

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultade de Química

**Evaluación de un analizador
automático de intercambio iónico
(HPLC) para la medida de
hemoglobina glicada**

Curso 2024/2025

Alumno/a: Iago Carballo Fernández

GRAO EN QUÍMICA



Javier Rodríguez García, titor e docente do Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular da USC, e Juan Bautista Ortolá Devesa, cotitor, autorizan a presentación do Traballo de Fin de Grao do alumno **Iago Carballo Fernández** na convocatoria de xullo do curso 2024/2025, o cal foi realizado baixo a súa dirección no Laboratorio de Análisis Clínicos do Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela..

E para que así conste asinamos o presente informe en Santiago de Compostela o 18 de xuño do 2025

Firmado por JUAN BAUTISTA
ORTOLA DEVESA - ***4232** el
día 18/06/2025 con un
certificado emitido por AC
CAMERFIRMA FOR NATURAL PERSONS

Firmado por JAVIER
RODRIGUEZ GARCIA -
***6100** el día
18/06/2025 con un
certificado emitido por AC
CAMERFIRMA FOR NATURAL
PERSONS - 2016

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	4
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	5
1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1. Diabetes Melitus	10
2.2. Hemoglobina glicada: formación e importancia	11
2.3. Otros ligandos de interés para nuestro estudio	13
2.4. Métodos de medida de HbA1c	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. OBJETIVOS.....	18
5. MATERIAL Y MÉTODOS	19
5.1. Materiales	19
5.2. Diseño del estudio	21
5.3. Equipos y programas adicionales	27
5.4. Análisis estadístico	28
6. RESULTADOS	29
6.1. Precisión y veracidad.....	29
6.2. Linealidad	29
6.3. Comparación de métodos	30
6.4. Interferencias	33
6.5. Comparativa <i>Fast/Variant</i>	38
7. DISCUSIÓN.....	40
8. CONCLUSIONES.....	45
9. BIBLIOGRAFÍA	46
10. ANEXOS.....	49
Anexo I: Permiso del comité de ética.....	49
Anexo II: Solicitud de presentación de Poster.....	50

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Sociedad Española de Medicina del Laboratorio	SEQC
Hemoglobina glicada	HbA1c
Diabetes Melitus	DM
<i>American Diabetes Association</i>	ADA
Instituto Nacional de Estadística	INE
<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>	DCCT
Organización Mundial de la Salud	OMS
Hemoglobina tipo A	HbA
Hemoglobina carbamilada	cHb
Hemoglobina acetilada	HbAc
Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia	HPLC
<i>Bacterial Magnetic Particle</i>	BMP
Hemoglobina fetal	HbF
<i>International Federation of Clinical Chemistry</i>	IFCC
<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i>	NGSP
Buenas Prácticas de Laboratorio	BLP
<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	CLSI

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Tablas

Tabla 1: Criterios de diagnóstico de DM según la ADA.....	11
Tabla 2: Resultados de las pruebas de variabilidad.....	29
Tabla 3: Valores estadísticos de la recta Passing-Bablok comparando el NEXT con el 8190V	30
Tabla 4: Valores estadísticos de la recta Passing-Bablok comparando el 8180T con el 8190V	31
Tabla 5: Regresión de Passing-Bablok comparando el modo Fast y el modo Variant. 38	
Tabla 6: Datos estadísticos del test de t de Student.....	38
Tabla 7: Resultados del test de Kappa de Cohen.....	39

Figuras

Figura 1: Prevalencia de DM en España entre los años 2000-2020 según el INE	10
Figura 2: Reacción de Maillard aplicada a la glicación de HbA	12
Figura 3: Ejemplo de cromatograma de intercambio catiónico.....	16
Figura 4: Fotografía del equipo a evaluar (ARKRAY ADAMS 8190v).....	19
Figura 5: Cromatograma correspondiente a una muestra normal obtenido con el 8190V con las distintas fracciones identificadas.....	20
Figura 6: Tubos de muestra empleados en el análisis	21
Figura 7: Correlación entre valores teóricos y medidos en el estudio de linealidad	29
Figura 8: Regresión Passibg-Bablok de la comparativa de los equipos NEXT-8190V 30	
Figura 9: Gráfica de Bland-Altman comparando el Hb-NEXT y el 8190V.....	31
Figura 10: Regresión Passing-Bablok de los equipos 8180T-8190V	32
Figura 11: Gráfica de Bland-Altman de la comparativa de los equipos 8180T-8190V . 32	
Figura 12: Cromatogramas correspondiente a muestras con HbS (izquierda) y HbC (derecha).....	33
Figura 13: Variación de la medida de la fracción de HbA1c a diferentes concentraciones de hemoglobina	34
Figura 14: Variación de la medida de HbA1c respecto a diferentes fracciones de formas lábiles.....	35
Figura 15: Cromatogramas a diferente fracción de formas lábiles (1,7% y 3,7%)	35
Figura 16: Cromatogramas con fracciones crecientes de cHb (1-4 mmol/L).....	36
Figura 17: Medida de HbA1c respecto a concentraciones crecientes de acetaldehído .. 37	
Figura 18: Cromatogramas con fracción creciente de HbAc (0 y 10 mmol/L).....	37

Ecuaciones

Ecuación 1: Cálculo de la desviación estándar.....	22
Ecuación 2: Cálculo de la imprecisión intraserie.	22
Ecuación 3: Cálculo del coeficiente A	22
Ecuación 4: Cálculo del coeficiente B.....	22
Ecuación 5: Cálculo coeficiente de variación.....	23
Ecuación 6: Cálculo desviación estándar en el laboratorio.	23
Ecuación 7: Cálculo desviación estándar interdía.	23
Ecuación 8: Cálculo error sistemático (bias).....	23
Ecuación 9: Cálculo de nueva concentración a partir de dos disoluciones	24

1. RESUMEN

Introducción

La verificación de las prestaciones analíticas de los diferentes equipos de un laboratorio clínico es un paso obligado para garantizar la calidad de los resultados.

Específicamente la hemoglobina glicada (HbA1c) es un parámetro de gran importancia para el diagnóstico y control de pacientes diabéticos.

Este estudio evalúa un equipo de medida de HbA1c vía HPLC incorporado recientemente al laboratorio de análisis clínicos, el ADAMS 8190V, a fin de verificar sus prestaciones analíticas.

Métodos

Se han utilizado las guías del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en conjunto con las instrucciones de la Sociedad Española de Química Clínica (SEQC) para el estudio de imprecisión, veracidad y linealidad. Se ha estudiado el efecto de algunas interferencias con efectos significativos en los resultados de HbA1c. Finalmente, se ha realizado un estudio comparativo del ADAMS 8190V con equipos de HPLC certificados que cumplen los estándares máximos de calidad exigibles a la técnica.

Resultados

El ADAMS 8190V cumple los criterios de calidad exigidos, y no cuenta con interferencias en presencia de la mayoría de metabolitos estudiados o variantes de hemoglobina más frecuentes.

Si presenta interferencias a valores elevados de hemoglobina carbamilada (cHb).

Respecto a los equipos certificados presenta una buena correlación con ambos, habiendo algo más de variabilidad específicamente con uno de ellos.

Conclusiones

El equipo ADAMS 8190V presenta buenas prestaciones analíticas, y en conjunto con sus menores tiempos de análisis representa una mejora en la rutina del laboratorio clínico.

Palabras clave

Hemoglobina Glicada, Diabetes, CLSI, Evaluación de equipos, HPLC

RESUMO

Introducción

A verificación das prestación analíticas dos diferentes equipos dun laboratorio clínico é un paso obrigado para garantir uns resultados de calidade.

Específicamente a hemoglobina glicada (HbA1c) é un parámetro de gran importancia para o diagnóstico e control de pacientes diabéticos.

Neste estudo evalúase un equipo de medida de HbA1c via HPLC incorporado recentemente ao laboratorio de análise clínico, o ADAMS 8190V, co fin de verificar as súas prestacións analíticas.

Métodos

Utilizáronse as guías do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) en conxunto coas instrucción da Sociedad Española de Química Clínica (SEQC) para o estudio de imprecisión, veracidade e linealidade. Estudiouse o efecto de algunhas interferenzas con efectos significativos nos resultados de HbA1c. Finalmente, realizouse un estudio comparativo do ADAMS 8190V con equipos de HPLC certificados que cumpren os estándares máximos de calidade esixibles á técnica.

Resultados

O ADAMS 8190V cumpre cos criterios de calidade esixidos, e non conta con interferenzas en presenza da maioría de metabolitos estudados ou variantes de hemoglobina máis frecuentes.

Si presenta interferenzas a valores elevados de hemoglobina carbamilada (cHb).

Respecto aos equipos certificados presenta unha boa correlación con ambos, tendo algo máis de variabilidade especificamente con un deles.

Conclusiones

O equipo ADAMS 8190V presenta boas prestacións analíticas, que en conxunto cos seus menores tempos de análise, representa unha mellora neta na rutina do laboratorio clínico.

Palabras chave

Hemoglobina Glicada, Diabetes, CLSI, Evaluación de equipos, HPLC

ABSTRACT

Introduction

Verifying the analytical parameters of the different equipment present in a clinical laboratory is a crucial step towards giving quality results.

Specifically, glycated hemoglobin (HbA1c) is a very important parameter for both diagnosis and control of diabetic patients.

This study aims to verify an HbA1c HPLC analyzer, the ADAMS 8190V, that was recently incorporated into the clinical analysis laboratory, with the purpose of verifying its analytical parameters.

Methods

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guides were used in conjunction with instructions provided by the Sociedad Española de Química Clínica (SEQC) to study imprecision, veracity and linearity. The effect of relevant interferences was also studied. Finally, a comparative study between the ADAMS 8190V and previously certificated HPLC instruments was performed, to verify that the new instruments meet the quality standards required for the technique.

Results

The ADAMS 8190V meets the required quality standards and doesn't show interferences when exposed to most of the typical interferences that may affect its measuring capabilities, nor in the presence of hemoglobin variants.

It does show interferences in the presence of high fractions of carbamylated hemoglobin.

Conclusions

The ADAMS 8190V has good quality parameters, which coupled with its smaller analysis times, makes it a positive addition to the routine of the clinical analysis laboratory.

Key words

Glycated Hemoglobin, Diabetes, CLSI, Equipment verification, HPLC

2. INTRODUCCIÓN

En el laboratorio clínico es frecuente la introducción de nuevos sistemas analíticos, ya sea para sustituir equipos antiguos por otros que presentan ventajas en cuanto a prestaciones analíticas o bien para incorporar nuevas magnitudes biológicas al catálogo del laboratorio, cuya medición proporciona información clínica relevante.

Antes de ser utilizados en la práctica clínica para informar de los resultados de las muestras de los pacientes, los laboratorios clínicos deben verificar o validar dichos equipos con la finalidad de confirmar que son adecuados para las aplicaciones clínicas previstas y garantizar así la seguridad de los pacientes. La verificación o validación de los procedimientos analíticos es un requisito de la norma ISO 15189:2022. (1)

La validación consiste en la demostración, vía evidencia objetiva, de que una prueba de laboratorio nueva o modificada es apropiada para el uso específico en el diagnóstico clínico y que cumple los criterios de aceptabilidad exigidos. El término verificación se aplica a métodos analíticos ya validados, pero cuyas características deben ser confirmadas y comprobadas en el laboratorio.

Las empresas de diagnóstico *in vitro* deben garantizar las prestaciones analíticas declaradas, así como la trazabilidad e incertidumbre de los valores asignados a los calibradores. Todos estos aspectos relativos a la calidad son garantizados por el mercado *CE*, obligatorio en la Unión Europea para todos los productos utilizados en el diagnóstico *in vitro*.

Las empresas deben proporcionar información clara y completa sobre las prestaciones analíticas del procedimiento, así como información de la validación realizada; por su parte, el laboratorio debe verificar que las prestaciones informadas cumplen las especificaciones de calidad analítica previamente establecidas por el laboratorio, comprobando al menos las siguientes prestaciones en las condiciones habituales de trabajo: Imprecisión y Veracidad (sesgo).

Las sociedades científicas han publicado una serie de documentos con recomendaciones para la verificación y validación de los sistemas analíticos acorde a la norma ISO 15189

antes de poder utilizarse en la práctica clínica, a fin de garantizar que los procedimientos son adecuados para el uso previsto. Dichas sociedades también proporcionan recomendaciones sobre la documentación y registros necesarios. En este trabajo seguiremos las recomendaciones de la Sociedad Española de Medicina del Laboratorio (SEQC).

Específicamente, la SEQC^{ML}, ha publicado las recomendaciones para la validación de los procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución. (2)

En este documento se establece que las principales propiedades metroológicas que deben ser estudiadas en la validación son entre otras: Precisión, Exactitud, Veracidad, Capacidad de detección, Intervalo de medida, Selectividad y magnitudes influyentes, Contaminación por arrastre etc.

En este trabajo se evalúan las características metroológicas de un equipo de HPLC de intercambio catiónico dedicado a la medida de hemoglobina glicada (HbA1c) denominado ADAMS 8190V fabricado por Arkray (Kioto, Japón).

2.1. Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad crónica debida a una acción ineficaz de la insulina, hormona encargada de regular la glucemia, provocando una desregulación total de la misma y en consecuencia una serie de problemas fisiológicos y metabólicos.

Esta enfermedad se ha vuelto progresivamente más común a nivel mundial por la popularización del consumo de alimentos con altas cantidades de azúcar, la comida rápida y algunos alimentos procesados además del aumento del sedentarismo en nuestra rutina diaria, debido a los nuevos estilos de vida que promueven las actividades laborales más comunes. España, según datos de las recientes encuestas europeas y nacional de salud almacenados en el INE, no es una excepción a esta regla, como demuestra la *Figura 1*. (3)

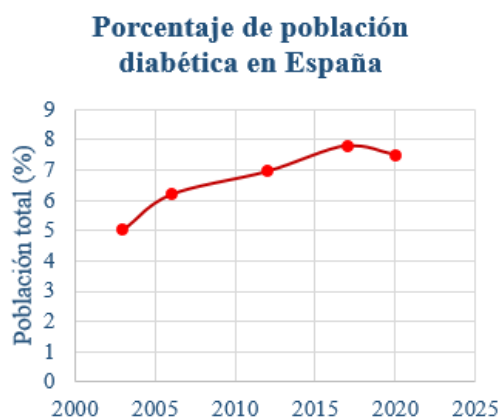


Figura 1: Prevalencia de DM en España entre los años 2000-2020 según el INE

Actualmente la DM se diagnostica utilizando los criterios aprobados por la American Diabetes Association (ADA) expuestos en la *Tabla 1*. Originalmente el diagnóstico se basaba únicamente en la glucosa sanguínea en ayunas, pero en la actualidad se ha añadido la fracción de hemoglobina glicada (HbA1c) como parámetro adicional, criterio propuesto por la ADA en 2010, y asumido por la OMS en 2011. (4)

Tabla 1: Criterios de diagnóstico de DM según la ADA

Prueba	Prediabetes	Diabetes
HbA1c (%)	5,7-6,4	≥6,5
Glucosa Plasmática en ayunas (mg/dL)	100-125	≥126
Glucosa sanguínea a las dos horas del test de tolerancia oral de glucosa (mg/dL)	140-199	≥200

El uso de la fracción de HbA1c como elemento de monitorización de DM data a 1993, cuando el *Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)* estableció este metabolito como parámetro de relevancia para el control de los pacientes diabéticos (5). Se destaca que se tiene constancia de que el aumento de este metabolito está correlacionado con la DM desde 1969, en un estudio realizado por Samuel Rahbar, en el que encontró que la HbA1c aparecía en mayores cantidades en diabéticos que en sangre de pacientes no afectados (6). Este parámetro adquirió mayor relevancia a partir de la estandarización, que permitió usarlo como criterio de control y diagnóstico de DM.

2.2. Hemoglobina glicada: formación e importancia

La hemoglobina es una proteína formada por 4 cadenas proteicas asociadas entre ellas, encargada de la retención y transporte de O₂ y CO₂, encontrada en los hematíes. Las diferentes cadenas proteicas que pueden formar de la hemoglobina dan lugar a las distintas variantes que aparecen en la naturaleza. Estas cadenas se emparejan de dos en dos para dar lugar a una sola molécula.

La hemoglobina tipo A (HbA), formada por dos cadenas α y dos β representa el 95% de la hemoglobina total humana, siendo su glicación la que se centra la mayor parte del estudio científico. La glicación con el monosacárido glucosa de HbA resulta en la

hemoglobina glicada (HbA1c), siendo este el subproducto de glicación más común, al representar alrededor del 80% de las hemoglobinas glicadas por diferentes tipos de azúcares, como puede ser la glicada con fructosa, galactosa, y otros glúcidos comunes que aparecen en el plasma sanguíneo. (7)

La glicación de la HbA transcurre a través de una serie de reacciones no enzimáticas de equilibrio con la glucosa que hay en sangre, llamada reacción de Maillard, representada en la *Figura 2*. Esta reacción tiene como base el proceso de transaminación del extremo N-terminal de las cadenas β de la HbA con la glucosa a través de un intermediario reversible, conocido como base de Schiff, para finalmente estabilizarse y dar lugar a la cetoamina conocida como producto de Amadori. Este es el producto conocido como HbA1c. Esta misma reacción se conoce sobre todo por sus aplicaciones culinarias. (8)

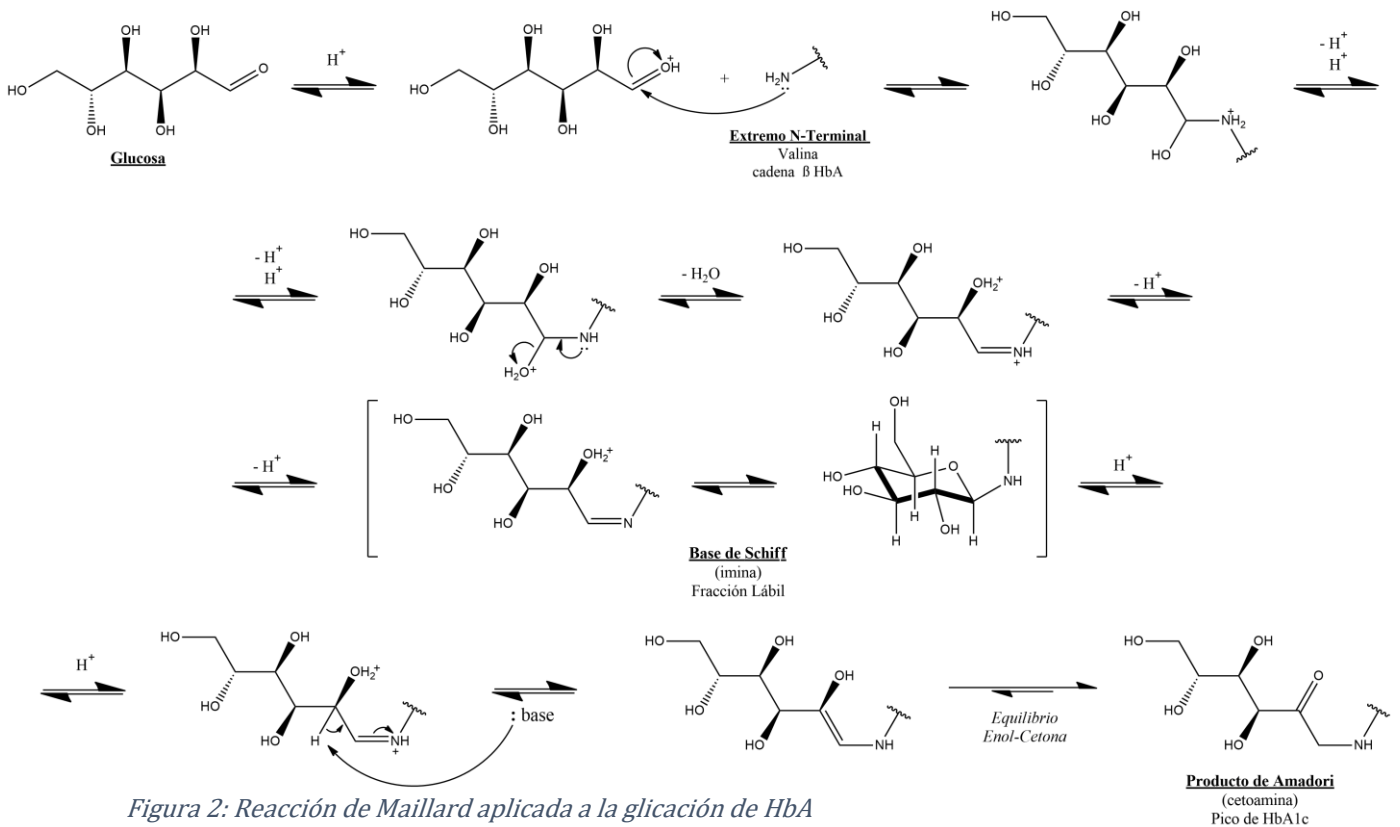


Figura 2: Reacción de Maillard aplicada a la glicación de HbA

Al ser una reacción de equilibrio, es dependiente de la concentración de glucosa que hay en sangre a lo largo del tiempo, a diferencia de en una cocina en que la acelera con el uso de altas temperaturas. Sumado a la vida media de los hematíes en sangre, que es de alrededor de 120 días, y a la estabilidad del producto final en el medio sanguíneo, la HbA1c es un parámetro extremadamente útil tanto para el diagnóstico inicial de DM

como para su seguimiento, al permitir hacer aproximaciones de la glucemia media durante períodos de tiempo prolongados, de aproximadamente 3 meses.

2.3. Otros ligandos de interés para nuestro estudio

Existen algunos ligandos que pueden interferir en la medida de la HbA1c debido a la similaridad de sus puntos isoeléctricos.

El ácido isociánico, generado por la presencia elevada de urea en sangre, consecuencia directa del fallo en la función renal de muchos pacientes con diabetes de larga duración o con mal control de esta. El isocianato se liga en la misma posición que la glucosa, dando lugar a hemoglobina carbamylada (cHb). La cHb tiene un punto isoeléctrico similar a la HbA1c, eluyendo en el mismo tiempo que esta, y dando pie a que la medida que se obtenga de HbA1c en un paciente hiperurémico no sea exacta. (9)

Otro subproducto de interés es la hemoglobina acetilada (HbAc) generada por la unión de ligandos acetilo en el lugar ya mencionado. Esta se genera por el consumo excesivo de algunos medicamentos como la aspirina (ácido acetil salicílico) o de alcohol, cuyo metabolismo genera acetato que en sangre reacciona por el mismo principio de equilibrio de las anteriores para generar HbAc. Su problemática es la misma que la de la cHb. (10)

2.4. Métodos de medida de HbA1c

En ensayos iniciales, la presencia de HbA1c se detectaba utilizando electroforesis en gel de agarosa, proceso tedioso que limitaba su utilidad en la práctica clínica. Con este objetivo, se desarrollaron diferentes técnicas que sí facilitaban su cuantificación, como el uso de HPLC, inmunoensayos o ensayos enzimáticos. Todos los métodos mencionados requieren de un hemolizado previo de la muestra para liberar la hemoglobina de los hematíes.

Uno de los métodos en uso es la HPLC con fase estacionaria con boronato. Esta utiliza las interacciones de los enlaces cis-diol presentes en la glucosa enlazada a hemoglobina con los iones de boronato presentes en la fase estacionaria de la columna. Estos análisis se realizan introduciendo la muestra en la columna y elución en dos pasos. Primero se usa un eluyente de pH básico, para que los iones boronato presentes en la columna tengan

afinidad por la HbA1c, haciendo que eluya toda la hemoglobina sin glicar. El siguiente paso usa un eluyente de pH ácido, que elimina las interacciones entre el boronato y la glucosa, eluyendo la HbA1c atrapada en la columna, haciendo posible su cuantificación. Esta técnica se utiliza hoy en día en numerosos laboratorios. (11)

La opción más habitual, es el uso de columnas de HPLC de intercambio iónico. En este caso se aprovecha la diferencia de cargas presente entre la HbA y la HbA1c para separar ambos metabolitos, usando buffers de distinto pH que permiten la elución por separado de ambas moléculas usando columnas de intercambio iónico, que contienen en su fase estacionaria iones de carga positiva o negativa. Estas retienen los distintos metabolitos que tenemos en la sangre hemolizada en base a su densidad de carga. Se suelen utilizar eluyentes con diferente pH que hacen que la hemoglobina eluya a distintas velocidades en función de si está ligada a glucosa o no.

Los métodos basados en inmunoensayo también presentan buen rendimiento. En estos se usan anticuerpos que reconocen la última secuencia de aminoácidos de la cadena β , así como el ligando de glucosa, ligándose a estos mismos. Los anticuerpos ligados pueden separarse de diferente manera de los no ligados, permitiendo medir por separado la hemoglobina glicada de la no glicada con métodos indirectos. Dependiendo del equipo, se utilizan diferentes métodos de separación:

- Turbidimetría: se utilizan anticuerpos que llevan partículas de latex ligado, y se introduce un agente aglutinante sobre estos para que precipiten. Los anticuerpos ligados a la HbA1c no están disponibles para aglutinar, posibilitando la medida de la fracción de HbA1c respecto a la Hb total, ya que a mayor concentración de la misma, menor va a ser la turbidez tras aglutinar los anticuerpos libres. (12)
- Magnetismo: existen metodologías más complejas que utilizan BMPs (*bacterial magnetic particles*) ligadas a ácido borónico, que permiten la separación de la HbA1c usando el mismo principio explicado anteriormente para el HPLC. Posteriormente las BMPs unidas a HbA1c se separan utilizando un campo magnético, para medir posteriormente su fracción respecto al total de hemoglobina. (13)

Los ensayos con enzimas siguen un principio parecido a los de anticuerpos, usando medidas indirectas (no se mide directamente el metabolito si no reacciones o procesos asociados a él), utilizando una serie de reacciones enzimáticas que dan como producto de procesado del sustrato un analito medible.

2.4.1. Ventajas y desventajas de los distintos métodos

Las principales ventajas de utilizar HPLC de cualquier tipo son principalmente la facilidad de su automatización, así como la rapidez y el bajo coste de los reactivos y equipos necesarios, así como la capacidad de evitar las interferencias por tipos de hemoglobina presentes en todos los seres humanos. Un ejemplo es la buena separación de HbF que ofrece el HPLC de intercambio iónico.

Las columnas de boronato en concreto sufren de interferencia con la HbF, no dando unos resultados equiparables a los obtenidos por otros tipos de HPLC. Si usamos intercambio iónico, el método de referencia utilizado por la IFCC, esta inconveniencia desaparece, debido a la diferencia de densidad de carga presente entre la HbF y otras hemoglobinas, pero sumamos la interferencia que pueden generar otras variantes de a hemoglobina.

Un ejemplo son los casos de la HbS, o la Petrie Salpetriere para la cual hacen falta separaciones específicas, y un estudio minucioso de los cromatogramas para poder distinguirlas. (14)

Una de las desventajas de los inmunoensayos es la imposibilidad de evitar interferencias, por las variantes de hemoglobina, ya que el reconocimiento realizado por el anticuerpo es en secuencias no alteradas en las mismas. Altas concentraciones de HbF pueden producir interferencias. Otros problemas que presenta la técnica en si son el alto coste de uso, y mayores tiempos de obtención de resultados en comparación a la HPLC. (15) Los métodos enzimáticos cuentan con la gran desventaja no contar con una alta estandarización, además de presentar una gran variabilidad en los resultados en función de las condiciones en las que se realiza el análisis.

2.4.2. Estandarización de las medidas

Durante muchos años no se utilizó la HbA1c como parámetro de diagnóstico de DM por la falta de estandarización en las metodologías utilizadas. Por este motivo, la IFCC diseñó

en 2002 un estándar de referencia para la medida de este parámetro en laboratorios clínicos, sentando las bases de su uso como parámetro de relevancia. El método diseñado utiliza HPLC acoplada a un espectrómetro de masas, y HbA y HbA1c puras, para verificar su correcto funcionamiento. Se usaron 6 controles con diferentes mezclas de ambas hemoglobinas puras a distinta fracción, con una fracción mínima del 0% y una máxima del 15%, y una cantidad total de hemoglobina de 1 mg. Para realizar el análisis, se hace una proteólisis de la hemoglobina, para obtener el hexapéptido N-terminal de las cadenas β de la glicada y la sin glicar, y clasificándolo a posteriori con el espectrómetro de masas. Como método alternativo, también se utilizó HPLC acoplada a electroforesis capilar. En ambos casos la medida se da en fracción de HbA1c respecto a la HbA total. Los dos métodos obtuvieron buenos resultados, tanto a nivel de linealidad como de reproducibilidad. (16, 17)

La IFCC recomienda usar mmol de HbA1c por a mol de HbA como unidad de medida, aunque por conveniencia se continúa utilizando la fracción de HbA1c respecto a la total.

2.4.3. Método elegido

La técnica que utilizaremos para realizar nuestros análisis y comparativas es en ambos casos la HPLC de intercambio catiónico al ser la que ofrece mejores resultados a nivel de reproducibilidad y de constancia en el tiempo, siendo una técnica con un índice de degradación muy bajo. Podemos ver un cromatograma de esta técnica en la *Figura 3*.

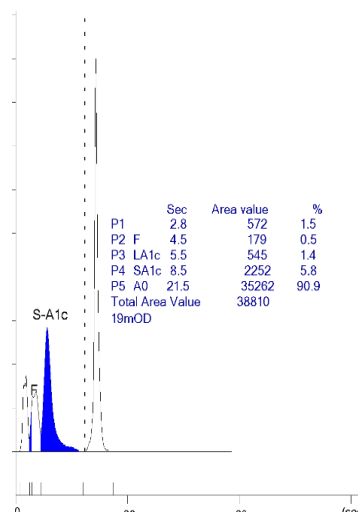


Figura 3: Ejemplo de cromatograma de intercambio catiónico

Esta técnica en específico se considera el “Gold Standard” por la *US National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), decisión ratificada por la IFCC, siendo la técnica utilizada en el estudio de estandarización de la HbA1c.

Por estos motivos, varias casas comerciales de las más importantes como *ARKRAY* o *Menarini Diagnostics* emplean esta técnica en sus analizadores de HbA1c. Cabe destacar que en vez de utilizar un detector de masas para los equipos de laboratorio de diario se suele utilizar un espectrómetro de luz visible, obteniendo la concentración y calculando la fracción de hemoglobina en base a la absorbancia de la muestra en un rango de 500-600 nm, ya que todas las variantes de hemoglobina que se pueden encontrar en un cuerpo humano tienen un pico de absorción en ese rango. (18)

3. JUSTIFICACIÓN

La norma ISO 15189 para la acreditación de laboratorios clínicos exige que se compruebe la veracidad de los procedimientos de medida en los laboratorios. A parte en España la inclusión de la ley de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en el año 2000 incluyó como requisito el seguimiento de estos procedimientos, controlados mediante auditorías a los mismos. (19) El laboratorio clínico debe asegurarse de utilizar la instrumentación adecuada por lo que debe usar solamente procedimientos validados.

Respecto a la HbA1c, los criterios de aceptabilidad se han ido endureciendo a lo largo de los últimos años, fomentando el uso de mejores técnicas y prácticas de laboratorio, con requisitos de error cada vez menores, acompañado con optimizaciones de la técnica que incluyen la disminución de los tiempos de análisis y el uso de volúmenes de muestra cada vez más pequeños.

La justificación de este trabajo se centra en la comprobación de que el equipo a introducir en el laboratorio funciona dentro de las normas y criterios recomendados por las normativas vigentes, así como para comprobar que la sustitución del equipo anterior va a presentar una mejora en el funcionamiento de la rutina del laboratorio.

4. OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo consiste en comprobar que el equipo a evaluar cumple los requisitos metrológicos necesarios para su incorporación en el procedimiento rutinario, aparte de confirmar con datos propios que los parámetros ofrecidos por el fabricante son verídicos.

Otros objetivos secundarios son:

- Evaluar si el equipo presenta una mejora neta en la capacidad y eficacia operativa del laboratorio en referencia a los equipos a sustituir.
- Comprobar que la presencia de ciertos analitos no causa interferencias en los resultados obtenidos.
- Establecer comparación con los equipos de medida en uso.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Materiales

5.1.1. Equipos

- **Arkray Adams HA-8190V**

El analizador objeto de estudio es el ADAMS A1C 8190V (ARKRAY Inc., Kyoto, Japón) es un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de intercambio catiónico dedicado a la medida de HbA1c, con capacidad para hacer 100 muestras de forma continua. Es capaz de realizar la dilución y hemólisis de las muestras automáticamente, usando una disolución hemolizante que actúa al mismo tiempo como diluyente. Este utiliza un ciclo de tres eluyentes de distinto pH para realizar los cromatogramas.



*Figura 4: Fotografía del equipo a evaluar
(ARKRAY ADAMS 8190v)*

Necesita un volumen de sangre entera de 8 μ L por determinación, con la que realiza una dilución 1:100. Esta se inyecta en la unidad de precolumna-columna y separa en base al tiempo de retención los distintos analitos presentes. Para la detección se usa un espectrofotómetro calibrado para el rango de máxima absorbancia de la hemoglobina (500-600 nm), que cuantifica las concentraciones y fracciones de cada una de las variantes que se encuentren en la muestra.

Este instrumento presenta dos diferencias respecto a sus predecesores: un sistema de precolumna integrada en la propia columna de HPLC, que actúa como filtro de la disolución que entra en el sistema para evitar contaminación en la columna, además de un relleno menos poroso de la columna, que combinado con una mayor presión del eluyente ofrece unos picos más definidos, que ayudan a evitar interferencias presentes en anteriores modelos. Su mayor definición permite acelerar el ciclo de eluyentes y en consecuencia el tiempo de análisis, que es un 50% más rápido respecto a la anterior versión del equipo, y mejorando los resultados de ambos modos de medición.

El modo *Variant* es capaz de hacer medidas de HbA1c y detectar las variantes más frecuentes de hemoglobina, que aparecerán con tiempos de retención distintos que el resto de fracciones encontradas en muestras normales. Detecta automáticamente las variantes más comunes, como la HbS, HbC, HbE o la HbD, en un tiempo total por cromatograma de 58 segundos (62 cromatogramas/h). El modo *Fast*, a diferencia del anterior, no detecta la presencia de variantes de hemoglobina, a cambio de disminuir el tiempo por cromatograma a tan solo 24 segundos (150 cromatogramas/h).

En la *Figura 5* se observa un ejemplo de cromatograma obtenido en este equipo en modo *Variant*. Entre ambos modos solo varía el tiempo de retención, así que son equivalentes.

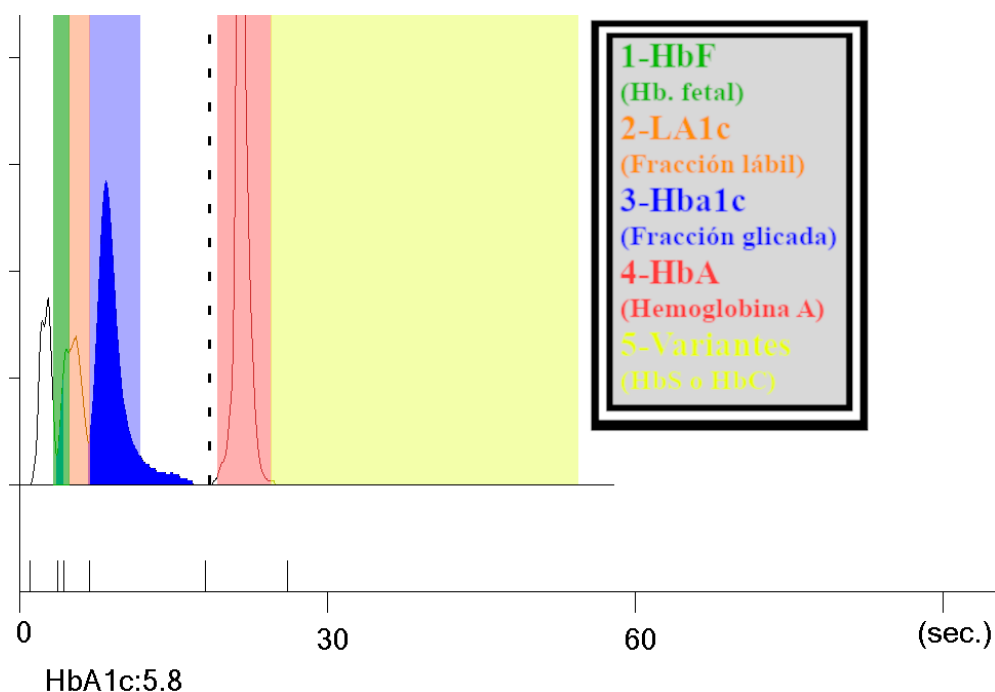


Figura 5: Cromatograma correspondiente a una muestra normal obtenido con el 8190V con las distintas fracciones identificadas

- **Arkray Adams HA-8180T**

Se trata de medidor de HbA1c mediante HPLC similar al 8190V, del mismo fabricante, que usa también una columna de intercambio catiónico, pero con un tiempo de análisis de 3,5 minutos por muestra. Su utilidad principal radica en el análisis de otras hemoglobinas, como la HbA₂ (diagnóstico de talasemias) o detectar la presencia de hemoglobinopatías. Este se usará como equipo referencia en la comparación

- **HbNEXT**

Se trata de un equipo de HPLC de intercambio catiónico fabricado por *Menarini Diagnostics* (Florencia, Italia), de características similares al ADAMS HA-8190V y es el instrumento en el que se realizan las determinaciones de HbA1c actualmente. El tiempo de análisis por muestra es de 60 segundos.

5.1.2. Muestras y reactivos



Figura 6: Tubos de muestra empleados en el análisis

Las muestras de sangre total utilizadas en este estudio se recogieron en tubos Vacutainer® que contienen AEDT como anticoagulante. La sangre se extrajo mediante punción venosa a los pacientes a los que se les solicitaba analíticas para controles de salud rutinarios. Después de realizar la analítica solicitada, las muestras de

sangre sobrantes se han utilizado para la realización de este estudio. El uso de muestras de pacientes fue autorizado por el comité de ética del hospital, incluyéndose dicho permiso en el *Anexo II*.

Los reactivos, calibradores y controles utilizados a lo largo del estudio fueron suministrados específicamente por el fabricante de cada uno de los equipos (Arkray y Menarini) y utilizados según las instrucciones y recomendaciones proporcionadas por los mismos. Otros reactivos como los viales de suero fisiológico (Braun), se obtuvieron de diferentes departamentos del laboratorio del hospital. La glucosa anhidra, acetaldehído (98%) y el cianato sódico (96%) fueron proveídos por *Sigma Aldrich*.

5.2. Diseño del estudio

Para la verificación y validación del equipo de HPLC se han seguido las recomendaciones de los siguientes organismos:

- Conjunto de normativas y recomendaciones de calidad de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica, que adapta los criterios y procedimientos de la ISO 1589 a los laboratorios españoles, manteniendo los mismos estándares de calidad. (20)

- Guías publicadas por *CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE* (CLSI), organismo que promueve la utilización de guías de consenso internacionales para garantizar y homogeneizar criterio de calidad en el laboratorio clínico.

Para orientar las pruebas de búsqueda y comprobación de interferencias, se utilizaron diferentes estudios sobre interferencias que metabolitos varios ejercen sobre los equipos de medida de HbA1c. (21, 22)

5.2.1. Imprecisión

Siguiendo las recomendaciones de la SEQC (23) se seleccionaron dos materiales de control suministrados por el proveedor, uno de ellos con valor dentro del intervalo de normalidad fisiológico pero próximo a un valor de decisión clínica y otro con un valor patológico. Se analizan por triplicado cada uno de los controles en una única serie durante 5 días y se calcula la imprecisión intraserie usando las *ecuaciones 1 y 2*.

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^2 (x_{ij1} - x_{ij2})^2}{4l}} \quad \text{Siendo } l = \text{número total de días (20 en nuestro caso)}$$

Ecuación 1: Cálculo de la desviación estándar. $j = \text{número de serie del día (la 1 o la 2)}$

$$CV_r = 100 \cdot \frac{S_r}{\bar{X}_t} \quad x_{ij1} = \text{resultado del replicado 1 de la serie } j \text{ del día } i$$

Ecuación 2: Cálculo de la imprecisión intraserie. $x_{ij2} = \text{resultado del replicado 2 de la serie } j \text{ del día } i$

Se calcula la imprecisión interserial en el laboratorio usando las siguientes expresiones, con la determinación previa de los coeficientes A y B:

$$A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (\bar{x}_{i1} - \bar{x}_{i2})^2}{2l}} \quad \text{Donde:}$$

Ecuación 4: Cálculo del coeficiente A derivado de las diferencias de los replicados diarios. $l = \text{número total de días (generalmente 20)}$
 $\bar{x}_{i1} = \text{media de los 2 replicados de la serie 1 del día } i$
 $\bar{x}_{i2} = \text{media de los replicados de la serie 2 del día } i$

$$B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (\bar{x}_i - \bar{x}_t)^2}{l - 1}} \quad \text{Donde:}$$

$\bar{x}_i = \text{media de todos los resultados del día } i$
 $\bar{x}_t = \text{media de todos los resultados}$

Ecuación 3: Cálculo del coeficiente B derivado de las diferencias diarias respecto del total.

$$s_b^2 = B^2 - \frac{A^2}{2}$$

Ecuación 7: Cálculo desviación estándar interdía.

$$s_T = \sqrt{s_b^2 + s_{rr}^2 + s_r^2}$$

Ecuación 6: Cálculo desviación estándar en el laboratorio.

$$CV_T = 100 \cdot \frac{s_T}{X_T}$$

Ecuación 5: Cálculo coeficiente de variación.

Se comparan los resultados con las especificaciones de calidad exigibles.

5.2.2. Veracidad

Se estudia el sesgo (error sistemático) utilizando materiales de control interno comerciales. Se compara la media de los resultados de cada muestra empleada en el estudio de precisión y se calcula el error sistemático utilizando el valor asignado a cada control.

$$bias \% = \frac{V_{experimental} - V_{teórico}}{V_{teórico}} \cdot 100$$

Ecuación 8: Cálculo error sistemático (bias).

Las especificaciones para el error máximo permitido suelen generarse a partir de los resultados de imprecisión (CV) y sesgo máximos permitidos respectivamente, utilizando la siguiente fórmula (24).

$$EMP = 1,65 * CV_{mp} + S_{mp}$$

5.2.3. Comparación con métodos de referencia

Cuando el laboratorio cuenta con un método de referencia verificado previamente, se compara con el método nuevo que se desea implementar, usando muestras de pacientes. Si el coeficiente de correlación $r > 0,975$ se puede también estimar el sesgo. (25)

Se seleccionaron y analizaron 120 muestras de diferentes pacientes en varias series analíticas de forma que los valores estén uniformemente distribuidos a lo largo del intervalo de medida. La comparación del equipo se realiza respecto a dos analizadores: al método de medida en vigor en nuestro laboratorio hasta ese momento (HbNEXT) y otro equipo del mismo fabricante que el del equipo objeto de estudio y que se puede considerar precursor del 8190V, el ADAMS 8180T.

El análisis de los resultados se realiza con dos métodos diferentes.

- Análisis de las diferencias: se calculan las diferencias (D_i) entre el resultado obtenido con el procedimiento evaluado (x_i) y el de comparación (y_i)

$$D_i = y_i - x_i$$

Se calcula el promedio de cada pareja de resultados : $\frac{y_i+x_i}{2}$

Se representan gráficamente las diferencias frente al promedio de ambos valores. (*Bland-Altman*)

- Regresión: se representan los valores de y_i frente a x_i empleando la misma escala calculando mediante *Passing-Bablok* los valores de la pendiente y la ordenada en el origen, así como sus intervalos de confianza. Si el coeficiente de correlación es igual o superior a 0,975 el intervalo de valores puede considerarse adecuado.

5.2.4. Linealidad

El estudio de linealidad se realizó según la guía del CLSI *EP06-AE* (26).

Para realizar la prueba se utilizan dos mezclas de sangre, uno de fracción alta de HbA1c y otro de fracción baja, realizados mezclando muestras de sangre de cada rango para obtener un volumen de 10 ml. Las concentraciones de las mezclas fueron de 16,1% para el alto y de 4,1% para el bajo.

Esta prueba requiere de unas 11 alícuotas de 1 ml, que se hacen mezclando volúmenes desde 0 a 1 ml de la sangre de fracción alta, a intervalos de 0,1 ml, y completando el resto de volumen con sangre de fracción baja. Tras preparar las alícuotas, se analizan en el 8190V directamente, y se comprueba si el valor real coincide con el valor teórico. Se realizaron 3 experimentos independientes.

El valor teórico se calcula utilizando la *ecuación 9*, que considera los volúmenes y concentraciones iniciales para calcular el valor final de concentración en un volumen determinado.

$$\frac{C_1V_1 + C_2V_2}{V_3} = C_3$$

Ecuación 9: Cálculo de nueva concentración a partir de dos disoluciones

5.2.5. Interferencias

5.2.5.1. Arrastre

Para el diseño del protocolo de esta prueba, se utilizan como guía la *EP10-A3E* y un estudio de instrumentación que incluye una secuencia de *carryover*. (22, 27) Con esta prueba se mide si al colocar sucesivamente muestras con altas fracciones de HbA1c y otras de fracción baja, existe contaminación de las segundas.

Para esta prueba se utilizan dos muestras de sangre, de las cuales conoce su fracción, al haber sido procesadas por el laboratorio ese mismo día. La muestra alta contaba con un 11,7% y la baja del 3%. Estas fueron procesadas y analizadas de forma cíclica en el 8190V siguiendo una secuencia que permite emular la aleatoriedad del procesamiento diario de muestras, alternando valores altos y bajos, que nos permiten estudiar la presencia de interferencias. La secuencia utilizada es la siguiente:

L, L, L, H, H, L, H, H, L, L, L, L, H, H, L, H, H, L, H, H, L

Pasada esta secuencia, se examinan los resultados obtenidos.

5.2.5.2. Variantes

Se comprueba que la presencia de hemoglobinas variantes como la Hemoglobina S (HbS), que aparece de forma relativamente común en entornos clínicos con población de origen africano (28), o la Hemoglobina C (HbC). El motivo de esta comprobación radica en el diferente tiempo de vida de las variantes, y en que en el propio análisis los resultados que se obtienen pre-corrección son incorrectos, ya que el pico de HbA usado solo representa parte de la hemoglobina que hay en la muestra. Se seleccionan muestras frescas con presencia de variantes en su diagnóstico, que se analizan de vuelta para obtener su cromatograma.

5.2.5.3. Hematocrito

Se comprueba si existe interferencia a distintos niveles de concentración de hemoglobina total en la medida de HbA1c. Las muestras se generan a partir del combinado de varias muestras de sangre, para obtener muestras con la misma fracción de HbA1c y diferente hematocrito. (21) Se genera una mezcla de sangre de alrededor de 20 ml combinando diversas muestras recientemente analizadas. Se divide el mismo en dos tubos de ensayo

de 10 ml, y se centrifugan durante 10 minutos a 9000 rpm, para separarlos en dos fracciones: plasmática y concentrado de hematíes. Se retira la fracción plasmática de ambos tubos usando una pipeta Pasteur y la separamos en un tubo de ensayo, haciendo lo mismo con la fracción restante.

A partir de ambas fracciones, se generan 9 alícuotas de 1 ml, añadiendo a tubos de ensayo vacíos volúmenes crecientes de concentrado de hematíes, desde 0,2 ml hasta 1 ml, completando el resto con plasma hasta llegar al volumen previamente especificado.

Las muestras se mezclan usando un agitador y se mide primero la fracción de HbA1c en el 8190V, y posteriormente la hemoglobina en un citómetro *Advia 2120 (SIEMENS)*.

5.2.5.4. Metabolitos con posibilidad de causar interferencia

Para analizar las interferencias con diversos metabolitos se ha diseñado un procedimiento estándar que permite la incubación de las muestras de sangre con reactivos capaces de modificar químicamente la hemoglobina. El primer paso consiste en la preparación de disoluciones en suero fisiológico de los reactivos de interés, con las concentraciones pertinentes para cada experimento.

Una vez preparadas las disoluciones, se genera una mezcla de sangre con muestras analizadas previamente en el mismo día de alrededor de 50 ml. Se divide la sangre en 6 alícuotas de 1 ml, y centrifugan a 9000 rpm durante 10 minutos para separar la fracción plasmática y la hemoglobina. Tras el ciclo, se extraen de cada muestra volúmenes crecientes de fracción plasmática, desde 0 (blanco) hasta 0,5 ml y los sustituimos por un volumen equivalente de la disolución preparada al principio. Cada muestra tendrá un incremento de concentración por muestra diferente, acorde a la concentración de la disolución utilizada en la misma. Se preparan 3 series de 5 muestras y un blanco para cada experimento.

Se incuban los tubos durante 2 h a 37° en un baño de agua con control de temperatura para que se generen las hemoglobinas de interés. Posteriormente introducen las muestras por el 8190V y se comprueban los resultados.

Se realizan tres pruebas con este método:

- Fracción lábil: relevante para valorar las medidas de pacientes con una alta glucemia en el momento de la extracción. (21) Corresponden a las formas parcialmente reversibles que preceden al producto de Amadori (*Figura 2*). Requiere de la preparación de 10 ml de una disolución de glucosa 2000 mg/dl. Se obtiene un rango de 100-1000 mg/dl de glucosa en muestra.
Estas concentraciones fueron comprobadas a posteriori usando un analizador *Dimension Vista (SIEMENS)*, para asegurar que las concentraciones de glucosa en sangre van acorde a las que requiere la prueba.
- Hemoglobina carbamylada (cHb): requiere de 10 ml de dos disoluciones de isocianato para dos series distintas de experimentos: una 10 mmol/l y otra 20 mmol/l. Se obtiene un rango de 0-10 mmol/l de isocianato en muestra en una prueba y de 0-5 mmol/l en la otra.
- Hemoglobina acetilada (HbAc): requiere de 10 ml de disolución de acetaldehído 20 mmol/l. Se obtiene un rango de 0-10 mmol/l del mismo en muestra.

5.2.6. Comparativa *Fast-Variant*

Para comprobar el efecto del modo de análisis sobre los resultados, se procesan 107 muestras de pacientes por el modo habitual de trabajo, el modo *Variant*, cuyo tiempo de análisis por muestra es de 58 segundos y posteriormente se analizan esas mismas muestras en el modo *Fast*, cuyo tiempo de análisis por muestra es de 24 segundo. Tras procesarlas, se tabulan los resultados para realizar el análisis estadístico.

Se estudia la diferencia de medias entre ambos modos de análisis usando el estadístico de t de Student para datos apareados así como el grado de concordancia diagnóstica entre ambos equipos mediante el coeficiente *Kappa de Cohen*, categorizando previamente a los pacientes como normales, prediabéticos o diabéticos acorde a su nivel de HbA1c.

5.3. Equipos y programas adicionales

Las determinaciones de glucosa y concentración de hemoglobina se realizaron con el equipamiento y métodos del departamento de urgencias del laboratorio de análisis clínicos del CHUS. Las figuras que implican mecanismos de reacción se hicieron con *ChemDraw Ultra 12.0*.

5.4. Análisis estadístico

Las herramientas estadísticas que hemos utilizado para procesar nuestros resultados han sido las siguientes:

- Diferentes funciones estadísticas del programa *Microsoft Office Excel* (versión 365) para los análisis más sencillos (líneas de tendencia y organizado de datos).
- Una suite de programas estadísticos de código abierto programados en *R* y disponibles online para aquellos más complejos (*Bland-Altman*) capaz de proveer informes detallados de todos los parámetros necesarios. (29)

Para realizar estadísticas adicionales se utiliza el programa *SPSS v20*, tanto para correlaciones como para hacer los test de *Kappa-Cohen*.

6. RESULTADOS

6.1. Precisión y veracidad

La *Tabla 2* muestra los resultados del coeficiente de variación total, el sesgo y el error total obtenidos.

Tabla 2: Resultados de las pruebas de variabilidad

Muestra	Valor control (%)	CV total (%)	Sesgo (%)	Error total (%)
Control bajo	5,5	0,91	0,18	1,68
Control alto	10,8	0,58	0,37	1,33

En ambos casos los valores de error total no superan el máximo permitido por la Sociedad Española de Química Clínica (3,3%). Se considera por tanto que el equipo cumple los criterios de aceptabilidad asumidos por el laboratorio.

6.2. Linealidad

En la *Figura 7* aparece la recta de calibrado que hemos realizado para medir la linealidad del equipo, una recta con 11 puntos con fracciones de HbA1c desde 4,1% hasta 16,1%, que se utiliza para asegurar que el equipo mide correctamente en el rango de concentraciones que aparecen a diario en un laboratorio clínico.

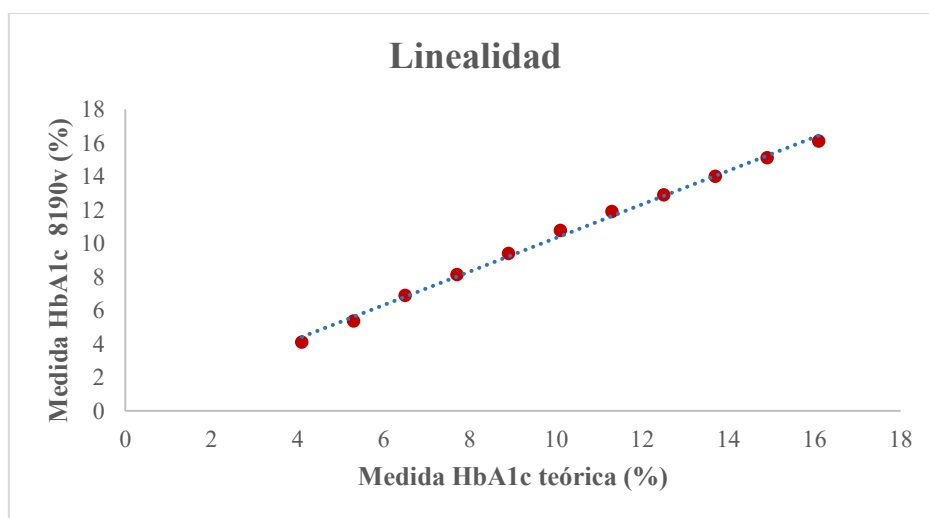


Figura 7: Correlación entre valores teóricos y valores medidos en el estudio de linealidad

Se hicieron 3 repeticiones de cada muestra, y se representa la media de los replicados.

La pendiente de la recta de calibrado resultante es de 1,002, con un R^2 de 0,9966, implicando que los valores teóricos y los obtenidos son coincidentes.

La IFCC establece como criterio que el error total para la linealidad no ha de superar el 10% para una fracción de 6,7% de HbA1c, por lo que teniendo en cuenta el rango de nuestra prueba y los resultados obtenidos, se ve que en ningún momento llegamos a ese punto de error.

6.3. Comparación de métodos

6.3.1. Comparación con el Hb NEXT

En la *Figura 8* se muestra la regresión *Passing-Bablok* que compara ambos instrumentos, en un rango de fracciones entre 4,1% y 14,2% usando muestras de 110 pacientes. Los resultados del análisis se encuentran en la *Tabla 3*.

Tabla 3: Valores estadísticos de la recta Passing-Bablok comparando el NEXT con el 8190V

Parámetro	Intervalo de Confianza	
Ordenada en origen	0,02	De -0.07 a 0.11
Pendiente	0,99	De 0,97 a 1.01

La ecuación regresión entre ambos equipos es: $y = 0,99 x + 0,02$ con $r = 0,998$

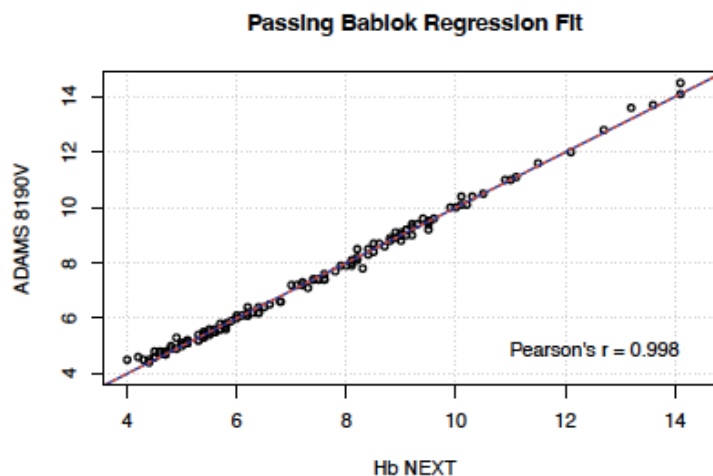


Figura 8: Regresión Passibg-Bablok de la comparativa de los equipos NEXT-8190V

Para comprobar si existe algún tipo de sesgo en las medidas de un equipo respecto al otro, se utiliza el diagrama de *Bland-Altman* que aparece en la *Figura 9*. Se observa una gran dispersión entre las medidas de ambos equipos, más frecuentes en valores bajos. Se tiene como prueba de la misma una diferencia entre ambas medias de 0,02.

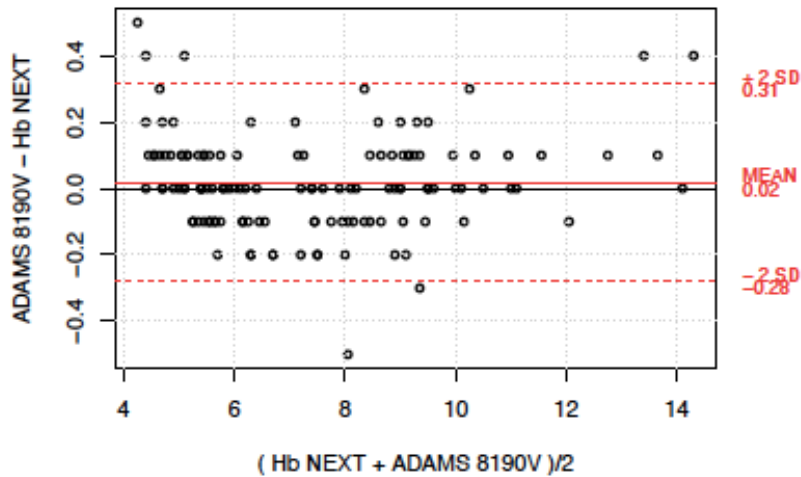


Figura 9: Gráfica de Bland-Altman comparando el Hb-NEXT y el 8190V

Ambas gráficas en conjunto demuestran que existe un sesgo en el *NEXT* al alza sobre todo en valores bajos, sin embargo, analizando los resultados junto con los parámetros estadísticos se concluye que ambos equipos producen resultados equiparables.

6.3.2. Comparación con el 8180T

El análisis estadístico utilizado para esta comparación es el mismo que para el del punto 5.1.4.2 con resultados mostrados en las Figuras 10 y 11. En la Tabla 4 se ven los resultados estadísticos de la regresión *Passing-Bablok*.

Tabla 4: Valores estadísticos de la recta *Passing-Bablok* comparando el 8180T con el 8190V

Parámetro		Intervalo de Confianza
Ordenada en origen	0,13	De 0,08 a 0,18
Pendiente	0,99	De 0,98 a 1,00

La ecuación regresión entre ambos equipos es: $y = 0,99 x + 0,13$ y $r = 0,999$

La correlación es mejor que la anterior, probablemente debido a que son equipos de la misma casa comercial y por lo tanto se basan por los mismos principios y software, actualizado en el equipo nuevo para obtener mejores resultados. Por lo general se observan intervalos de confianza mucho menores que en el anterior, además de unos errores sustancialmente menores, especialmente respecto a la pendiente de la recta.

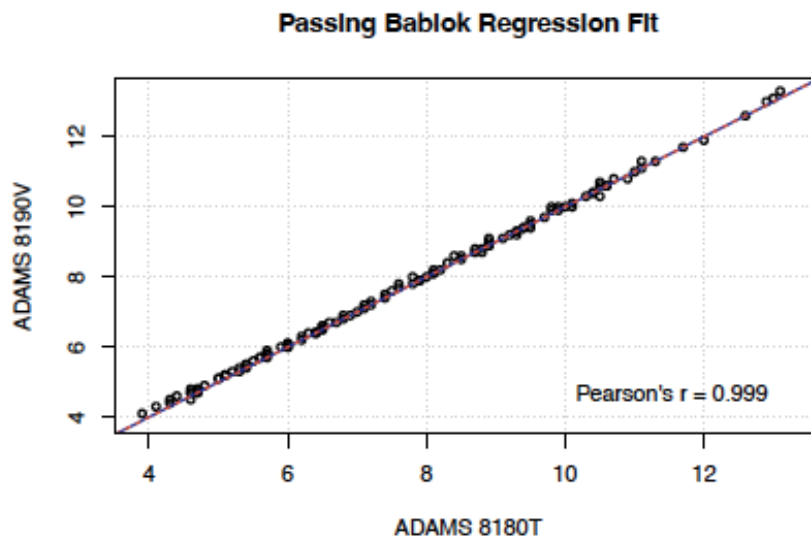


Figura 10: Regresión Passing-Bablok de la comparativa de los equipos 8180T-8190V

En relación con el gráfico de *Bland-Altman* de la *Figura 11*, la distribución observada es extremadamente uniforme en todo el rango estudiado. La distribución de puntos muestra un sesgo al alza en todo el rango de resultados, que se explica a primera vista por las medidas ligeramente superiores que ofrece el 8190V como vemos en la recta anterior, que sitúa los puntos correspondientes a sus medidas de forma constante por encima de la recta de calibrado.

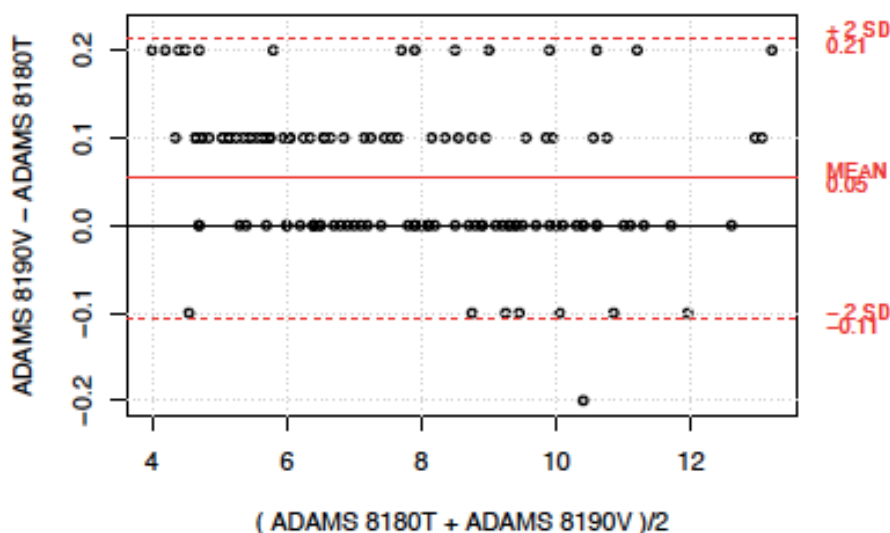


Figura 11: Gráfica de *Bland-Altman* de la comparativa de los equipos 8180T-8190V

Se concluye por lo tanto pese a las diferencias presentes, que ambos equipos son equiparables al 8190V en términos de medición.

6.4. Interferencias

6.4.1. Arrastre

No se detectó ninguna variación en la muestra de fracción baja tras pasar varias muestras de alta, teniendo un CV de 0,27% y de 1,7% para las muestras de fracción alta y baja respectivamente, a parte de una recta de calibrado de pendiente prácticamente 0. El análisis se realizó por triplicado, usando las medias de los replicados para obtener los resultados. Se concluye que no hay interferencia por arrastre.

6.4.2. Variantes

Los cromatogramas que aparecen en la *Figura 12* muestran una separación buena de la hemoglobina variante. La diferencia de tiempo de emisión de cromatograma no es significativa como para representar una ventaja, al ser dos segundos más rápido el 8190V. Sin embargo la capacidad de que el software sea capaz de detectar que tipo de variante aparece en la muestra, facilita enormemente a los facultativos deducir ante que tipo de patología o paciente se pueden encontrar. Con el equipo anterior se requiere una prueba extra específica para variantes que tarda en torno a 6 minutos en producir un resultado, gastando tiempo y recursos en una medición que el 8190V produce directamente con una única prueba.

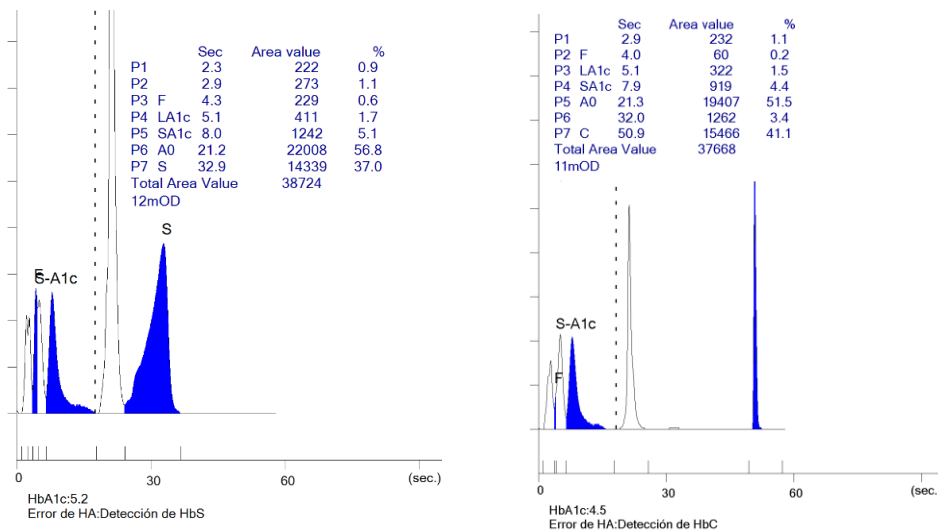


Figura 12: Cromatogramas correspondiente a muestras con HbS (izquierda) y HbC (derecha)

En conclusión, el 8190V no presenta interferencias con variantes HbS y HbC. No se encontraron en el período de muestreo muestras de hemoglobina D y hemoglobina E para incluir en este estudio.

6.4.3. Hematocrito

En la *Figura 13* se representa la gráfica que compara la medida de HbA1c que nos da el equipo a distintas concentraciones de hemoglobina.

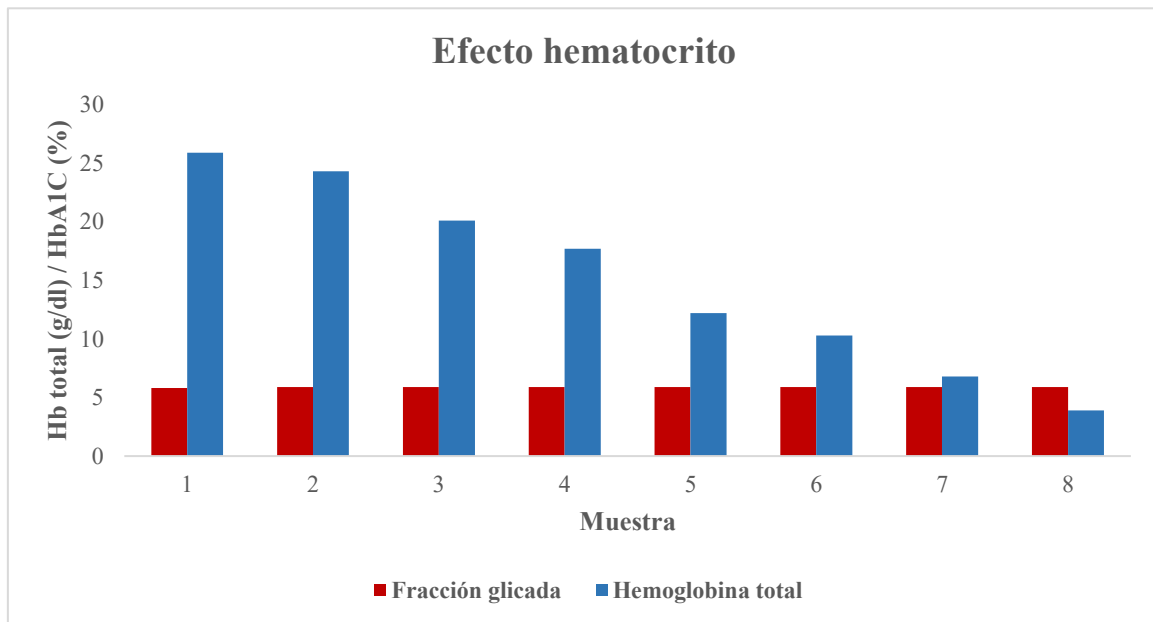


Figura 13: Variación de la medida de la fracción de HbA1c a diferentes concentraciones de hemoglobina

Se observa que la fracción de HbA1c se mantiene constante independientemente de la concentración de hemoglobina, pero cabe destacar que puede existir interferencia en caso de concentraciones de hemoglobina muy bajas o altas. Esto es debido al método de cálculo de la fracción de HbA1c del equipo, que consiste en comparar el tamaño de pico de la HbA1c respecto al del de HbA, haciendo que las medidas extremas puedan ser problemáticas al tener demasiada (o demasiado poca) concentración en el pico correspondiente a la hemoglobina como para hacer una medida fiable. En base a los resultados obtenidos, no presentan variaciones significativas, teniendo un coeficiente de variación del 0,5%.

Se concluye que el hematocrito no genera interferencias para la medida de interés.

6.4.4. Metabolitos con posibilidad de interferencia

6.4.4.1. Fracción Lábil

En la *Figura 14* se observa que no hay variación en la medida de HbA1c a distintas fracciones de formas lábiles.

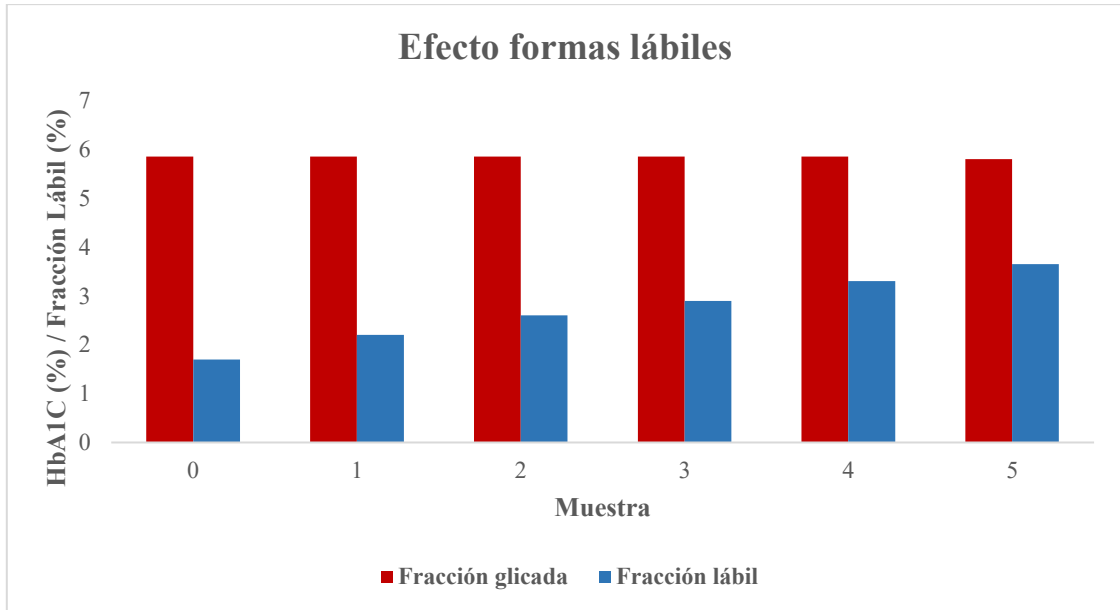


Figura 14: Variación de la medida de HbA1c respecto a diferentes fracciones de formas lábiles

En la Figura 15 se observan dos cromatogramas con distinta fracción lábil. El pico de esta corresponde al de un tiempo de retención de 5 s, indicado en la propia leyenda como LA1c, mientras que el de la HbA1c es a 7,6 s, que gracias al empaquetado de la columna da una buena separación. Sin embargo, el pico correspondiente a la HbF se ve afectado por este aumento de formas lábiles, siendo difícil de medir a altas fracciones, debido al solapamiento de ambos picos, que produce medidas de fracción lábil incorrectas.

No se observan variaciones significativas en la medida (CV=0,34%) por lo que las formas lábiles no generan interferencia en la medida de HbA1c.

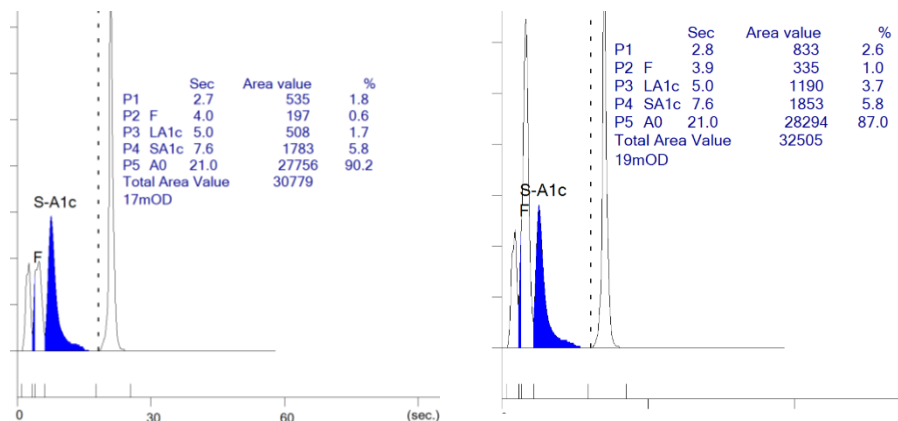


Figura 15: Cromatogramas a diferente fracción de formas lábiles (1,7% izquierda y 3,7% derecha)

6.4.4.2. Carbamilada

En la *Figura 16*, que nos muestra varios cromatogramas con concentraciones crecientes de isocianato.

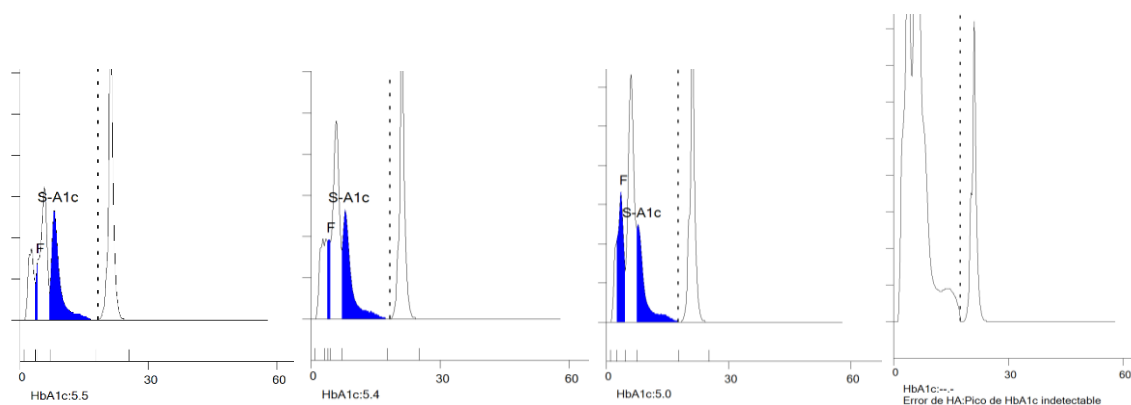


Figura 16: Cromatogramas con fracciones crecientes de cHb (1-4 mmol/l de izquierda a derecha)

Comparando el pico correspondiente a la hemoglobina carbamilada en comparación con otros cromatogramas que hemos expuesto previamente, vemos que el pico correspondiente a esta está demasiado pegado al de la HbA1c, empezando a solaparse con el mismo a concentraciones más elevadas de isocianato a partir de 3 mmol/l, y dando error ya en 4 mmol/l.

Tanto en la prueba de 0-10 mmol/l (creciente en 2 mmol/l) como en la de 0-5 mmol/l (creciente 1 mmol/l) el equipo muestra variaciones significativas en la medida a partir de 2 mmol/l, apareciendo la primera interferencia en 3 mmol, y a partir de 4 mmol/l da error debido a la imposibilidad de separar el pico del de la HbA1c. El resto de resultados medidos antes del que podemos considerar como punto de interferencia son iguales o equivalentes al de la muestra sin adulterar.

Se concluye que si que existe interferencia por cHb a partir de 2 mmol/l.

6.4.4.3. Acetilada

En la *Figura 17* se representa la fracción de HbA1c respecto a diferentes concentraciones de acetaldehído en sangre. Se analizaron tres tandas de muestras con las mismas concentraciones, mostrándose en el gráfico la media de los tres replicados.

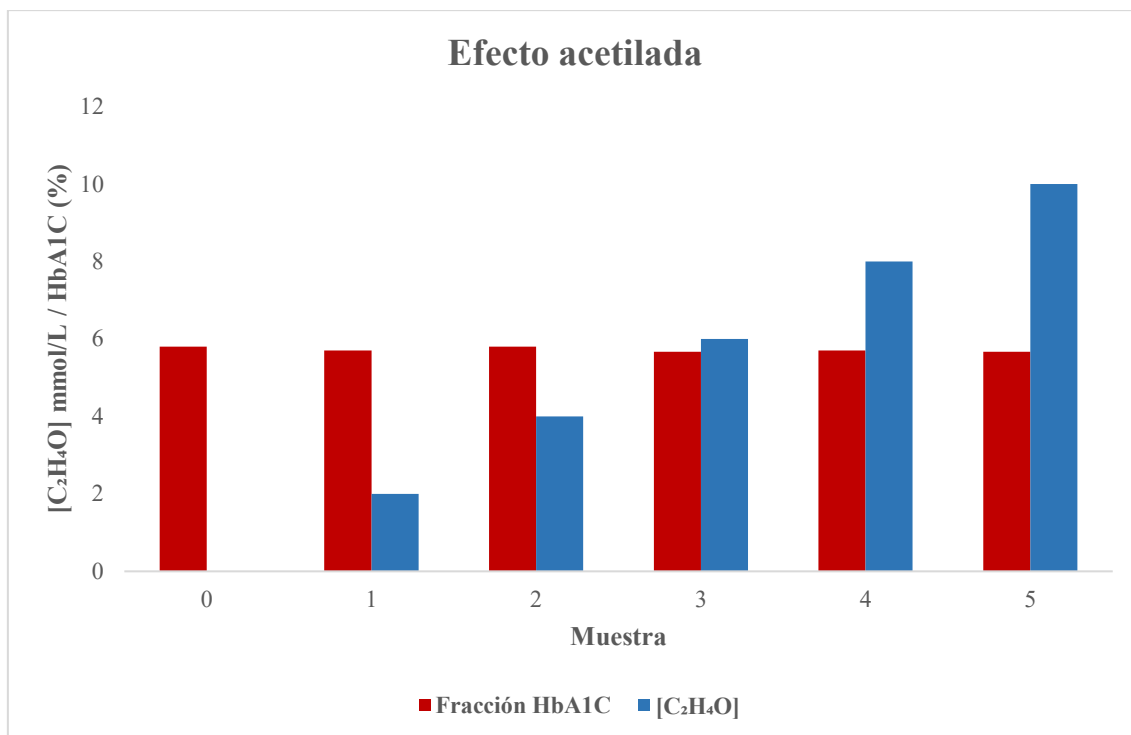


Figura 17: Medida de HbA1c respecto a concentraciones crecientes de acetaldehído

La medida de HbA1c se mantiene constante independientemente de las fracciones de HbAc presentes, sin variaciones notables y un CV= 1%.

La independencia de estas medidas se puede achacar a cuestiones técnicas del equipo objeto de estudio, que como se ve en la *Figura 18*, cuenta con una resolución de picos suficientemente grande como para poder separar ambos, gracias a un mayor empaquetamiento en la columna y una mayor presión del eluyente. Esta mayor resolución permite separar el pico de la HbA1c y el de la HbAc pese a su proximidad.

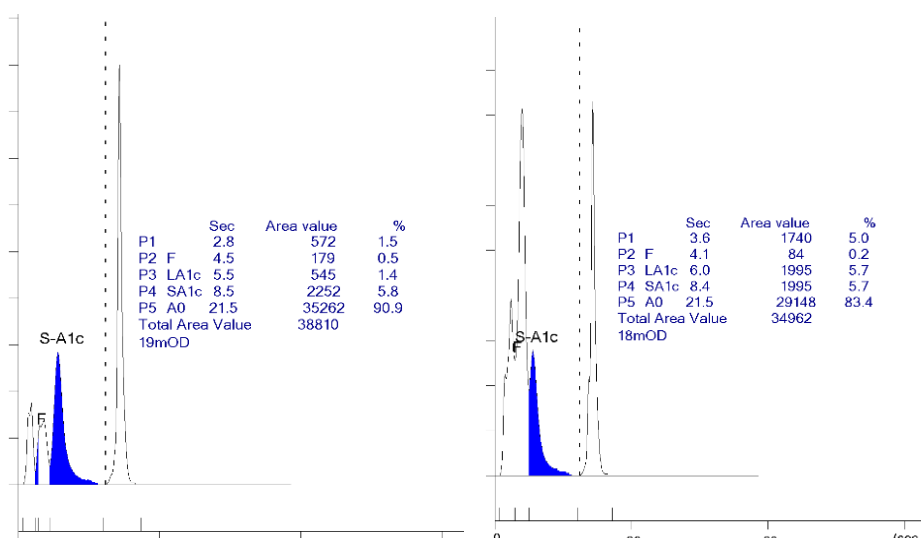


Figura 18: Cromatogramas con fracción creciente de HbAc (0 y 10 mmol/L)

Se concluye que el equipo no presenta interferencias por la presencia de la hemoglobina acetilada.

6.5. Comparativa *Fast/Variant*

En este caso, utilizamos 107 muestras recién extraídas y seleccionadas de forma aleatorias. En la *Tabla 5* se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de la regresión de *Passing-Bablock* después de analizar las muestras en ambos modos de análisis.

Tabla 5: Regresión de Passing-Bablock comparando el modo Fast y el modo Variant

Parámetro		Intervalo de confianza
Ordenada en origen	0,099	0,033 - 0,163
Pendiente	0,998	0,977 - 0,999

La ecuación de regresión resultante es: $y=0,998x + 0,099n$ ($r=0,998$)

El estadístico t de Student (*Tabla 6*) para muestras relacionadas indica que no hay diferencias significativas entre las medias de los resultados obtenidos por ambos métodos de análisis.

Tabla 6: Datos estadísticos del test de t de Student

Modo de análisis	N	Media	p
<i>Fast</i>	107	6,03	n.s
<i>Variant</i>	107	6,00	n.s

Las diferencia de medias no es significativa en base al valor p obtenido. En base a esto, se concluye que no existe diferencia entre ambos modos de análisis.

Después de clasificar a los pacientes como normales (HbA1c <5,7%), prediabéticos (HbA1c: 5,7-6,4) o diabéticos (HbA1c ≥6,5), aplicando el test estadístico kappa de Cohen se obtiene un valor de kappa de 0,923.

En la *Tabla 7* se muestran los resultados y se observa que de un total de 36 pacientes clasificados inicialmente como normales por el modo *Variant* 3 son clasificados como prediabéticos por el modo *Fast* y 2 prediabéticos de un total de 54 pasan a clasificarse ahora como diabéticos. La clasificación en el historial como prediabético/diabético, o la

mera consideración de un paciente como prediabético depende de una variación de 0,1 en los rangos de HbA1c.

Tabla 7: Resultados del test de Kappa de Cohen

Método de medida		Modo Variant			Total
		Diabético	Normal	Prediabético	
Modo Fast	Diabético	17	0	2	19
	Normal	0	33	0	33
	Prediabético	0	3	52	55
	Total	17	36	54	107

Cabe destacar que estos errores en los límites son normales en cualquier modo de medición, ya que los equipos obtienen la medida con dos decimales pese a que solo den el resultado con uno, ello forma parte de la variabilidad normal de los métodos analíticos.

7. DISCUSIÓN

La información que proporciona el laboratorio clínico impacta de forma directa en las decisiones de los profesionales clínicos y es por ello que debe asegurar la calidad de los estudios que se realicen. El laboratorio clínico solamente debe usar métodos de medida verificados y validados para informar los resultados de los análisis que realiza a los pacientes. En este estudio describimos la evaluación de un equipo de HPLC de intercambio catiónico, uno de los métodos de medida de HbA1c más habitual dentro de los laboratorios clínicos debido a la calidad de sus resultados, baja imprecisión, facilidad de manejo, automatización y robustez del método analítico.

Desde la estandarización de la HbA1c por parte de la IFCC, ha habido una mejora sustancial de su calidad analítica como parámetro, tanto respecto a la comparación de resultados obtenidos por diferentes métodos de medida como sus aspectos analíticos, gracias a la exigencia de coeficientes de variación analíticos cada vez más bajos, que obligan a las empresas de diagnóstico a mejorar los métodos de medida para cumplir con los objetivos de calidad exigidos para la comercialización de sus equipos.

El equipo evaluado muestra una excelente precisión, los CVs obtenidos para los dos niveles de control analizados en ambos son muy inferiores a 2,1%, considerado como deseable. (30)

Para el cálculo del sesgo, hemos utilizado los controles comerciales, tomando como referencia el valor asignado al control debido a que no disponemos de material certificado, lo que sin duda es una debilidad del estudio, aunque nuestros resultados son similares a evaluaciones donde si se usaba este tipo de materiales.

Referente al error total, la SEQC adopta los criterios de la EFLM para la HbA1c, considerando como objetivo deseable que el error total de la medida, es decir, el error máximo permitido sea inferior al 3,3%, en base a las especificaciones de calidad analítica de la SEQC de 2024 (31). Este analizador cumple sobradamente con las especificaciones de calidad exigibles al método de medida de HbA1c tanto a nivel normal como a nivel patológico.

En las medidas realizadas en las muestras de los pacientes la magnitud del error es desconocida pero siempre debe ser menor a un máximo permitido, fijado previamente en el 3,3% para la HbA1c, para garantizar que el resultado de la medición sea válido para la toma de decisiones clínicas. El error máximo permitido se refiere al error total de medida que incluye la imprecisión y el sesgo y especifica por tanto la exactitud requerida para el procedimiento de medida. La utilización de la HbA1c como parámetro diagnóstico de diabetes, exige por parte del método de medida una elevada exactitud y un error total bajo; cuanto menor sea la inexactitud y menor el error total, mejores serán sin duda las propiedades metrológicas del equipo.

El estudio de comparación utilizando muestras de pacientes del ADAMS 8180V con el HbNEXT muestra una buena correlación entre ambos equipos aunque la gráfica de dispersión muestra que la variabilidad aumenta a medida que aumenta la concentración, es decir, la distancia de los puntos a la línea de identidad aumenta a medida que aumenta la concentración en el eje x. Dado que el intervalo de confianza para la ordenada en el origen incluye el valor 0 se puede concluir que no hay un error sistemático constante ni error sistemático proporcional ya que el intervalo de confianza de la pendiente incluye el valor 1.

El gráfico de *Bland-Altman* para la comparación de ambos equipos muestra una diferencia media entre las medidas de ambos equipos de 0,02%, con resultados más bajos en el ADAMS 8190V, sin embargo, los límites de concordancia entre ambos equipos son amplios (-0,28, +0,31) lo que implica una baja precisión de uno o ambos métodos. Esa imprecisión es atribuible fundamentalmente al HbNEXT, cuyas características metrológicas son claramente inferiores a las del ADAMS 8190V.

Mejores resultados obtenemos al comparar el ADAMS 98190V con otro equipo del mismo fabricante, aunque más antiguo, el ADAMS 8180T. La concordancia entre ambos equipos es excelente, tal como demuestra el coeficiente de correlación ($r=0,999$) así como la coincidencia entre la línea de identidad y la resultante de la correlación. Similares conclusiones se extraen al observar el gráfico de *Bland-Altman*; la media de las diferencias es 0,05% pero el intervalo del límite de concordancia es menor (-0,11, +0,21)

que el obtenido en el HbNEXT, además de ser constante a lo largo de todo el intervalo de medición.

La comparación en ambos casos es satisfactoria lo que indica que el equipo podrá sustituir directamente a cualquiera de los equipos con los que se ha comparado para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes.

Un aspecto importante a tener en cuenta a la hora de adoptar un determinado método analítico son las posibles interferencias. Una de las fortalezas de este método de medida es la capacidad de reportar resultados fiables en presencia de los interferentes más comunes. Nosotros hemos estudiado las interferencias más comunes esperables en un laboratorio de un hospital terciario como el nuestro, donde se reciben muestras de pacientes de distintas especialidades abarcando un amplio abanico de patologías de base y por tanto un amplio rango de posibles interferentes tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo.

A pesar de que el tiempo de análisis por muestra es de sólo 58 segundos hay una buena regeneración de la columna entre análisis consecutivos, no se detecta contaminación por arrastre cuando se analizan consecutivamente muestras de elevada y baja concentración; las medidas tampoco se ven afectadas por el hematocrito, lo cual permite garantizar la calidad de los resultados de HbA1c en un laboratorio donde se reciben muestras de pacientes con un amplio rango de hemoglobina, desde anemia severa hasta eritrocitosis.

Las formas lábiles son formas parcialmente reversibles que preceden al producto de Amadori (*Figura 2*). Es relevante para valorar las medidas de pacientes con una alta glucemia en el momento de la extracción. En este analizador la medida de HbA1c no se afectada incluso a altas concentraciones de formas lábiles, sin embargo, el pico correspondiente a la HbF se ve afectado, llegando a solaparse ambas fracciones. Este fenómeno está estudiado, y sucede en pacientes con mal control glucémico o en el debut diabético, dando lugar en algunos analizadores a una ligera interferencia en la medida de HbA1c.

Las hemoglobinas carbamilada y acetilada se forman por modificación química de la hemoglobina y son posibles interferentes a la hora de medir HbA1c.

La hemoglobina acetilada se puede detectar tras el consumo de alcohol o ácido acetilsalicílico en cantidades abusivas. Sin embargo, elevadas concentraciones de HbAc, muy superiores a las esperables, no interfieren en la medida de HbA1c.

La hemoglobina carbamilada se forma por reacción de la hemoglobina con el isocianato, un derivado de la urea. Esta nueva especie química puede alcanzar concentraciones significativas en los pacientes con insuficiencia renal aguda, particularmente en aquellos sometidos a diálisis, donde se suelen alcanzar concentraciones de urea muy elevadas. Nuestros resultados indican que concentraciones de hemoglobina carbamilada superiores a 4% interfieren en la determinación de HbA1c. Estos resultados entran en contradicción con los estudios previos (21), donde se indica que no hay interferencia significativa en la medida de HbA1c hasta concentraciones de Hb carbamilada de 6,3%, sin embargo, nuestros datos si se alinean con otros estudios (32) donde se describen interferencias significativas a partir de 3,4% de Hb carbamilada. Estas concentraciones de Hb carbamilada si pueden alcanzarse en algunos pacientes con enfermedad renal avanzada, afectando por tanto a la medida de HbA1c. Otro problema sobradamente conocido y quizás más importante que afecta a la interpretación clínica de los resultados de HbA1c en los pacientes con enfermedad renal es vida media de los hematíes. La enfermedad renal afecta al recambio de las células sanguíneas, acortando significativamente la vida los hematíes por lo que en estos pacientes el resultado de HbA1c siempre debe ser interpretado con cautela, con independencia de que pudieran sumarse el efecto de interferencias en la medida realizada en el laboratorio.

Este analizador, según el fabricante, detecta e identifica las variantes más frecuentes de Hb (S, C, D, E). Durante el tiempo de evaluación del equipo hemos comprobado en nuestro laboratorio que identifica correctamente la HbS y la HbC así como alerta de la presencia de otras variantes diferentes de las anteriores, pero no hemos recibido ningún paciente con variante D o E. La importancia de utilizar métodos de análisis que identifiquen aquellos pacientes con variantes de hemoglobina radica en que la mera

presencia de variantes afecta a la vida media de los hematíes y por tanto a la interpretación clínica de la HbA1c.

Una característica de este analizador es la posibilidad de trabajar en modo *Variant* o en modo *Fast* que, según indica en fabricante, no detecta la presencia de variantes ya que el cromatograma se reduce a 28 segundos por muestra. En muestras analizadas previamente en modo *Variant*, descartando por tanto la presencia de variantes, hemos comprobado que los resultados de ambos modos de análisis son perfectamente intercambiables; en ninguna de las muestras la diferencia entre los resultados de ambos modos fue superior a 0,1%, error considerado aceptable y atribuible a la variabilidad intrínseca de cualquier método de medida.

La posibilidad de analizar con seguridad 150 muestras/hora es importante en nuestro laboratorio donde diariamente se reciben más de 1000 solicitudes de HbA1c. La rapidez del analizador supondría una ventaja importante respecto a otras alternativas, siempre y cuando estemos seguros de la ausencia de variantes.

Nota adicional

Un resumen de este trabajo se presentará en el XIX Congreso Nacional del Laboratorio Clínico que se celebrará en Valencia del 12 al 14 de noviembre de 2025. Esta solicitud se puede ver en el *Anexo II*.

8. CONCLUSIONES

Conclusiones

El equipo de HPLC ADAMS 8190V cumple sobradamente con las especificaciones de calidad analítica exigibles por el laboratorio para la medida de HbA1c.

La linealidad, baja imprecisión y bajo error total se mantienen a lo largo del amplio intervalo de medida estudiado.

No se evidencian interferencias significativas por efectos de hematocrito, formas lábiles, arrastre, o la presencia de hemoglobina acetilada.

Se observa interferencia negativa en el resultado de HbA1c por la presencia de elevadas fracciones de hemoglobina carbamilada.

La reducción de los tiempos de análisis no altera la calidad de los resultados.

Conclusión

O equipo de HPLC ADAMS 8190V cumple sobradamente coas especificacións de calidade analítica esixibles polo laboratorio para a medida de HbA1c.

A linealidade, baixa imprecisión e baixo error total mantéñense en todo o amplo intervalo de medida estudado.

Non se evidencian interferenzas significativas polos efectos do hematocrítico, formas lábiles, arrastre, ou a presenza de hemoglobina acetilada.

Observase interferenza negativa no resultado de HbA1c pola presenza de elevadas fraccións de hemoglobina carbamilada.

A redución dos tempos de análise non altera a calidade dos resultados.

Conclusions

The HPLC instrument ADAMS 8190V significantly overcomes the specifications and requisites of analytical quality that the laboratory standard requires for HbA1c measurements.

Linearity, low imprecision and low total error are kept on the wide range of HbA1c fractions used in the study.

There is no evidence of significant interferences caused by the presence of different hematocrits, labile forms, acetylated hemoglobine or by carryover.

Negative interference on the measurement can be observed in the presence of high fractions of carbamylated hemoglobin.

Reductions in analysis time don't alter the quality of the results given by the instrument.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Internacional de Normalización. (s.f.). *International Organization for Standardization*. Recuperado el 16 de mayo de 2025, de <https://www.iso.org>
2. Rigo Bonnin R, Canalias Reverter F, Esteve Poblador S, Gella Tomás FJ, González de la Presa B, López Martínez R. Validación de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución. *Rev Lab Clin* 2018;11:39-46.9
3. Instituto Nacional de Estadística. (s.f.). Encuesta de población activa. Resultados. Recuperado el 16 de mayo de 2025, de https://www.ine.es/dyngs/INEbase/es/operacion.htm?c=Estadistica_C&cid=1254736176784&menu=resultados&idp=1254735573175
4. American Diabetes Association (ADA). (2009). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus . *Diabetes Care*, 32 (Suppl.1), 62-67.
5. Rahbar, S., Blumenfeld, O., & Ranney, H. M. (1969). Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and biophysical research communications*, 36(5), 838-843.
6. Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. (1993). The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*, 329(14), 977-986.
7. Peñuela, O. A. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*, 36(3), 215-225.
8. Chandalia, H. B., & Krishnaswamy, P. R. (2002). Glycated hemoglobin. *Current science*, 1522-1532.
9. Szymezak, J., Lavalard, E., Martin, M., Leroy, N., & Gillery, P. (2009). Carbamylated hemoglobin remains a critical issue in HbA1c measurements. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 47(5), 612-613.
10. Aragón, C., Miquel, M., Correa, M., & Sanchis-Segura, C. (2002). Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones*, 14.
11. Li, Q., Lu, C., Li, H., Liu, Y., Wang, H., Wang, X., & Liu, Z. (2012). Preparación de una columna monolítica de afinidad de boronato híbrido de sílice orgánica para la captura y separación específicas de compuestos que contienen cis-diol. *Journal of Chromatography A*, 1256, 114–120.
12. John, W. G. (1996). Hemoglobin A1c measurement: new precise immunoassay method involving latex particle agglutination. *Clinical chemistry*, 42(11), 1874-1875.
13. Tanaka, T., & Matsunaga, T. (2001). Detection of HbA1c by boronate affinity immunoassay using bacterial magnetic particles. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(9-12), 1089-1094.
14. Rohlifing, C. L., Connolly, S. M., England, J. D., Hanson, S. E., Moellering, C. M., Bachelder, J. R., & Little, R. R. (2008). The effect of elevated fetal hemoglobin on hemoglobin A1c results: five common hemoglobin A1c methods compared with the IFCC reference method. *American journal of clinical pathology*, 129(5), 811-814.

15. Lepe Balsalobre, E., Varo Sánchez, G. M., Rico Rodríguez, M., & Fuentes Cantero, S. (2024). Falso valor de HbA1c debido a la variante inusual hemoglobina Petie Salpetriere coheredada con talasemia alfa. *Advances in Laboratory Medicine/Avances en Medicina de Laboratorio*, 5(4), 451-454. 013
16. Jeppsson, J. O., Kobold, U., Barr, J., Finke, A., Hoelzel, W., Hoshino, T., ... & Weykamp, C. (2002). Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood.
17. Mosca, I. F. O. C. C. A. L. M. I. I. S. D. W. G. O. S. O. H. W. H. A., Goodall, I., Hoshino, T., Jeppsson, J. O., John, W. G., Little, R. R., ... & W. Weykamp, C. (2007). Global standardization of glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group.
18. Van Kampen, E. J., & Zijlstra, W. G. (1983). Spectrophotometry of hemoglobin and hemoglobin derivatives. *Advances in clinical chemistry*, 23, 199-257.
19. *Boletín Oficial del Estado*. (2000, 20 de julio). Real Decreto 1215/1997, de 18 de julio, sobre disposiciones mínimas de seguridad y salud para la utilización por los trabajadores de los equipos de trabajo. BOE-A-2000-15060.
20. F. Canalias Reverter, B. Boned Juliani, S. Esteve Poblador, FJ. Gella Tomás, B. González de la Presa, S. Izquierdo Álvarez, R. López Martínez, C. Macías Blanco, R. Rigo Bonnin, N. Serrat Orús . Estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. *Documento técnico SEQC*. Revisado y confirmado por última vez en 2022
21. Urrechaga, E. (2023). Analytical evaluation and quality assessment of the ARKRAY ADAMS A1c HA-8190V for Hb A1c. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 83(2), 136-142.
22. John, W. G., Little, R., Sacks, D. B., Weykamp, C., Lenters-Westra, E., Hornsby, T., ... & English, E. (2015). Multicentre evaluation of the Premier Hb9210 HbA1c analyser. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 53(2), 319-327.
23. Gella Tomás, F. J., Álvarez Domínguez, L., Blanco Font, A., Boned Juliani, B., Canalias Reverter, F., Fernández Fernández, P., et al. (2021). *Verificación y validación de los procedimientos analíticos en los laboratorios clínicos. Recomendación (2019)*. Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC-ML).
24. Sociedad Española de Medicina de Laboratorio (SEQC-ML), Comité Científico, Comisión de Metrología y Sistemas Analíticos, & Comisión de Calidad Analítica. (2018). *Establecimiento de especificaciones para la exactitud de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Recomendación (2018)*. SEQC-ML.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). *EP09-A3: Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline—Third edition*. CLSI.
26. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2003). *EP06-A: Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach; Approved guideline*. CLSI

27. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). *EP10-A3-AMD: Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI.
28. Organización Mundial de la Salud. (2006). Anemia falciforme: Informe de la Secretaría (A59/9). Recuperado el 25 de abril de 2025, de https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/wha59/a59_9-sp.pdf
29. Bahar, M. A. (s.f.). Method comparison [Aplicación web]. ShinyApps. Recuperado el 27 de marzo de 2025, de https://bahar.shinyapps.io/method_compare/
30. Braga, F., Dolci, A., Montagnana, M., Pagani, F., Paleari, R., Guidi, G. C., ... & Panteghini, M. (2011). Reevaluation of biological variation of glycated hemoglobin (HbA_{1c}) using an accurately designed protocol and an assay traceable to the IFCC reference system. *Clinica Chimica Acta*, 412(15-16), 1412-1416.
31. Sociedad Española de Medicina de Laboratorio. (2024). *Especificaciones de la calidad analítica: Bioquímica 2024* (DOC-08 BIO Rev. 02). <https://biologicalvariation.eu/>
32. van der Hagen, E. A. E., Leppink, S., Bokkers, K., Siebelder, C., & Weykamp, C. W. (2020). Evaluation of the ARKRAY HA-8190V instrument for HbA_{1c}. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 59(5), 965–970. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1300>

Anexo II: Solicitud de presentación de poster

XIX Congreso Nacional de Laboratorio Clínico 2025		Fecha de envío	20/06/2025	
		Hora de envío	09h26	
<i>Información de la persona de contacto</i>				
Nombre	Javier			
Apellido/s	Rodríguez García			
Centro de trabajo	Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela			
Población centro de trabajo	Santiago de Compostela			
Email	javier.rodriguez.garcia@sergas.es			
<i>Resumen del envío</i>				
Número de referencia	527			
Título:	Evaluación del HPLC ADAMS 8190V para la medida de hemoglobina glicada			
Tema:	07. Evaluación de métodos e instrumentos e interferencias			
Tipo de comunicación:	Comunicación científica (póster)			
Autor(es)	Iago Carballo Fernández, María De Los Angeles Gómez García, Martín Fernández Díaz, Juan B. Ortolá Devesa, Javier Rodríguez García			
Centros	Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela			
Palabras clave:	HbA1c, evaluación, diabetes			
<i>Texto:</i>				
Introducción.				
<p>En el laboratorio clínico es frecuente la introducción de nuevos sistemas analíticos, ya sea para sustituir equipos antiguos por otros con mejores prestaciones analíticas o bien para incorporar nuevas magnitudes biológicas al catálogo de laboratorio. Antes de ser utilizados en la práctica clínica para informar los resultados de las muestras de los pacientes, los laboratorios clínicos deben verificar o validar dichos equipos para confirmar que son adecuados para las aplicaciones clínicas previstas a fin de garantizar la seguridad de los pacientes. La verificación o validación de los procedimientos de medida es un requisito de la norma ISO 15819 (1).</p>				
Objetivos.				
<p>Verificar las prestaciones analíticas del equipo de HPLC Arkray 8190V en condiciones de repetibilidad y en condiciones intermedias así como la veracidad mediante la comparación con otro procedimiento de medida contrastado. Estudiar las interferencias más comunes que pueden afectar a los resultados de HbA1c.</p>				
Material y métodos.				
<p>Los analizadores utilizados fueron el ARKRAY 8190V y el ARKRAY 8180T (Kioto, Japón) cuyos calibradores y controles, suministrados por Arkray, se utilizaron siguiendo sus recomendaciones. Para los estudios de repetibilidad se utilizaron dos controles propios del equipo, uno de nivel normal y otro patológico. Para la comparación de equipos o estudio de interferencias se utilizaron muestras de pacientes, previo dictamen favorable del comité de ética de nuestro hospital. Los protocolos seguidos para este estudio son los recomendados por la SEQC (2).</p>				
Resultados.				
<p>En la tabla se muestran los resultados del estudio de variabilidad utilizando controles comerciales.</p>				
	Valor asignado	CV total(%)	Sesgo (%)	Error total (%)
Control Normal	5,4	0,91	0,18	1,68
Control Elevado	10,8	0,58	0,37	1,33
<p>El estudio de regresión entre el 8180T y el 8190V utilizando 120 muestras de pacientes según Passing-Bablok obedece a la siguiente ecuación: $y = 0,99x + 0,13$ ($r=0,999$).</p> <p>El gráfico de Bland-Altman en esas mismas muestras indica un sesgo de +0,05% (-0,11, +0,21) respecto al 8180T. Se estudiaron posibles interferencias debidas a: arrastre, valores altos o bajos de hematocrito, presencia de formas lábiles, hemoglobina acetilada y hemoglobina carbamilada. No se observan interferencias significativas en las condiciones habituales de análisis en ninguno de los factores estudiados, a excepción de la hemoglobina carbamilada. Concentraciones de hemoglobina carbamilada superiores a 3% aproximadamente, interfieren negativamente en la medida de HbA1c.</p>				
Conclusión.				
<p>El Arkray 8190V cumple sobradamente con las especificaciones de calidad analítica exigibles por el laboratorio para la medida de HbA1c. No se evidencian interferencias significativas debidas a arrastre, variación de hematocrito, presencia de formas lábiles o hemoglobina acetilada. Se observa interferencia en la medida de HbA1c debida a elevadas concentraciones de hemoglobina carbamilada, si bien, en los pacientes en los que pudiera observarse este efecto, la interpretación clínica del valor de HbA1c estaría previamente comprometida debido a la alteración en la vida media de los hematias.</p>				
<i>Bibliografía:</i>				
<p>1- Roelofsen-de Beer, R. Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing ISO 15189:2012 demands for method verification and validation.</p> <p>2- Documento de la SEQC 2021. Verificación y validación de procedimientos analíticos en los laboratorios clínicos. Recomendación (2019). Sociedad Española de Medicina de Laboratorio. Comité Científico.</p>				
<i>Al proceder con el envío usted ha respondido como sigue a las siguientes declaraciones:</i>				
<p>Envío este trabajo manifiesto ser su autor o disponer de su autorización expresa y acreditable al efecto, eximiendo a los Organizadores del Congreso o a quienes lo gestionen en su nombre, en caso que el mismo, en su totalidad o en parte, fuera contrario a derechos de propiedad intelectual de terceros. En caso de trabajos realizados por dos o más autores, manifiesto disponer de la autorización expresa de los co-autores para la remisión del trabajo.</p> <p>Autorizo a que mi trabajo entregado por este medio, en caso de ser aceptado por el comité del Congreso, sea publicado en el formato elegido por las sociedades organizadoras del Congreso, cediendo gratuitamente los derechos de puesta a disposición, reproducción y distribución necesarios a este fin.</p> <p>Si</p>				