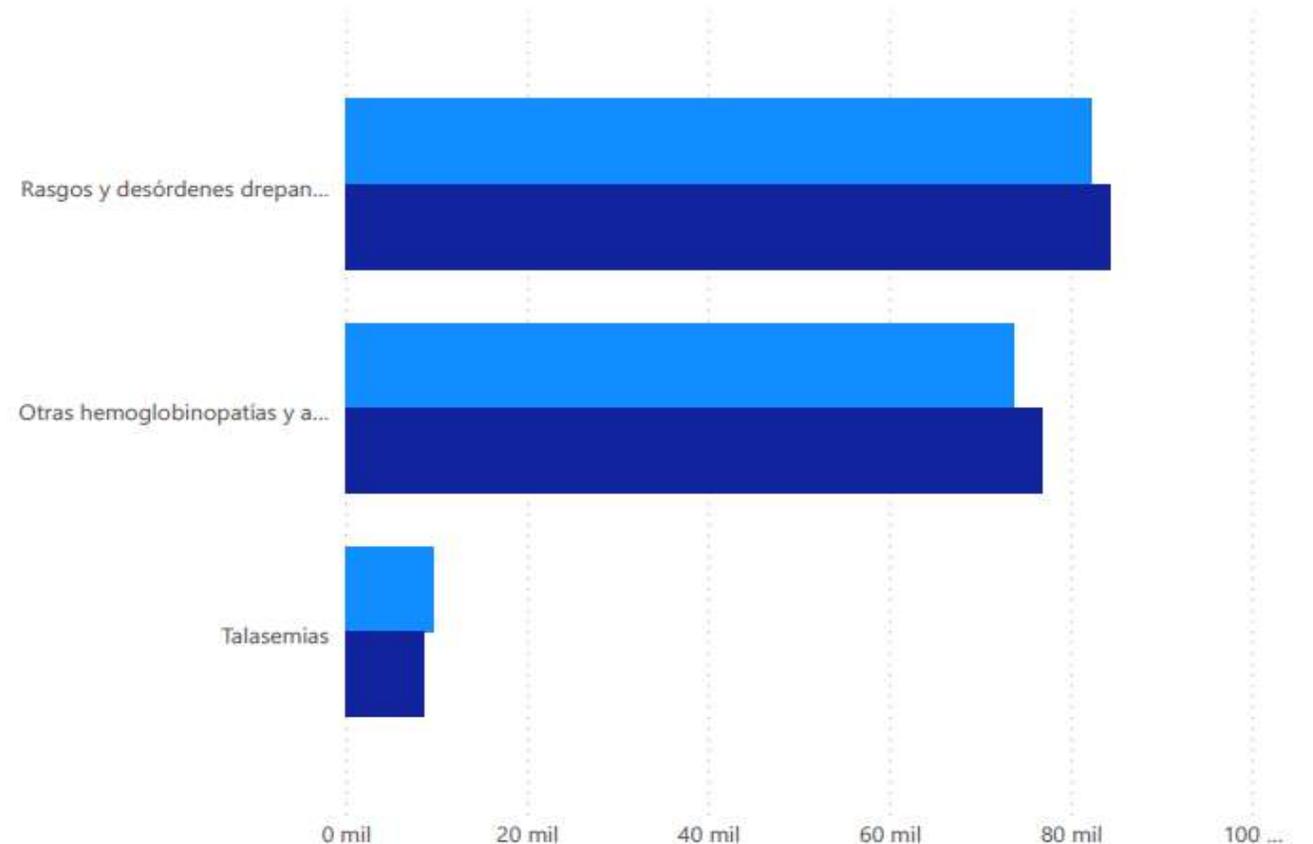


Hemoglobina afectada por la beta-talasemia

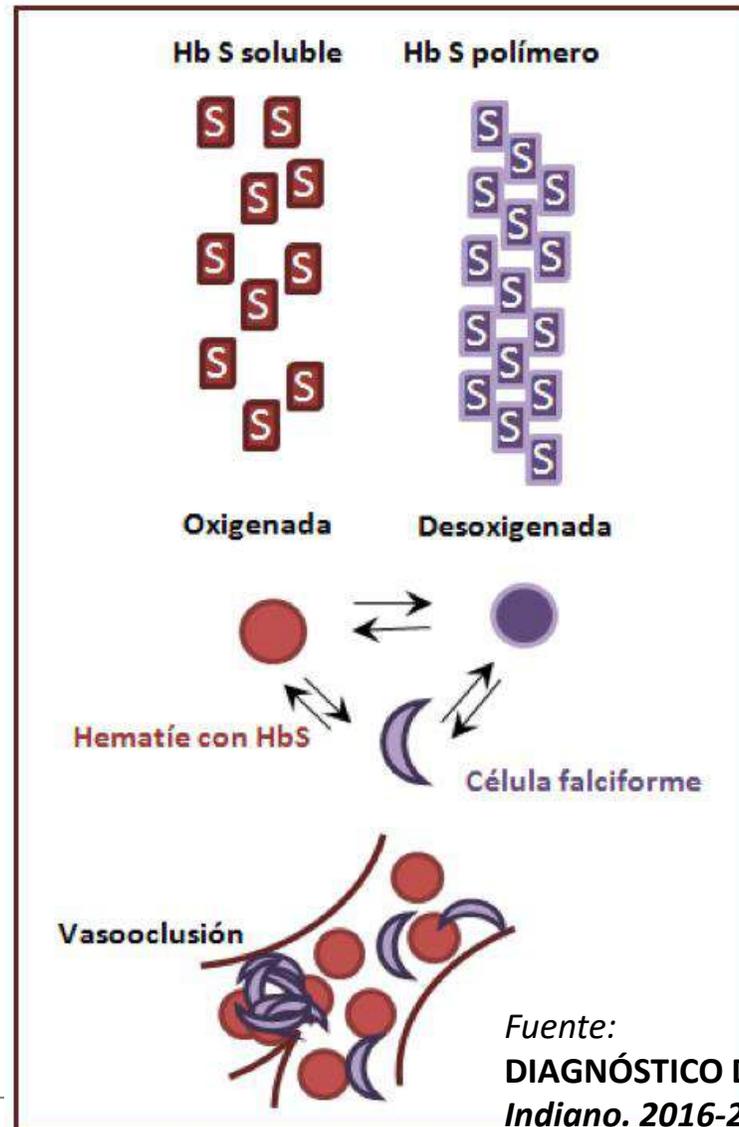
# Datos relevantes

- Problema sanitario en 162 países
- 89% de todos los nacimientos.
- Cada año nacen más de 330 000 niños afectados (83% anemia de células falciformes y 17% de talasemia).
- 3,4% de las defunciones entre niños menores de 5 años.
- 7% de las mujeres embarazadas son portadoras de talasemia  $\beta$  o  $\alpha$  cero, o de hemoglobina S, C, D Punjab o E,

10 ● 2016



Representación de la HbS en el proceso de formación de polímeros falciformes con obstaculización del flujo sanguíneo en los capilares sanguíneos.



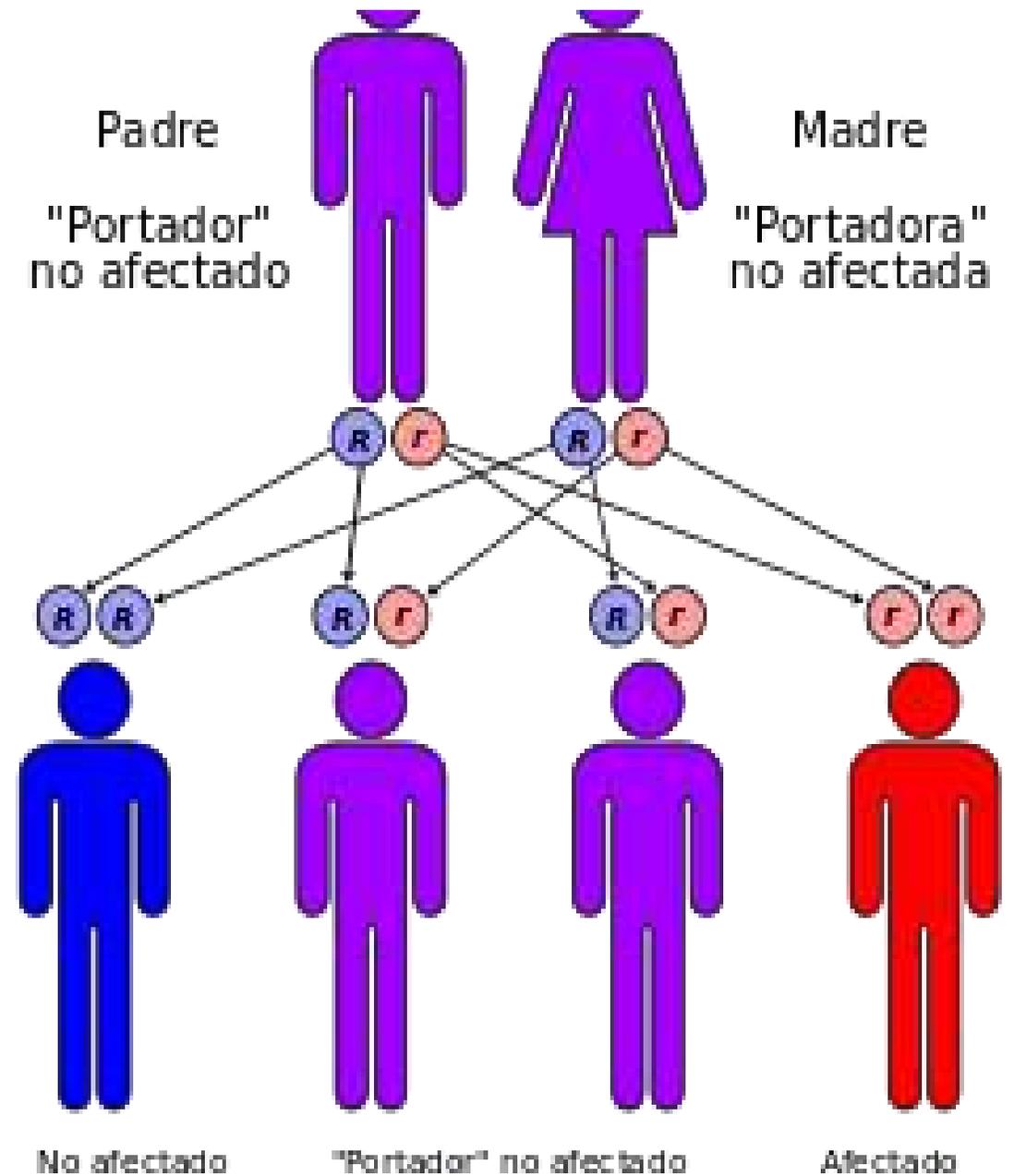


# Portador de Hb AS

- Totalmente asintomático



# Consejo genético





Cuándo sospechar  
que un paciente con  
diabetes tiene una  
hemoglobinopatía

# HbA1c: Consideraciones al elegir una prueba de A1c



# Consideraciones al elegir un método para la A1c

1. Medición específica de la A1c.
2. Precisión ( $CV < 2\%$ ).
3. Método certificado NGSP.
4. Detección de variantes de hemoglobina cuando están presentes.
5. Eliminación de interferencias.

Dependientes de la metodología

# Estandarización NGSP



El método de referencia.



¡Cromatografía de intercambio iónico/HPLC!

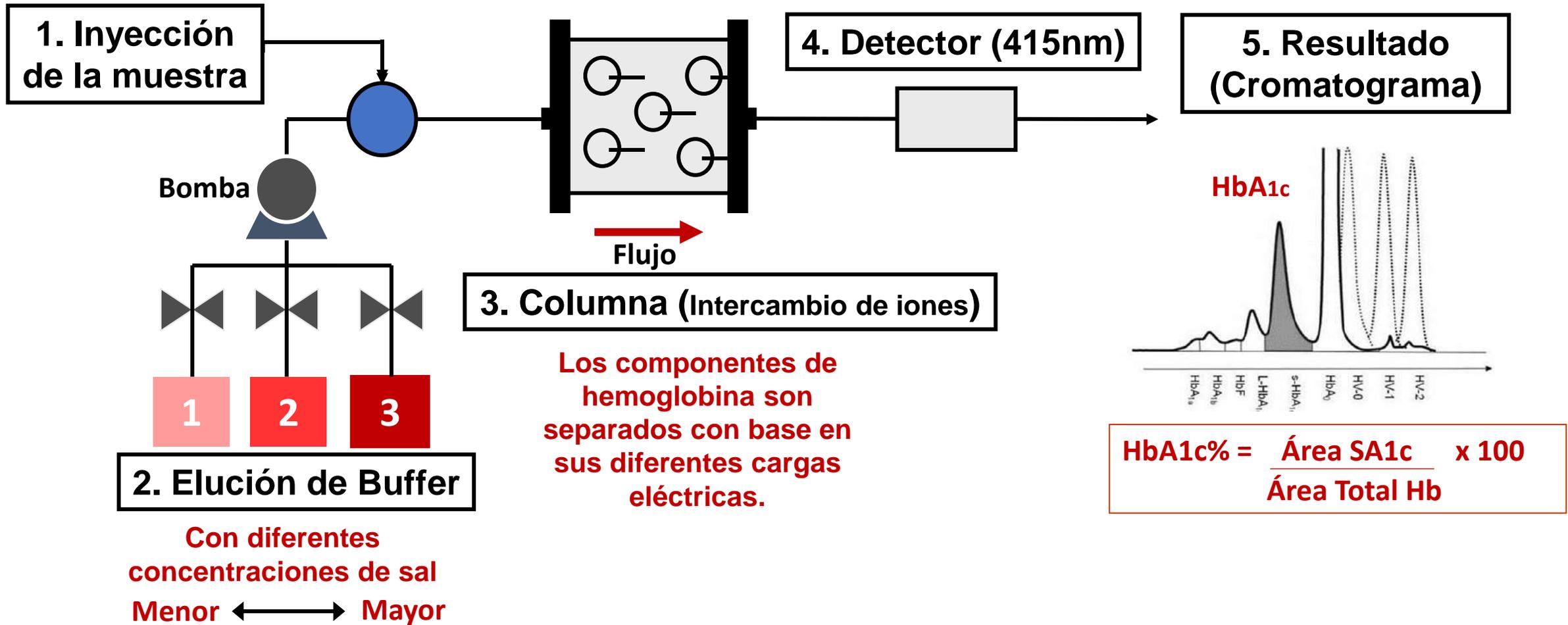
**NGSP = National Glycohemoglobin Standardization Program**



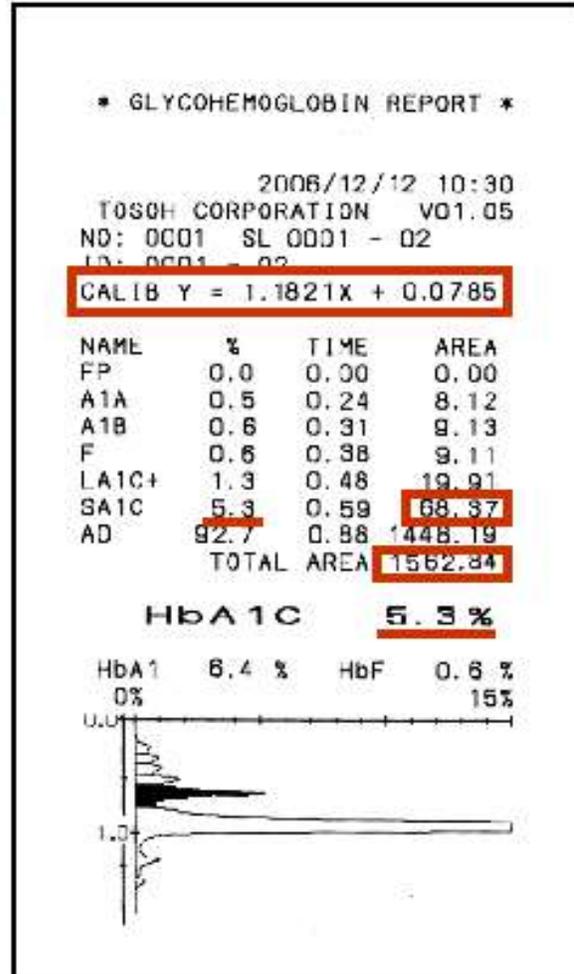
# A1c: Métodos y comparaciones

- **Basado en la diferencia de cargas:**
  - **Cromatografía de intercambio de iónico/HPLC**
  - Electroforesis
  - Enfoque isoeléctrico
- **Diferencias estructurales:**
  - Cromatografía de afinidad
  - **Inmunoensayo**
- **Análisis químico:**
  - Colorimetría
  - Espectrometría

# Principio del Sistema de HPLC de Tosoh



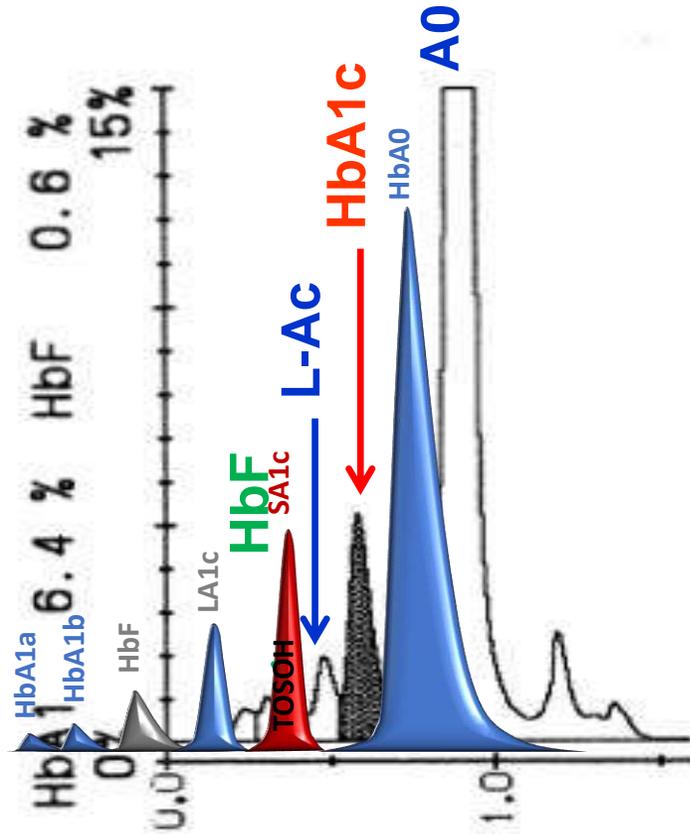
# Cromatograma: Reporte de HbA1c



## Un reporte muestra:

- Calibración válida.
- El nombre de cada fracción.
- El porcentaje correspondiente (calculado a partir del área bajo la curva).
- El tiempo de retención correspondiente.
- El área correspondiente a cada fracción.
  
- El porcentaje de **HbA1c %**
  
- Cromatograma:
  - Ejes: Concentración vs el tiempo de retención.
  - Picos: Correspondientes a cada fracción eluída.

# LA RESOLUCIÓN



- La columna está hecha con resina polimérica no porosa.
- Base de la **excelente separación de picos** en los cromatogramas.

$$\% \text{HbA1c} = \frac{\text{Área de SA1c}}{\Sigma \text{Área total HbA}}$$



## No diabético

\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*

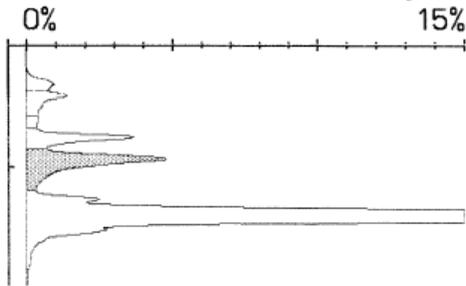
G11-61461  
 2016/10/11 11:40  
 OP: TOSHI V02.00  
 NO: 0019 SL 0003 - 01  
 ID: 0003 - 01  
 CAL(IN)= 11.8356X - 17.2240

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.00	0.00	0.00
A1A	0.62	0.17	5.21
A1B	1.00	0.21	8.37
F	0.25	0.30	2.06
LA1C+	1.97	0.38	16.48
SA1C	4.77	0.47	32.44
AO	92.53	0.70	774.29
TOTAL AREA			838.85

IFCC 28.7 mmol/mol

**HbA1c 4.77%**

HbF 0.25 %



## Diabético

\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*

G11-61461  
 2016/12/09 10:03  
 OP: ANN V02.01  
 NO: 0005 SL 0001 - 05  
 ID: 0001 - 05  
 CAL(IN)= 11.9459X - 17.3530

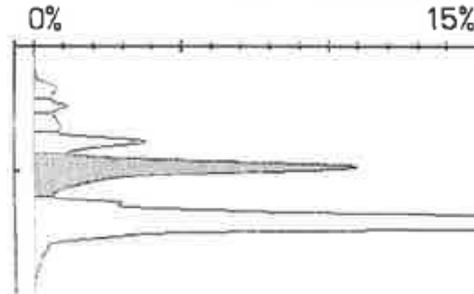
TP 512

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.00	0.00	0.00
A1A	0.68	0.18	6.28
A1B	0.71	0.25	6.58
F	0.81	0.33	7.59
LA1C+	2.55	0.39	23.57
SA1C	11.03	0.49	88.61
AO	86.49	0.70	800.15
TOTAL AREA			932.79

IFCC 97.1 mmol/mol

**HbA1c 11.03%**

HbF 0.81 %



## Persistencia Hereditaria de HbF

\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*

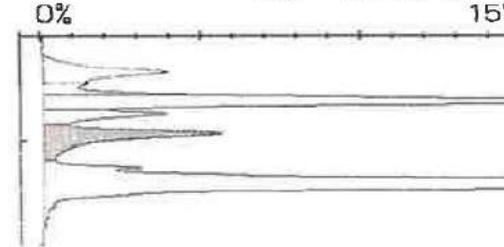
G11 - UIN 65542  
 2018/05/25 08:24  
 OP: ANN V03.01  
 NO: 0003 SL 0001 - 03  
 ID: 008406901766  
 CAL(IN)= 12.0450X - 17.1563

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.00	0.000	0.00
A1A	3.12	0.178	20.10
A1B	1.63	0.238	10.52
<b>F</b>	<b>10.00</b>	<b>0.320</b>	<b>71.72</b>
LA1C+	2.16	0.377	13.91
SA1C	5.71	0.467	30.02
AO	88.44	0.707	570.60
TOTAL AREA			716.87

IFCC 38.9 mmol/mol

**HbA1c 5.71%**

HbF 10.00 %

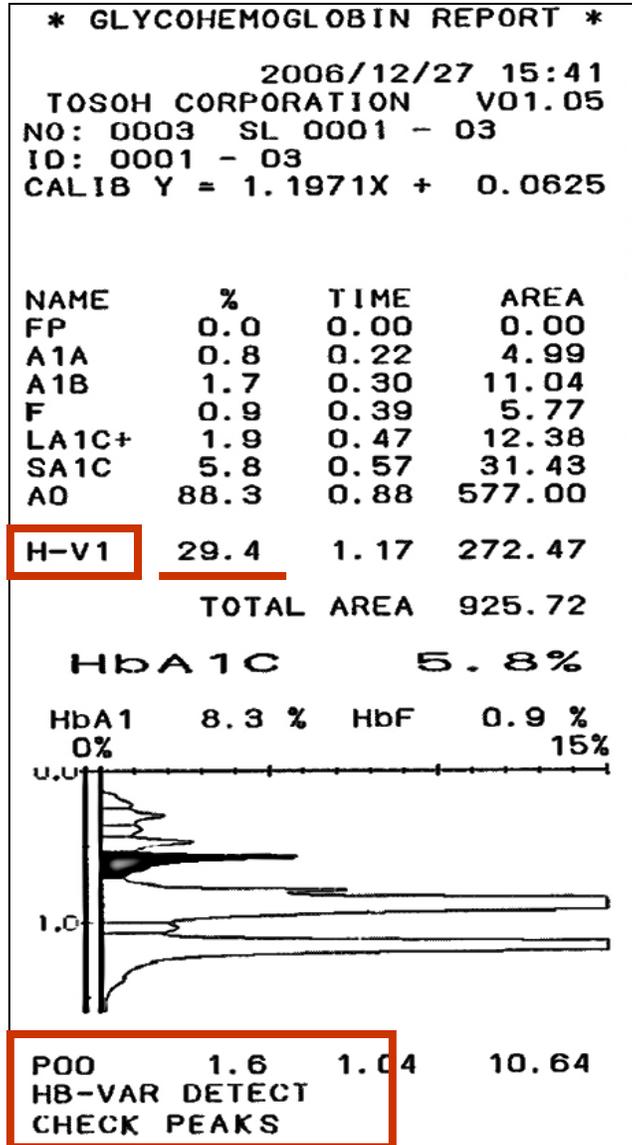


HbF < 30%

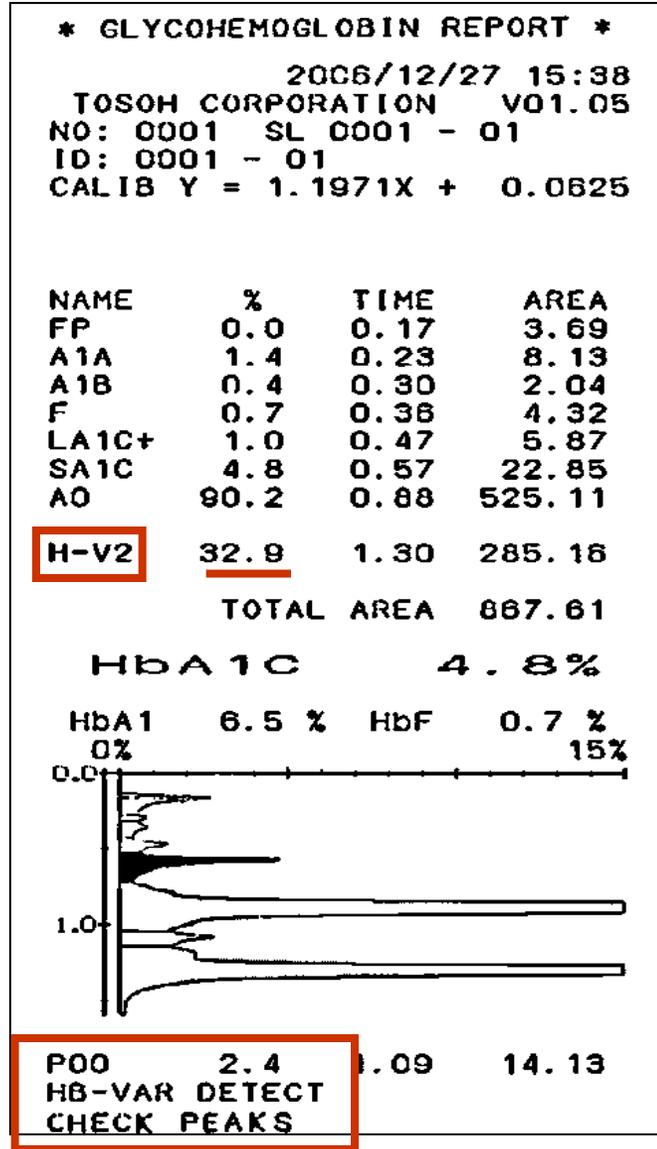


# Variantes Heterocigotas Reportables

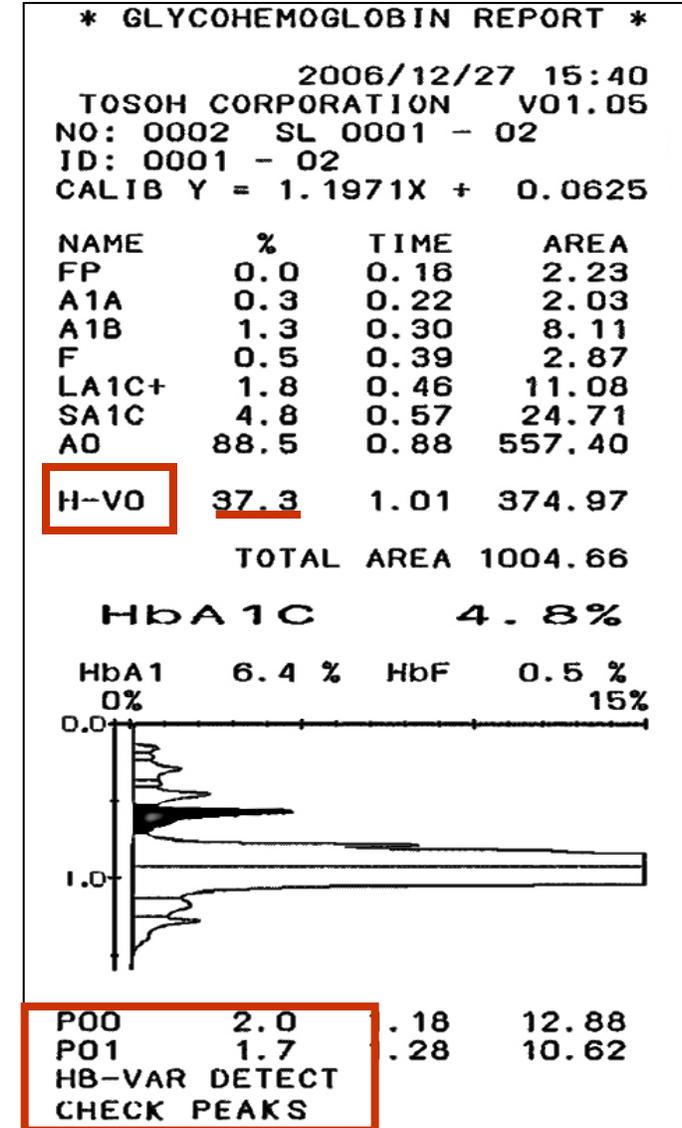
## HbAS



## HbAC

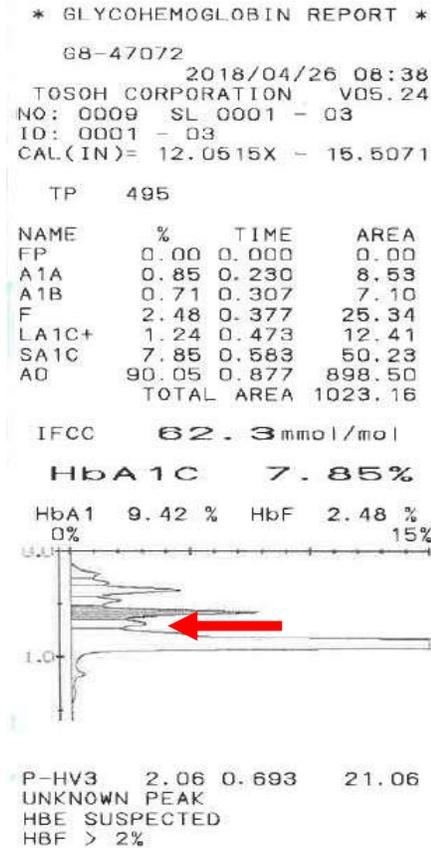


## HbAD



# Variantes Heterocigotas Reportables

## HbAE



→ Posible HbAE

→ HbA1c puede ser reportada



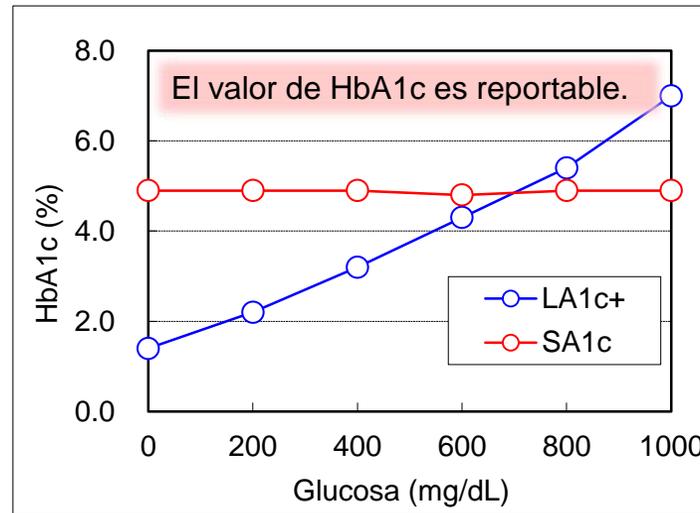
# Interferencia

	<b>G8</b> v. 5.24	<b>G11</b> v. 3.00
<b>Lábil</b>	<b>No</b>	<b>No</b>
<b>Carbamilada</b>	<b>No</b>	<b>No</b>
<b>Acetilada</b>	<b>No</b>	<b>No</b>
<b>Aldehído</b>	<b>No</b>	<b>No</b>
Variant S	No	No
Variant C	No	No
Variant D	No	No
Variant E	No	No

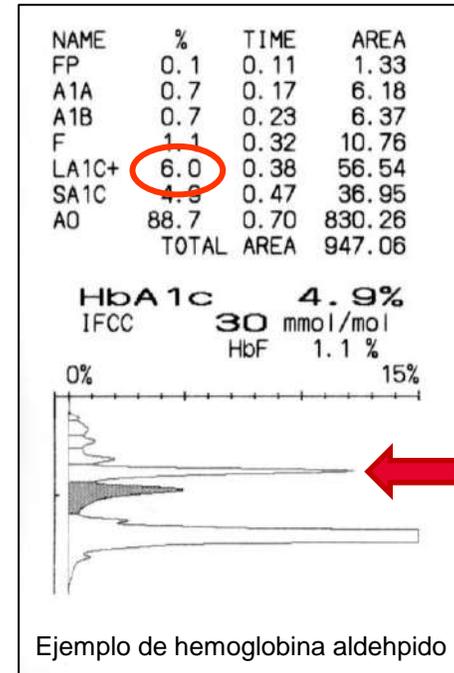
## • Efecto mínimo de la Hb modificada

- Hb lábil
- Hb carbamilada
- Hb acetilada

### A1c lábil



### Hb aldehído





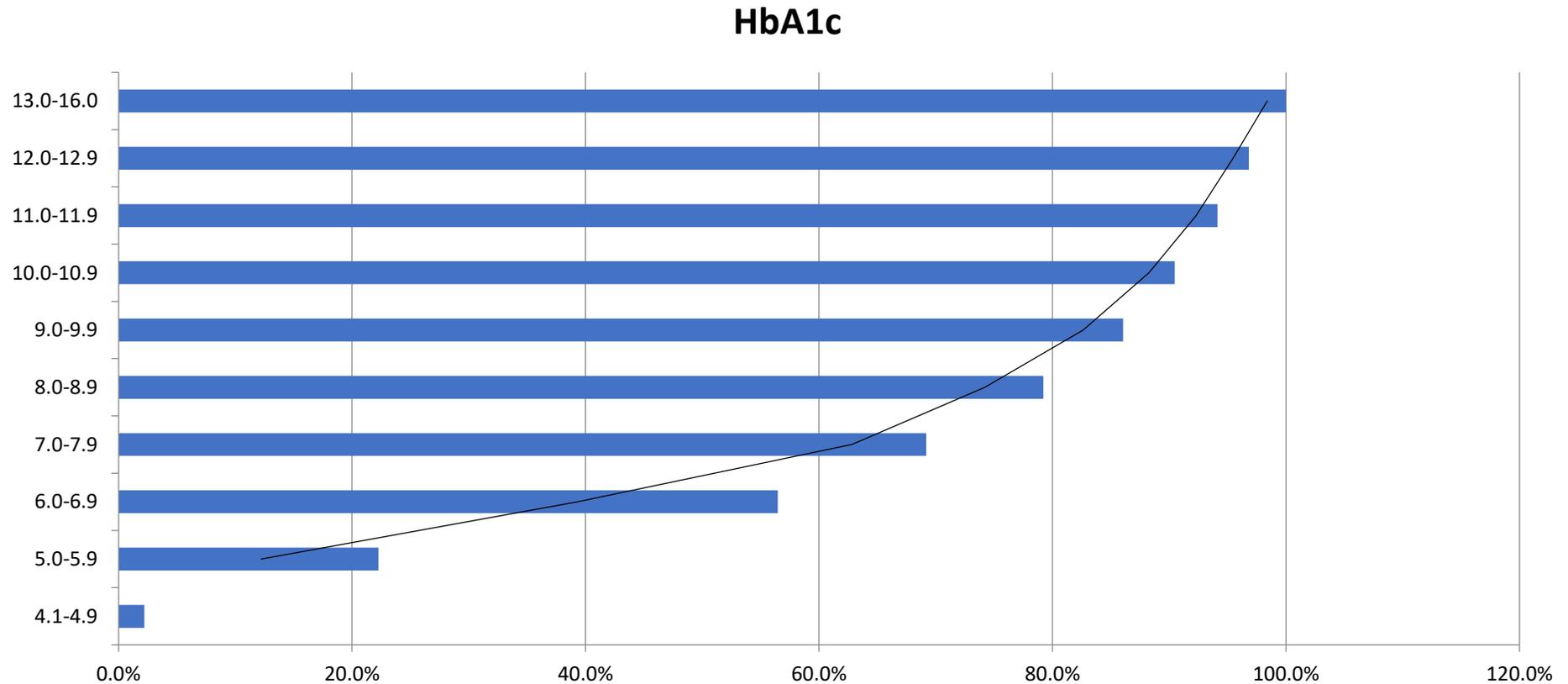
# Experiencia en el Área de Salud de Alajuelita





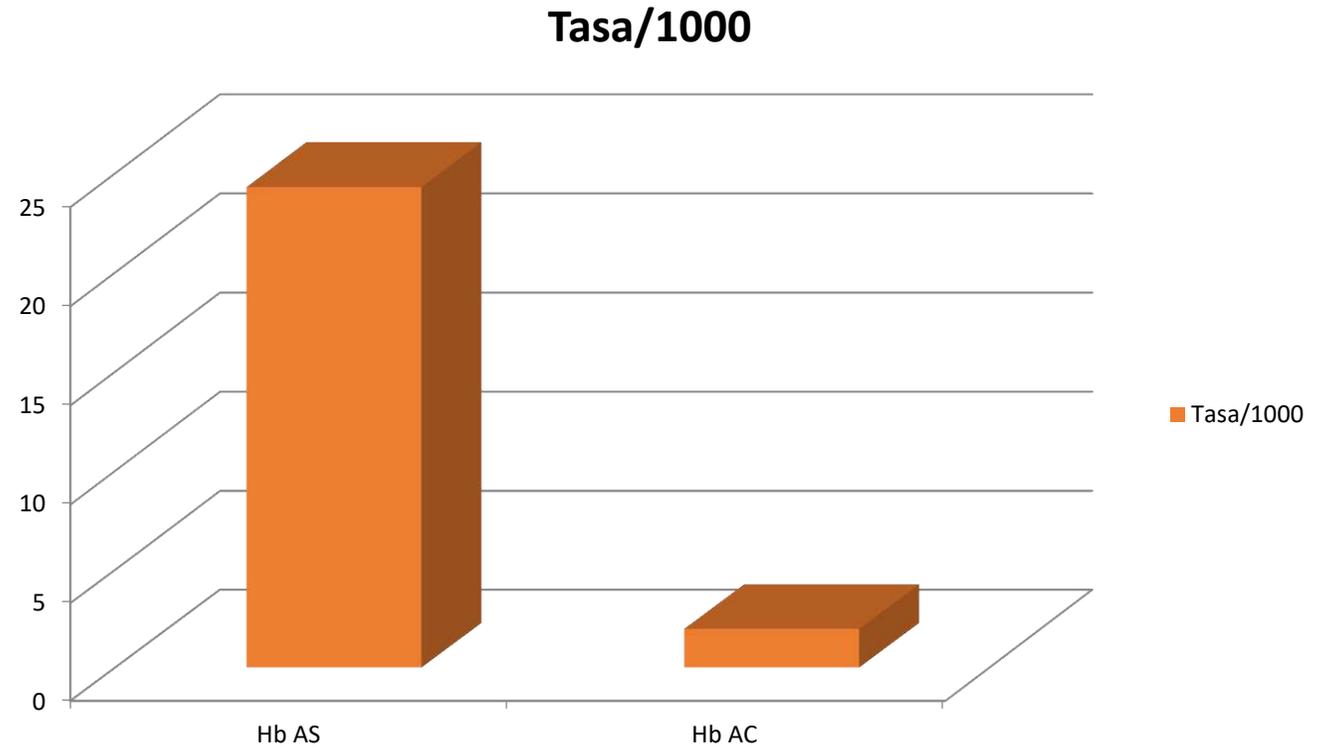
# 2017-2020

- 24500 determinaciones de HbA1c
- 6584 pacientes



# Portadores de hemoglobinopatías

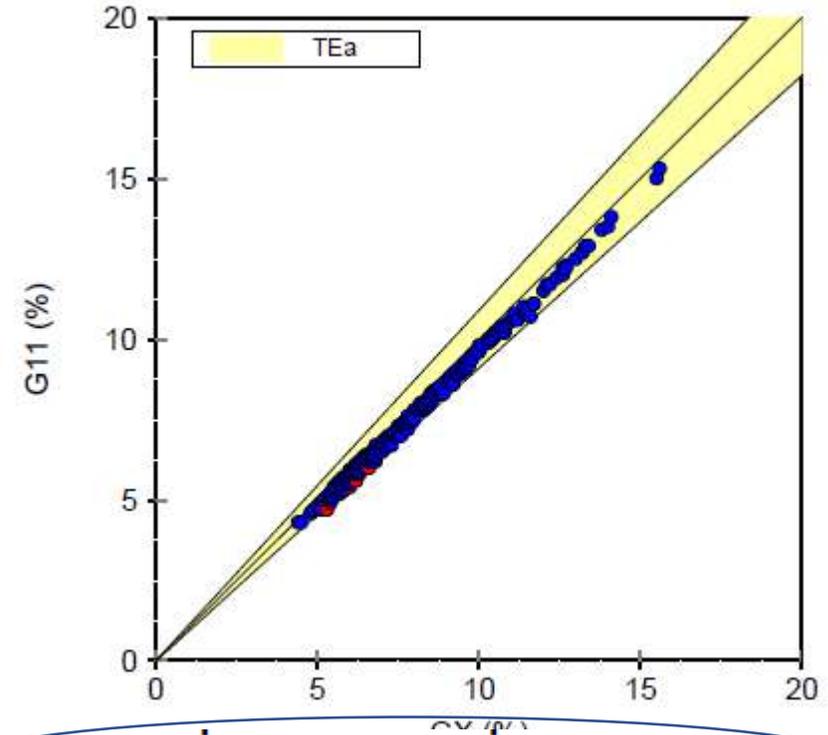
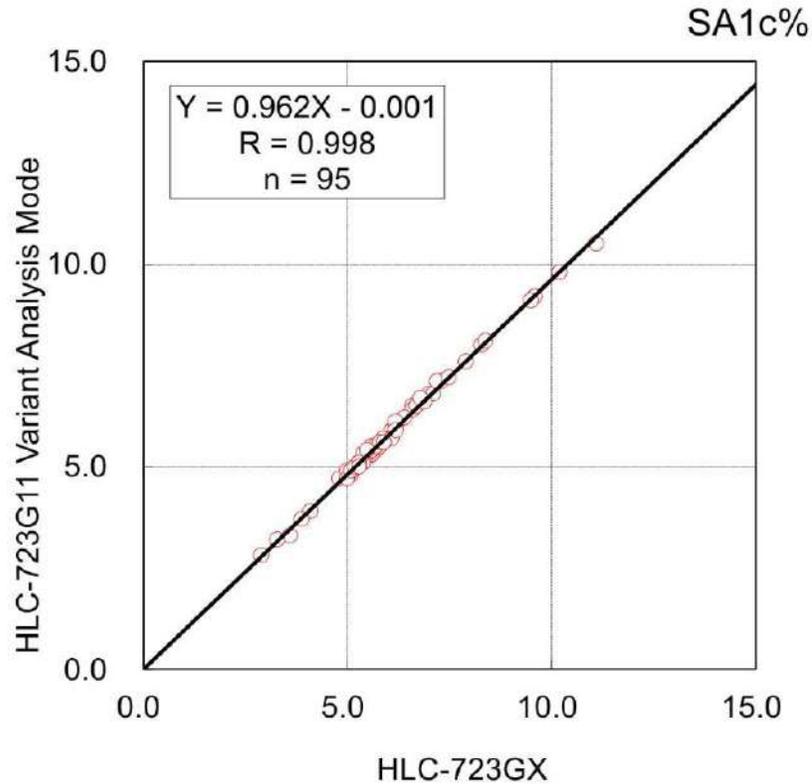
- 160 Hemoglobina AS
- 13 Hemoglobina AC





# Correlación GX y G11

## Correlation with GX



Correlation Coeff (R)	0.9985
Slope	0.974 (0.969 to 0.980)
Intercept	-0.14 (-0.19 to -0.10)
Std Error Estimate	0.12
N	336 of 336



\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*

2020/10/01 06:57  
TOSOH CORPORATION VO1.24  
NO: 0006 TB 0002 - 04  
ID: 201001011  
CAL(N) = 1.1570X + 0.4804

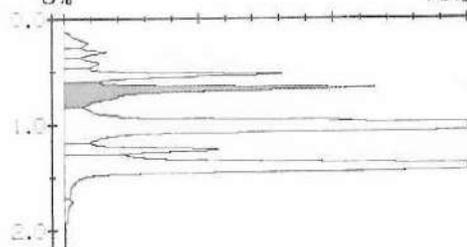
NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	0.9	0.23	7.15
A1B	1.0	0.32	8.03
F	0.8	0.43	9.18
LA1C+	4.5	0.54	37.41
SA1C	11.6	0.67	71.82
AO	80.7	1.04	664.73

H-V1 29.8 1.43 353.57

TOTAL AREA 1186.95

HbA1c 11.6%

HbA1 13.4 % HbF 0.8 %  
0% 15%



P00 3.8 1.25 31.01

P01 0.5 1.74 4.06

HB-VAR DETECTADA

HV0=D

HV1=S

HV2=C

CHEQUEAR PICOS

# Chromatogram Report

11789405 V03.04 789405 2020/10/01 13:04:36

ID 201001011

Sample No. 2020100112080009 SL 0001 - 04

Patient ID

Name

Comment

CALIB(N) Y = 1.1559X + 0.2352

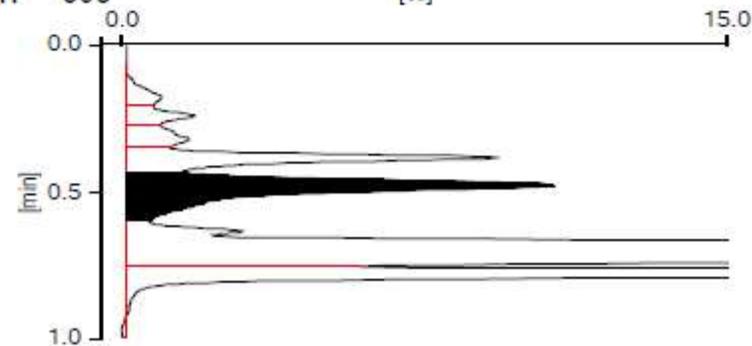
Name	%	Time	Area
FP			
A1A	0.7	0.18	6.62
A1B	1.0	0.24	8.92
F	0.8	0.32	11.62
LA1C+	4.6	0.38	41.91
SA1C	10.7	0.48	79.12
AO	85.1	0.71	770.44
H-VAR	32.7	0.77	450.83
Total Area			1378.46

HbA1c 10.7 %

HbF 0.8 %

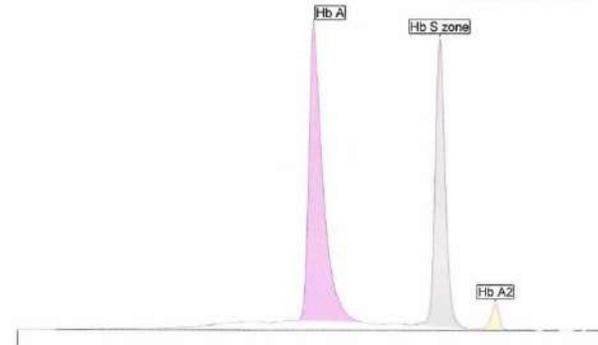
Flag:40

TP 595



Nombre:  
 Cédula:  
 Sexo:  
 Fecha de nacimiento:  
 Edad : 47

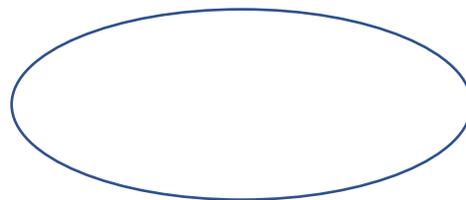
Procedencia: AS Alajuelita  
 Muestra # : 11  
 Fecha de recibido :  
 Fecha de análisis: **05-10-2020**  
 Analista: Dr.  
 Número de orden:



**Electroforesis de Hemoglobinas**

Nombre	%	Valores normales %
Hb A	57,7	
Hb S zone	39,4	
Hb A2	2,9	

Hemoglobina AS



MQC Responsable



\* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT \*

2020/11/10 11:45  
TOSOH CORPORATION V01.24  
NO: 0026 TB 0006 - 01  
ID: 201110121  
CAL(N) = 1.1162X + 0.6305

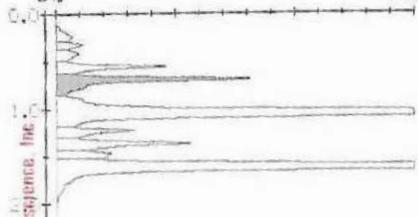
NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	0.7	0.24	4.70
A1B	0.7	0.33	4.40
F	0.6	0.41	5.68
LA1C+	2.8	0.55	17.40
SA1C	8.1	0.68	38.57
A0	81.1	1.04	509.06

H-V2 35.6 1.61 350.29

TOTAL AREA 983.35

HbA1c 8.1%

HbA1 9.6 % HbF 0.6 %  
0% 15%



PD0	2.3	1.22	14.54
PD1	4.2	1.36	26.06
PD2	2.0	1.47	12.64

HB-VAR DETECTADA

HVO=D

HV1=S

HV2=C

CHEQUEAR P1000

### Chromatogram Report

11789405 V03.04 789405 2020/11/10 12:48:27

ID 201110121  
Sample No. 2020111012460024 SL 0001 - 01  
Patient ID  
Name  
Comment

CALIB(N) Y = 1.1240X + 0.5910

Name	%	Time	Area
FP			
A1A	0.7	0.17	3.69
A1B	0.6	0.23	3.18
F	0.5	0.29	4.32
LA1C+	2.6	0.38	13.12
SA1C	7.5	0.47	29.71
A0	81.4	0.71	407.19

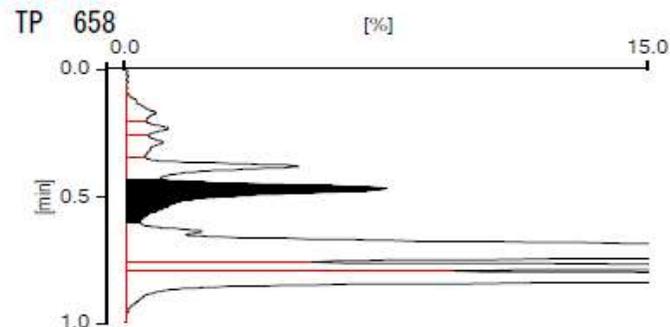
H-VAR 35.9 0.81 282.82

Total Area 787.59

HbA1c 7.5%

HbF 0.5%

Flag:24



**Nombre:**

Cédula:

Sexo: M

Fecha de nacimiento:

Edad : 65

Procedencia: EBAIS CONCEPCION ABAJO

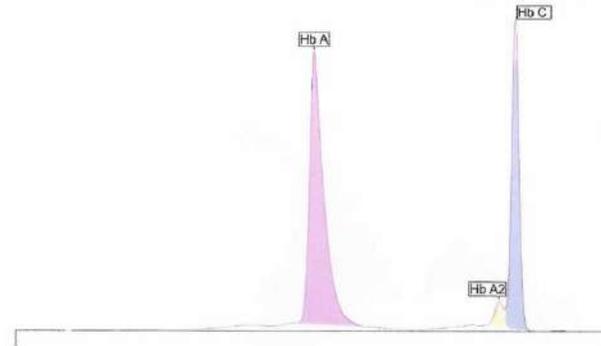
Muestra # : 4

Fecha de recibido :

Fecha de análisis: **11-11-2020**

Analista:

Número de orden:



**Electroforesis de Hemoglobinas**

Nombre	%	Valores normales %
Hb A	61,4	
Hb A2	3,2	
Hb C	35,4	

Hemoglobina AC

NQC Responsable

# Conclusiones

- HbA1c: marcador para el diagnóstico de prediabetes y diabetes. Control y seguimiento de diabéticos
- El método de medición de HbA1c debe contar con NGSP
- La determinación de HbA1c por HPLC no tiene interferencia con la mayoría y más frecuentes hemoglobinas variantes
- En regiones con alta prevalencia de hemoglobinopatías, el método a utilizar debe ser cuidadosamente seleccionado
- Siempre debemos ir más allá en pro del paciente



TOSOH

# Gracias por su atención



**Insista**  
**Persista**  
**Mas nunca desista!**