



# Equacions de transformació de resultats d'hemoglobina glicada $A_{1c}$ del sistema de referència IFCC a valors traçables als sistemes d'estandardització japonès i nord-americà

Eduard Clot Silla

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**EQUACIONS DE TRANSFORMACIÓ DE  
RESULTATS D'HEMOGLOBINA GLICADA A<sub>1c</sub>  
DEL SISTEMA DE REFERÈNCIA IFCC A VALORS  
TRAÇABLES ALS SISTEMES  
D'ESTANDARDITZACIÓ JAPONÈS I NORD-  
AMERICÀ**

**TESI DOCTORAL**

**EDUARDO CLOT SILLA**

**2012**

Tesi Doctoral preparada sota la responsabilitat del Departament de Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona i realitzada al Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Dirigida per la Dra. Pilar Rosel Soria i tutoritzada per la Dra. Encarnación Capilla Campos. Programa de Doctorat en Fisiologia.

**EQUACIONS DE TRANSFORMACIÓ DE  
RESULTATS D'HEMOGLOBINA GLICADA A<sub>1c</sub>  
DEL SISTEMA DE REFERÈNCIA IFCC A VALORS  
TRAÇABLES ALS SISTEMES  
D'ESTANDARDITZACIÓ JAPONÈS I NORD-  
AMERICÀ**

---

**Eduardo Clot Silla**

---

**Dra. Pilar Rosel Soria**

---

**Dra. Encarnación Capilla Campos**

*“Esforça’t en el teu quefer  
com si de cada detall que penses,  
de cada paraula que dius,  
de cada peça que poses,  
de cada cop de martell que dónes,  
en depengues la salvació de la humanitat.  
Perquè en depèn, creu-me.”*

*Joan Maragall*

*Poeta català*

**Als meus pares,**

**Lluís, que em veu des de l'altra riba, i Carme, que  
sempre està present.**

**A l'Elena, la meva llum.**

**A tota la meva família i amics,  
sense ells, jo no sóc res.**

## AGRAÏMENTS

En primer lloc, vull expressar la meva gratitud a la Dra. Pilar Rosel, directora d'aquest treball i que sempre m'ha animat a mirar endavant. Per la seva inestimable ajuda científica, suport i estímul constant. Per la seva sinceritat i autenticitat, més que una directora de tesi, una amiga.

Al Dr. Miguel Ángel Navarro Moreno, per acceptar des del primer moment realitzar aquesta Tesi Doctoral al seu Departament.

A les Doctores Maria Àngels Gallardo i Encarnación Capilla, del Departament de Fisiologia de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, pel seu incommensurable esforç per tirar endavant aquest treball.

A la Dra. Emilia Pérez del Laboratori Clínic Just Oliveras, que desinteressadament em proporcionava aquelles mostres que no aconseguia trobar al meu laboratori i que eren crucials per a aquest treball.

A Alberto Diego i Antonio Cayuela, de Menarini Diagnósticos. Per tenir aquesta fe cega en mi i en aquest treball i per proporcionar desinteressadament els recursos necessaris per a que aquesta aventura arribés a bon port.

A la Dra. Marta Banqué Navarro, del Servei de Medicina Preventiva de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Per la seva inestimable col·laboració en el desenvolupament estadístic d'aquest treball. Si alguna cosa he après d'estadística en aquests anys, ha estat gràcies a tú.

A tot el personal tècnic i d'infermeria del Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge. No tinc paraules per expressar l'agraïment per tot el suport, ajuda i somriures que m'heu brindat durant aquests anys. Com que no tinc paraules accepteu, si us plau, aquest humil moltes gràcies.

A tots els pacients afectats de diabetis. És per totes aquestes persones anònimes que aquest treball té sentit.

## CONTINGUT

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Introducció.....                                                                        | 1  |
| 1.1. Diabetis Mellitus.....                                                                | 1  |
| 1.2. Epidemiologia.....                                                                    | 1  |
| 1.3. Tipus i classificació de diabetis mellitus.....                                       | 4  |
| 1.3.1. Diabetis mellitus tipus 1.....                                                      | 7  |
| 1.3.2. Diabetis mellitus tipus 2.....                                                      | 8  |
| 1.3.3. Diabetis gestacional.....                                                           | 8  |
| 1.4. Complicacions de la diabetis.....                                                     | 9  |
| 1.4.1. Complicacions agudes.....                                                           | 9  |
| 1.4.1.1. Cetoacidosi diabètica.....                                                        | 9  |
| 1.4.1.2. Estat hiperglucèmic hiperosmolar.....                                             | 11 |
| 1.4.2. Complicacions cròniques.....                                                        | 13 |
| 1.5. Diagnòstic de la diabetis mellitus.....                                               | 14 |
| 1.5.1. Ressenya històrica i recomanacions actuals.....                                     | 14 |
| 1.5.2. Altres proves de control glucèmic.....                                              | 19 |
| 1.5.2.1. Proves de cetona en orina.....                                                    | 19 |
| 1.5.2.2. Proteïnes sèriques glucosilades.....                                              | 20 |
| 1.6. Estudis DCCT i UKPDS.....                                                             | 20 |
| 1.6.1. Estudi DCCT.....                                                                    | 21 |
| 1.6.2. Estudi UKPDS.....                                                                   | 27 |
| 1.7. Paper de la hiperglucèmia en les complicacions de la diabetis.....                    | 29 |
| 1.8. Hemoglobina glucosilada.....                                                          | 32 |
| 1.8.1. Definició química.....                                                              | 34 |
| 1.8.2. Nomenclatura i unitats.....                                                         | 34 |
| 1.8.3. Formació de l'hemoglobina glucosilada.....                                          | 35 |
| 1.8.4. Significat i utilitat clínica de l'hemoglobina glucosilada.....                     | 36 |
| 1.8.5. Mètodes de mesura de l'hemoglobina glucosilada.....                                 | 37 |
| 1.9. Programes nacionals d'estandardització de mesures d'hemoglobina A <sub>1c</sub> ..... | 39 |

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.9.1. Primeres iniciatives d'estandardització.....                                                       | 39 |
| 1.9.1.1. Japanese Diabetes Society/Japanese Society of Clinical Chemistry (JDS/JSCC).....                 | 40 |
| 1.9.1.2. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).....                                     | 42 |
| 1.9.1.3. Programa d'estandardització suec.....                                                            | 43 |
| 1.10. Estandardització global de mesures d'hemoglobina glucosilada.....                                   | 44 |
| 1.10.1. Mètode de referència de la IFCC per a la mesura d'hemoglobina A <sub>1c</sub> .....               | 44 |
| 1.10.2. Sistema de referència de la IFCC.....                                                             | 46 |
| 1.10.3. Relació numèrica entre el mètode de referència i els esquemes nacionals d'estandardització.....   | 48 |
| 1.10.4. Consens internacional d'estandardització de mesures d'hemoglobina A <sub>1c</sub> .....           | 49 |
| 1.10.5. Consens nacional d'harmonització de resultats d'hemoglobina A <sub>1c</sub> a Espanya.....        | 50 |
| 1.11. Relacions matemàtiques entre hemoglobina A <sub>1c</sub> y concentració de glucosa.....             | 51 |
| 1.11.1. Concentracions mitjanes estimades de glucosa.....                                                 | 51 |
| 1.12. Utilitat de la mesura de les concentracions basals de glucosa.....                                  | 53 |
| 1.13. Problema pràctic en les equacions de transformació de resultats d'hemoglobina A <sub>1c</sub> ..... | 54 |
| 2. Objectius.....                                                                                         | 55 |
| 3. Material i mètodes.....                                                                                | 56 |
| 3.1. Obtenció de les equacions de transformació de resultats.....                                         | 56 |
| 3.1.1. Disseny de l'estudi.....                                                                           | 56 |
| 3.1.2. Analitzadors.....                                                                                  | 56 |
| 3.1.2.1. Calibració dels analitzadors.....                                                                | 57 |
| 3.1.3. Control intern de la qualitat.....                                                                 | 58 |
| 3.1.4. Mostres.....                                                                                       | 60 |
| 3.1.5. Mètodes estadístics.....                                                                           | 60 |

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Estudi de la relació entre glucosa mitjana estimada y concentració de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores.....                                                            | 61 |
| 3.2.1. Mostres.....                                                                                                                                                                       | 61 |
| 3.2.2. Analitzadors.....                                                                                                                                                                  | 62 |
| 3.2.3. Càlcul de la concentració de glucosa mitjana estimada (GME)....                                                                                                                    | 62 |
| 3.2.4. Anàlisi de dades.....                                                                                                                                                              | 62 |
| 3.3. Estudi de la relació entre la mitjana de les concentracions basals de glucosa i la proporció d'hemoglobina glicada.....                                                              | 63 |
| 3.4. Estudi de la capacitat diagnòstica del grau de control metabòlic de les equacions de transformació i de la concentració basal de glucosa enfront l'hemoglobina A <sub>1c</sub> ..... | 64 |
| 4. Resultats i discussió.....                                                                                                                                                             | 66 |
| 4.1. Equació de transformació de resultats IFCC a JDS/JSCC.....                                                                                                                           | 66 |
| 4.1.1. Control intern de la qualitat.....                                                                                                                                                 | 66 |
| 4.1.2. Resultats de les mostres.....                                                                                                                                                      | 68 |
| 4.1.3. Regressió lineal simple y equació de transformació de resultats.....                                                                                                               | 69 |
| 4.2. Equació de transformació de resultats IFCC a NGSP.....                                                                                                                               | 74 |
| 4.2.1. Control intern de la qualitat.....                                                                                                                                                 | 74 |
| 4.2.2. Resultats de les mostres.....                                                                                                                                                      | 76 |
| 4.2.3. Regressió lineal simple y equació de transformació de resultats.....                                                                                                               | 76 |
| 4.3. Comparació de resultats obtinguts amb les diferents equacions.....                                                                                                                   | 82 |
| 4.3.1. Comparació de resultats JDS/JSCC de l'analitzador amb els proporcionats per l'equació obtinguda en el present estudi.....                                                          | 83 |
| 4.3.2. Comparació de resultats JDS/JSCC de l'analitzador amb els proporcionats per l'equació prèviament publicada.....                                                                    | 84 |
| 4.3.3. Comparació de resultats NGSP de l'analitzador amb els proporcionats per l'equació obtinguda en el present estudi.....                                                              | 85 |
| 4.3.4. Comparació de resultats NGSP de l'analitzador amb els proporcionats per l'equació prèviament publicada.....                                                                        | 86 |
| 4.4. Relació entre la glucosa mitjana estimada i la concentració de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores.....                                                                   | 87 |
| 4.5. Estudi de la relació entre la mitjana de les concentracions basals de glucosa i la proporció d'hemoglobina A <sub>1c</sub> .....                                                     | 92 |

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.5.1. Equació de transformació utilitzant valors IFCC transformats a NGSP amb l'equació prèviament publicada.....                    | 92  |
| 4.5.2. Equació de transformació utilitzant valors IFCC transformats a NGSP amb l'equació desenvolupada en el present estudi.....      | 95  |
| 4.6. Estudi de la capacitat diagnòstica de la mesura de la concentració basal de glucosa respecte l'hemoglobina A <sub>1c</sub> ..... | 98  |
| 5. Conclusions.....                                                                                                                   | 103 |
| 6. Bibliografia.....                                                                                                                  | 104 |
| Apèndix 1.....                                                                                                                        | 116 |

## **1. INTRODUCCIÓ**

### **1.1. DIABETIS MELLITUS**

La diabetis mellitus es pot definir com un conjunt de malalties i trastorns metabòlics el nexa comú dels quals és la presència de concentracions de glucosa en sang persistentment elevades per sobre de l'interval de referència<sup>(1)</sup>.

### **1.2 EPIDEMIOLOGIA**

La diabetis mellitus és una malaltia de distribució mundial i, degut a la seva mortalitat i morbiditat associades, ha esdevingut un greu problema de salut a nivell mundial.

La Organització Mundial de la Salut, va estimar que l'any 2000 hi havia aproximadament 171 milions de persones afectades i estima que l'any 2030 podria haver més de 360 milions de persones diabètiques al món. Tenint en compte que les estimacions anteriors preveien 154 milions d'afectats<sup>(2)</sup> per a l'any 2000, es creu que es podria superar la xifra de 360 milions d'afectats el 2030, degut a un augment de l'envelliment de la població i a que, probablement, les prevalences d'obesitat i sedentarisme no disminuiran<sup>(3)</sup>. Aquestes dades varien depenent de les característiques de l'estudi epidemiològic considerat ja que segons la International Diabetes Federation, en les seves estimacions per a l'any 2003 va predir 194 milions d'afectats y 334 milions de malalts l'any 2025<sup>(4)</sup>.

En l'epidemiologia de la diabetis mellitus, l'edat és un dels factors més importants a tenir en compte. De fet, en la figura 1 es pot observar una estimació de la prevalença de diabetis segons edat i sexe. De forma general, es pot afirmar sense gaire marge d'error, que la prevalença és similar entre homes i dones tot i que és lleugerament superior en homes. No obstant, en arribar a edats superiors als 60 anys, hom pot observar que aquesta tendència s'inverteix i la prevalença és lleugerament superior en dones. L'explicació a aquest fenomen és senzilla ja que, en la majoria de poblacions, existeix un nombre més elevat de dones que d'homes en edats avançades i, a més, cal sumar-hi l'efecte de l'augment de la incidència de diabetis mellitus amb l'edat.

En els països desenvolupats (figura 2), l'augment de la prevalença de diabetis seria menor que en països en vies de desenvolupament i prendria especial rellevància l'augment de diabètics amb edat superior a 65 anys, el nombre aproximat dels quals

podria arribar a duplicar-se. És més, la millora constant en la supervivència de les persones en els països desenvolupats, és un factor important de cara a l'augment de la prevalença d'aquesta malaltia<sup>(5)</sup>.

L'augment més pronunciat de prevalença tindria lloc, com s'ha comentat anteriorment, en països en vies de desenvolupament (figura 3). En aquests països, el nombre de diabètics que s'estima que hi hauria seria més del doble del que tenen en l'actualitat.<sup>(3)</sup>

Globalment, doncs, la previsió és d'un augment important de pacients diabètics al món per l'any 2030, aproximadament el doble dels pacients afectats a l'any 2000 segons es mostra a la figura 4. No obstant, els països en vies de desenvolupament, contribuirien de forma més important a aquest augment.

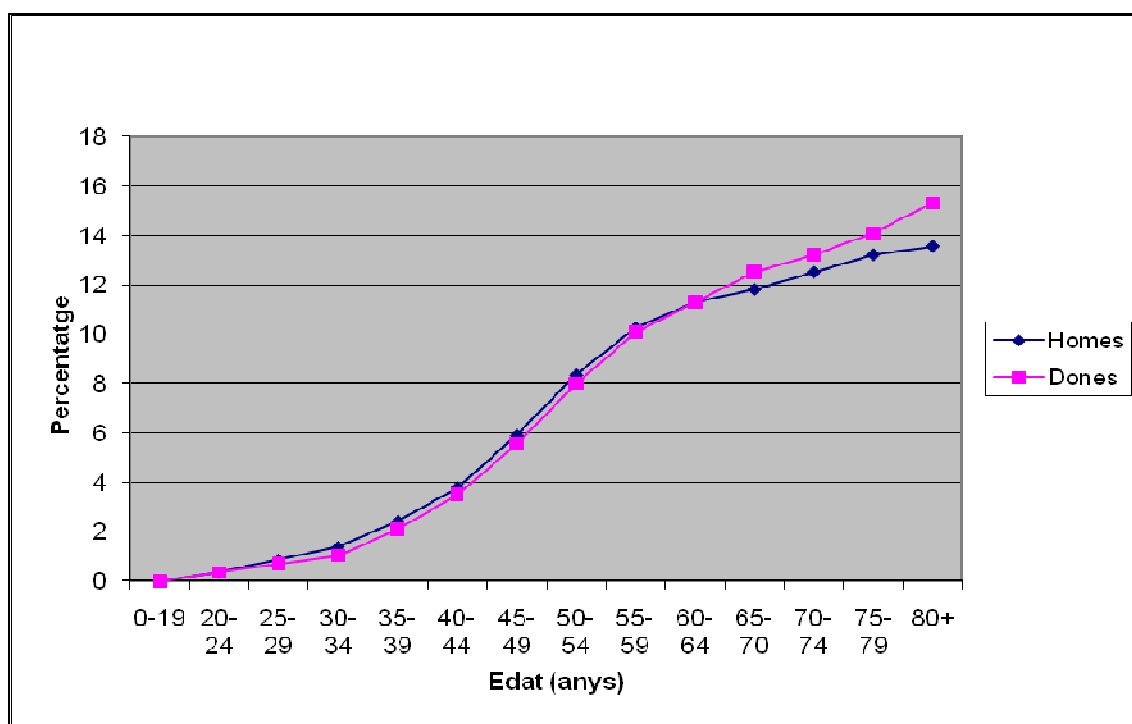


Figura 1. Prevalença de diabetes mellitus segons edat i sexe l'any 2000. (Adaptat de: Wild et al, 2004, ref. 3).

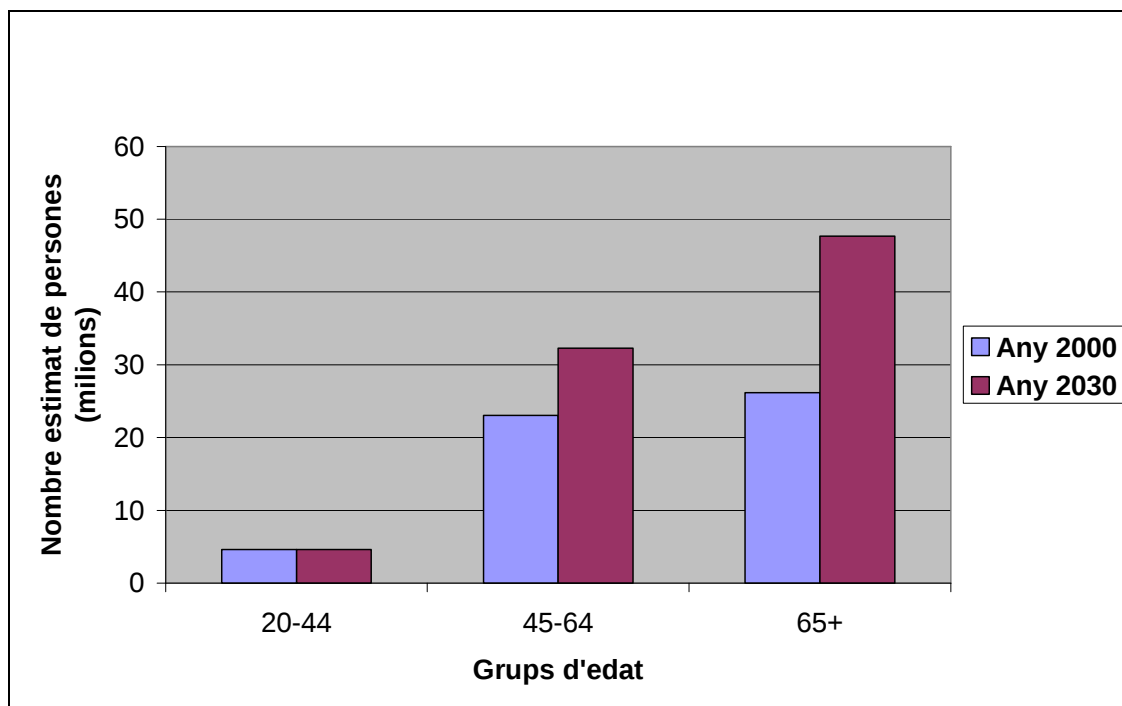


Figura 2: Estimació de prevalença de diabetes per l'any 2030 en països desenvolupats. (Adaptat de: Wild et al, 2004, ref. 3).

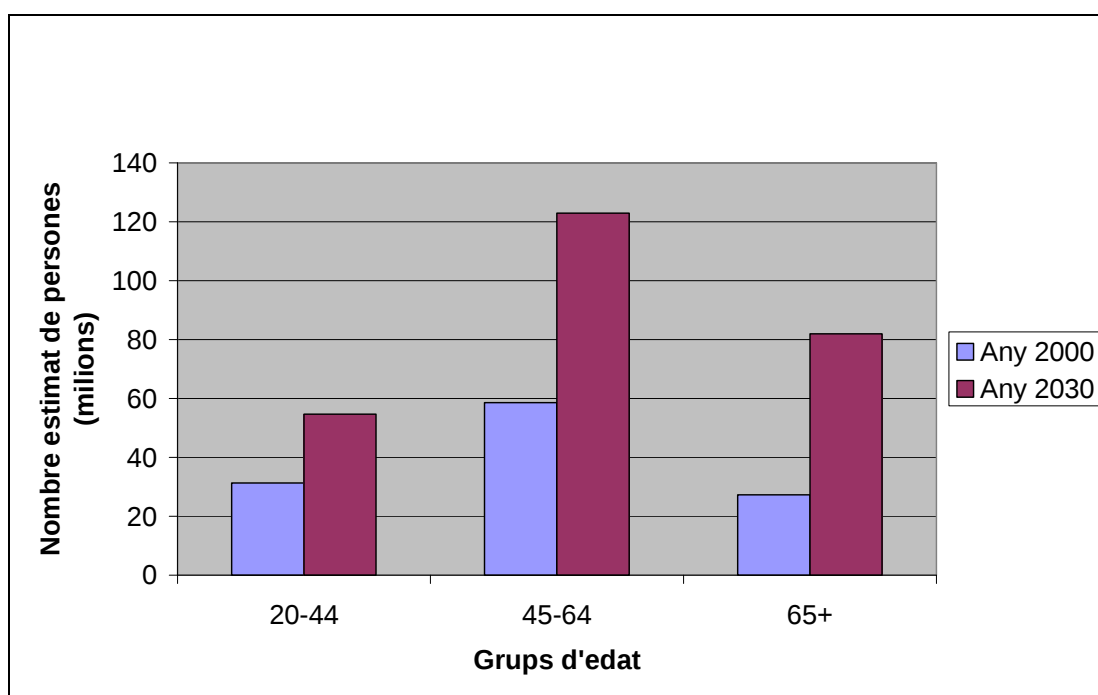


Figura 3: Estimació de prevalença de diabetes per a l'any 2030 en països en vies de desenvolupament. (Adaptat de Wild et al, 2004, ref. 3).

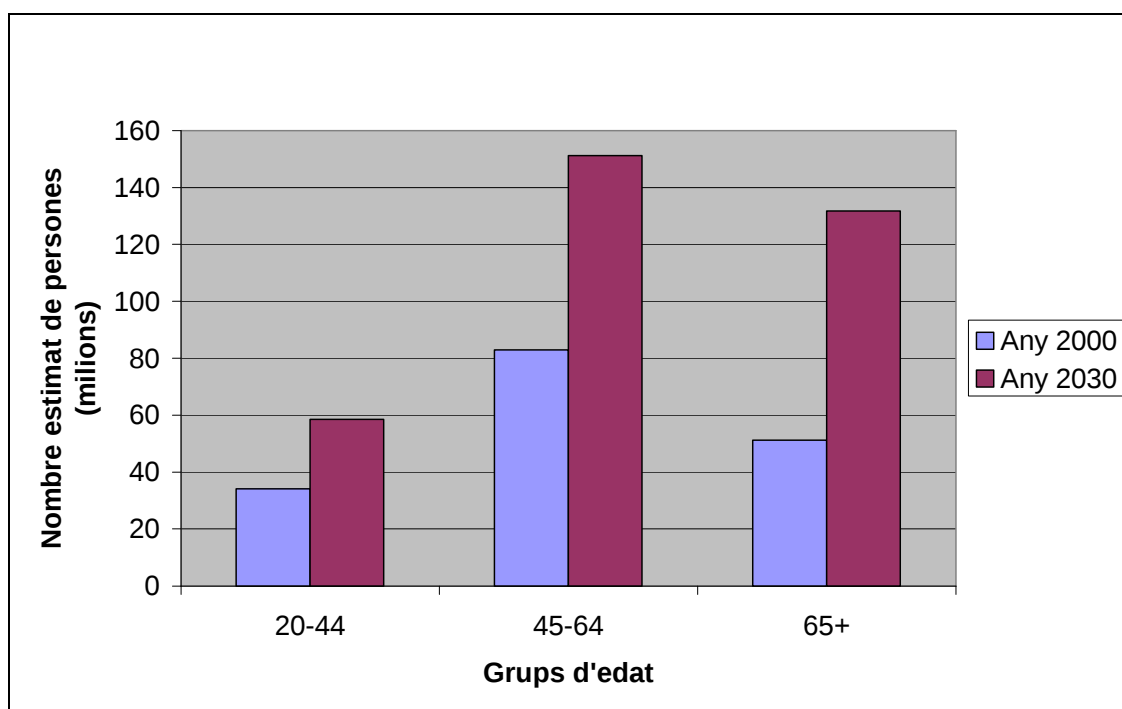


Figura 4: Estimació de la prevalença de diabetes per a l'any 2030 al món. (Adaptat de: Wild et al, 2004, ref. 3).

De forma més concreta, a Espanya, la xifra estimada de malalts de diabetis l'any 2000 era de 2.717.000 persones segons dades de la Organització Mundial de la Salut. Per a l'any 2030, aquesta mateixa organització estima que hi podria haver fins a 3.752.000 afectats per la malaltia.

### 1.3 TIPUS I CLASSIFICACIÓ DE DIABETIS MELLITUS<sup>(1)</sup>

A l'inici d'aquest treball s'ha definit la diabetis com la presència de concentracions de glucosa anormalment elevades de forma persistent en sang. No obstant, aquest augment de les concentracions de glucosa pot ésser causat per diferents mecanismes existint, per tant, diferents tipus de diabetis. Els diferents tipus de diabetis mellitus es classifiquen en funció del procés patogen que acaba desembocant en l'aparició de concentracions de glucosa en sang per sobre de l'interval de referència. A continuació, s'exposa un llistat de la classificació etiològica de la diabetis<sup>(6)</sup>:

- I. Diabetis tipus 1 (destrucció de les cèl·lules beta del pàncrees usualment amb dèficit absolut d'insulina)
  - a. Autoimmunitària
  - b. Idiopàtica

- II. Diabetis tipus 2 (varia des de resistència a l'acció de la insulina amb dèficit relatiu d'insulina a defectes secretors d'insulina amb resistència a la insulina)
- III. Altres tipus específics de diabetis mellitus
  - a. Defectes genètics en la funció de la cèl·lula beta pancreàtica:
    - i. Cromosoma 12. Factor de transcripció nuclear de l'hepatòcit (HNF) 1 $\alpha$  (MODY 3)
    - ii. Cromosoma 7. Glucocinasa (MODY 2)
    - iii. Cromosoma 5. HNF-4 $\alpha$  (MODY 1)
    - iv. Cromosoma 13. Factor promotor de la insulina 1 (IPF-1) (MODY 4)
    - v. Cromosoma 17. HNF-1 $\beta$  (MODY 5)
    - vi. Cromosoma 2. NeuroD1 (MODY 6)
    - vii. DNA mitocondrial
    - viii. Altres
  - b. Defectes genètics en l'acció de la insulina:
    - i. Resistència a la insulina de tipus A
    - ii. Leprecaunisme
    - iii. Síndrome de Rabson-Mendenhall
    - iv. Diabetis lipoatròfica
    - v. Altres
  - c. Malalties del pàncrees exocrí:
    - i. Pancreatitis
    - ii. Traumes/pancreatectomia
    - iii. Neoplàsia
    - iv. Fibrosi quística
    - v. Hemocromatosi
    - vi. Pancreatopatia fibro-calculosa
    - vii. Altres
  - d. Endocrinopaties:
    - i. Acromegàlia
    - ii. Síndrome de Cushing
    - iii. Glucagonoma
    - iv. Feocromocitoma

- v. Hipertiroïdisme
- vi. Somatostatinoma
- vii. Aldosteronoma
- viii. Altres
- e. Iatrogènica:
  - i. Vacor
  - ii. Pentamidina
  - iii. Àcid nicotínic
  - iv. Glucocorticoides
  - v. Hormones tiroidees
  - vi. Diazòxid
  - vii. Agonistes  $\beta$ -adrenèrgics
  - viii. Diürètics tiazídics
  - ix. Dilantina
  - x. Interferó  $\gamma$
  - xi. Altres
- f. Infeccions:
  - i. Verola congènita
  - ii. Citomegalovirus
  - iii. Altres
- g. Formes infreqüents de diabetis immunitària:
  - i. Síndrome de la persona rígida
  - ii. Anticossos anti-receptor d'insulina
  - iii. Altres
- h. Síndromes genètics associats, en certes ocasions, a diabetis:
  - i. Síndrome de Down
  - ii. Síndrome de Klinefelter
  - iii. Síndrome de Turner
  - iv. Síndrome de Wolfram
  - v. Atàxia de Friedreich
  - vi. Corea de Huntington
  - vii. Síndrome de Laurence-Moon-Biedl
  - viii. Distròfia miotònica
  - ix. Porfíria

x. Síndrome de Prader-Willi

xi. Altres

i. Diabetis mellitus gestacional

Com es pot observar a partir de l'anterior classificació existeixen diversos tipus de diabetis, no obstant, les més freqüents són la diabetis insulino-depenent (tipus 1), la diabetis no insulino-depenent (tipus 2) i la diabetis gestacional.

### **1.3.1 DIABETIS MELLITUS TIPUS 1<sup>(1)</sup>**

La diabetis tipus 1, també anomenada insulino-depenent, consisteix en un dèficit de secreció d'insulina degut a una destrucció de les cèl·lules beta pancreàtiques dels illots de Langerhans. Tot i que es coneixen diversos determinants genètics i autoimmunitaris que intervenen en l'aparició de la malaltia, avui en dia, no s'han pogut identificar clarament la causa o causes d'aquesta destrucció de cèl·lules beta.

Aquest tipus de diabetis sol presentar el seu debut en la infància o els inicis de la joventut, és per aquest motiu que, en ocasions, encara és denominada diabetis juvenil.

Com tot tipus de diabetis, aquesta cursa amb concentracions de glucosa en sang persistentment elevades degut a que el dèficit secretor d'insulina fa ineficient l'entrada de la glucosa a les cèl·lules per a poder ser emprada com a substrat energètic.

El quadre clínic es sol presentar de forma brusca amb hiperglucèmia i els símptomes característics del pacient diabètic, coneguts com les quatre P, i consisteix en:

1. Polifàgia: Degut a la manca d'utilització de glucosa per part de les cèl·lules el pacient refereix tenir molta gana.
2. Poliúria: Degut a que les elevades quantitats de glucosa en sang fa que aquesta s'excreti per via renal juntament amb una gran quantitat d'aigua.
3. Polidípsia: Secundària a la deshidratació produïda per la poliúria.
4. Pèrdua de pes.

Malauradament, el debut de la diabetis tipus 1 s'associa a la ceto-acidosi diabètica, una de les complicacions diabètiques més greus i que pot comprometre seriosament la vida del pacient.

El tractament de la diabetis tipus 1 consisteix bàsicament en l'administració d'insulina humana recombinant per via exògena durant la resta de la vida del pacient.

### **1.3.2 DIABETIS MELLITUS TIPUS 2<sup>(1)</sup>**

A aquest tipus de diabetis també se l'anomena no insulino-depenent ja que, generalment, els pacients no requereixen de l'administració exògena d'insulina per sobreviure.

La patogènia de la malaltia consisteix en una resistència dels teixits perifèrics a l'acció de la insulina. Les cèl·lules beta pancreàtiques d'aquests pacients són funcionals i secreten insulina adequadament, no obstant, els teixits perifèrics no responen a l'estímul de la insulina. Conseqüentment, el pàncrees d'aquests pacients respon inicialment secretant majors quantitats d'insulina per compensar la insulino-resistència tissular, essent aquest el motiu pel qual, molts d'aquest pacients solen presentar concentracions d'insulina en sèrum més altes del que caldria esperar. Posteriorment, aquesta hipersecreció compensadora pot acabar per esgotar la capacitat funcional de les cèl·lules beta i el pacient pot acabar requerint l'administració exògena d'insulina.

Al contrari que la diabetis tipus 1, el debut d'aquesta es produeix a l'edat adulta, generalment al voltant dels 40 anys i s'instaura de forma lenta i insidiosa fent que bona part dels pacients siguin asimptomàtics. Sol associar-se aquest tipus de diabetis a obesitat, sedentarisme, dislipèmia i hipertensió arterial.

### **1.3.3 DIABETIS GESTACIONAL**

La diabetis gestacional es defineix com qualsevol grau d'intolerància a la glucosa amb debut o primera detecció durant els mesos d'embaràs<sup>(7)</sup>.

Encara que la majoria de casos de diabetis gestacional es resolen amb el part, la definició també és aplicable en cas de que aquesta diabetis persisteixi després de l'embaràs. Aproximadament un 7% dels embarassos cursen amb diabetis gestacional<sup>(8)</sup>, encara que aquesta xifra oscil·la d'un 1 a un 14% depenent de la població que s'estudia<sup>(7)</sup>.

Tot i que ja es coneixia una relació entre la diabetis mellitus plenament establerta i un risc significatiu d'efectes adversos perinatals, no fou fins l'any 2008 en que els resultats d'un important estudi epidemiològic internacional<sup>(9)</sup> que va involucrar més de 25.000 dones embarassades demostrà que, tal i com ja havien suggerit estudis anteriors<sup>(10-15)</sup>, concentracions de glucosa en sang discretament elevades, també representaven un risc tot i que menys greu que la diabetis mellitus plenament establerta. A més a més, existeix un problema afegit en el cas de la diabetis mellitus gestacional, i és que les dones que l'han patit presenten un risc més elevat de desenvolupar diabetis mellitus tipus 2 posteriorment, així com els seus fills tenen major risc de presentar obesitat, intolerància a la glucosa y diabetis cap al final de l'adolescència<sup>(8)</sup>.

#### **1.4 COMPLICACIONS DE LA DIABETIS MELLITUS**

La persistència de concentracions elevades de glucosa en la sang dels pacients diabètics porta a les complicacions de la diabetis. Les complicacions de la diabetis es classifiquen en agudes o cròniques:

##### **1.4.1 COMPLICACIONS AGUDES**

Les principals complicacions agudes de la diabetis mellitus són l'estat hiperglucèmic hiperosmolar i la cetoacidosi diabètica<sup>(16,17)</sup>. Ambdues són complicacions greus i constitueixen veritables urgències mèdiques ja que poden posar en greu perill la vida del pacient.

##### **1.4.1.1 CETOACIDOSI DIABÈTICA<sup>(1)</sup>**

La cetoacidosi diabètica és una de les complicacions agudes més freqüents que es presenten en els pacients diabètics. Es presenta de forma més habitual en pacients diabètics de tipus 1, essent, freqüentment, la manifestació de debut de la malaltia en un pacient. No obstant, també es pot presentar en pacients diabètics tipus 2 quan el dèficit d'insulina que pateixen és considerablement important<sup>(16)</sup>.

En el cas de població pediàtrica en països desenvolupats la mortalitat associada a la cetoacidosi diabètica oscil·la entre el 0,15% i 0,31% segons diversos estudis<sup>(18-21)</sup>. En adults, les taxes de mortalitat oscil·len, segons l'estudi, en xifres al voltant de l'11%.

Generalment, la cetoacidosi diabètica es dona en presència d'un factor desencadenant. Els més freqüents són:

- Errors en la posologia de la insulina o deficient compliment terapèutic
- Infeccions
- Transgressió dietètica
- Exercici físic
- Estrés, ja sigui de tipus físic (cirurgia, infart agut de miocardi,...) o emocional.
- Malalties metabòliques
- Iatrogènia

De totes elles, les infeccions són el factor desencadenant més important, seguides de prop de problemes relacionats amb la insulinoteràpia.

Fisiopatològicament, la cetoacidosi diabètica es produeix, com ja s'ha esmentat, per un dèficit important d'insulina, ja sigui aquest absolut o relatiu. Aquest dèficit d'insulina comporta un augment brusc i molt intens de les concentracions de glucosa en sang degut, per una banda a la reducció en l'entrada de glucosa a les cèl·lules i, per altra, a un increment de la gluconeogènesi hepàtica<sup>(22-25)</sup>, fruit de la impossibilitat de les cèl·lules de disposar de glucosa com a substrat energètic, ja que el fet que la glucosa no pugui entrar a les cèl·lules, l'organisme l'interpreta com a dèficit de glucosa circulant, quan de fet n'hi ha en excés. Per altra banda, l'absència d'insulina augmenta la lipòlisi de triglicèrids en teixit adipós i augmenta la producció de cossos cetònics a nivell hepàtic<sup>(16,24)</sup>.

La conjunció d'aquests quatre factors (gluconeogènesi activada, dèficit d'utilització de glucosa circulant, augment de lipòlisi i augment de producció de cossos cetònics)

provoca els dos signes cardinals d'aquesta entitat que són la hiperglucèmia i la cetoacidosi<sup>(26)</sup>.

L'augment de les concentracions de glucosa en sang de forma tan important, fa que es superi el llindar renal de reabsorció de glucosa apareixent glucosúria. Aquesta presència de glucosa en elevades concentracions en orina produeix una diüresi osmòtica que porta a hipovolèmia, pèrdua d'ions sodi i potassi per l'orina i, eventualment, a shock hipovolèmic. A més, la hiperglucèmia produeix un augment en l'osmolaritat plasmàtica portant a deshidratació cel·lular i, posteriorment, a coma<sup>(25,27,28)</sup>.

El quadre clínic de la cetoacidosi diabètica sol instaurar-se ràpidament. El pacient sol presentar poliúria, polidípsia, astènia i més endavant començar a manifestar nàusees, vòmits i dolor abdominal. Un altre signe característic en els pacients que pateixen cetoacidosi diabètica és la presència de respiració de Kussmaul. El grau de pèrdua de consciència és molt variable entre pacients, podent oscil·lar entre lleugera obnubilació a coma<sup>(1,16)</sup>.

Les alteracions més importants en els exàmens de bioquímica de laboratori que es poden presentar en aquests pacients són<sup>(16,22,29)</sup>:

- Augment de les concentracions en sang de glucosa.
- Concentracions de cossos cetònics en sang, generalment superiors a 5 mmol/L.
- Disminució de les concentracions de bicarbonat en sèrum o plasma per sota de 15 mmol/L.
- pH per sota de 7,3.
- Augment de la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>).

#### **1.4.1.2 ESTAT HIPERGLUCÈMIC HIPEROSMOLAR<sup>(1)</sup>**

Aquesta complicació aguda de la diabetis mellitus és més freqüent en malalts diabètics de tipus 2. La patogènesi d'aquesta complicació de la diabetis es semblant al de la cetoacidosi diabètica comentada anteriorment, tot i que encara es desconeixen alguns

trets fisiopatològics de la mateixa. Des del punt de vista fisiopatològic, els desencadenants són el dèficit relatiu d'insulina típic de la diabetis tipus 2 i una insuficient reposició de líquids.

Un altre tret remarcable és que, mentre que la mortalitat associada a la cetoacidosi diabètica és relativament baixa (inferior al 5%)<sup>(16)</sup>, les xifres de mortalitat deguda a l'estat hiperglicèmic hiperosmolar, oscil·len al voltant de l'11%<sup>(16,23,27,30-35)</sup>.

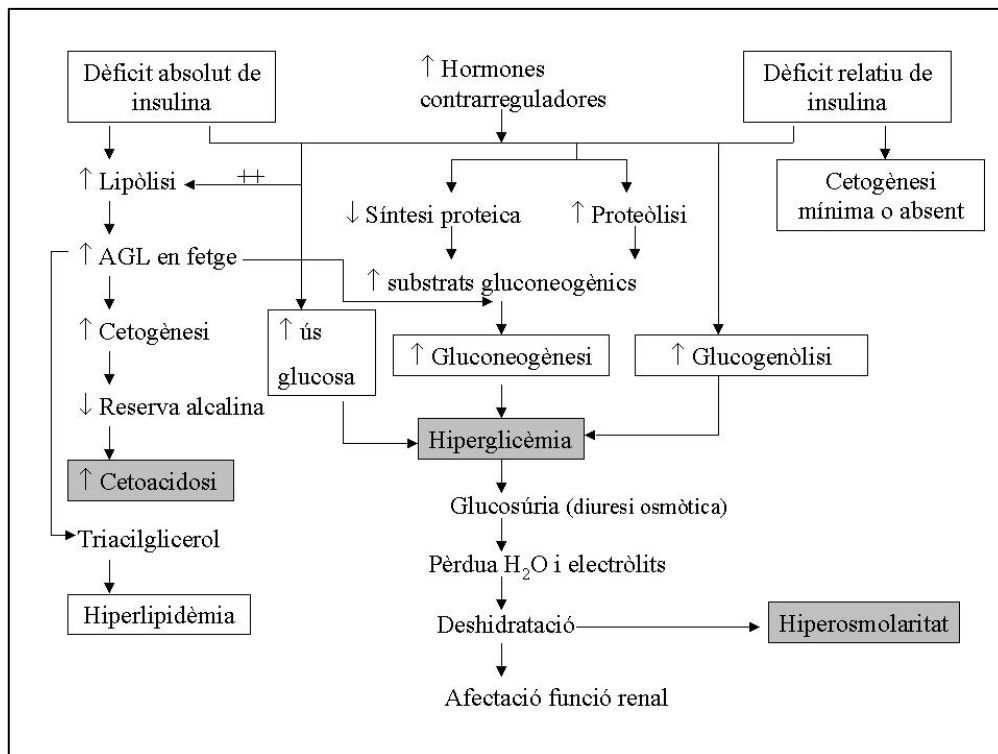
Degut a l'elevada concentració sanguínia de glucosa, aquesta comença a ser eliminada per via renal. No obstant, per mecanismes osmòtics, s'elimina acompanyant la glucosa una gran quantitat d'aigua. Aquest fet porta a una depleció important de líquids corporals i, conseqüentment, un estat hiperosmolar.

El pacient sol presentar poliúria intensa i signes de deshidratació profunda amb hiperosmolalitat plasmàtica i hipotensió, taquicàrdies i trastorns de l'estat mental que poden evolucionar de confusió mental i letargia a coma.

L'examen de laboratori revela concentracions de glucosa plasmàtiques que poden arribar a 55,5 mmol/L i hiperosmolaritat amb valors que poden arribar a més de 350 mOsm/L. No sol presentar-se acidosi ni cetonèmia i, en cas que es presentin (fet que pot representar un solapament en el diagnòstic diferencial entre l'estat hiperglicèmic hiperosmolar y la cetoacidosi diabètica), solen ésser lleus. Contràriament al que succeeix amb la cetoacidosi diabètica, els pacients no solen presentar nàusees, vòmits, dolor abdominal ni la típica respiració de Kussmaul.

L'èxit en el tractament de l'estat hiperglicèmic hiperosmolar, de la mateixa manera que en la cetoacidosi diabètica, requereix la correcció de la deshidratació, la hiperglicèmia i els desajustaments en l'equilibri hidro-electrolític i àcid-base que presenta el pacient. Així mateix, és necessària la identificació de comorbiditats en els pacients que podrien resultar en un pitjor pronòstic en l'evolució del pacient.

A la figura 5 s'exposa el mecanisme patogènic per l'aparició de cetoacidosi diabètica i estat hiperglicèmic hiperosmolar, en la que es pot observar que ambdues complicacions comparteixen trets bioquímics comuns.



**Figura 5: Patogènesi de la cetoacidosi diabètica i l'estat hiperglicèmic hiperosmolar.** (Adaptat de: Kitabchi et al, 2004. Refs. 16 i 24).

#### 1.4.2 COMPLICACIONS CRÒNIQUES

A pesar de la gravetat de les complicacions agudes de la diabetis, aquestes es presenten, afortunadament, de forma poc freqüent. El principal cavall de batalla en el tractament i adequat control metabòlic de la malaltia, es basa en evitar, o, si més no, retardar l'aparició de les complicacions cròniques de la diabetis, que apareixen tant en la diabetis mellitus tipus 1 com tipus 2. Això és degut a que, des de fa dècades es coneix la implicació de la hiperglicèmia en la patogènesi de les complicacions cròniques.

Les complicacions cròniques de la diabetis, són principalment vasculars<sup>(36-41)</sup> i, segons el calibre dels vasos afectats es classifiquen en complicacions microangiopàtiques o macroangiopàtiques. Les principals són:

1. Neuropatia diabètica: És la complicació més freqüent.
2. Retinopatia diabètica.
3. Nefropatia diabètica.
4. Vasculopatia perifèrica: També anomenada peu diabètic.

## 5. Macroangiopatia diabètica.

L'adequat control dels pacients diabètics de cara a evitar aquestes complicacions és extremament important degut a que les complicacions macroangiopàtiques, entre les que s'inclouen l'infart agut de miocardi i els accidents vasculars cerebrals, han esdevingut algunes de les principals causes de mort en pacients diabètics.

Com es desenvoluparà més endavant, les elevades concentracions de glucosa estan directament relacionades amb l'aparició d'aquestes complicacions, no obstant, no s'ha pogut establir encara quins són els mecanismes fisiopatològics pels que s'estableix el dany tissular responsable d'aquests problemes.

## **1.5 DIAGNÒSTIC DE LA DIABETES MELLITUS**

### **1.5.1 RESSENYA HISTÒRICA I RECOMANACIONS ACTUALS**

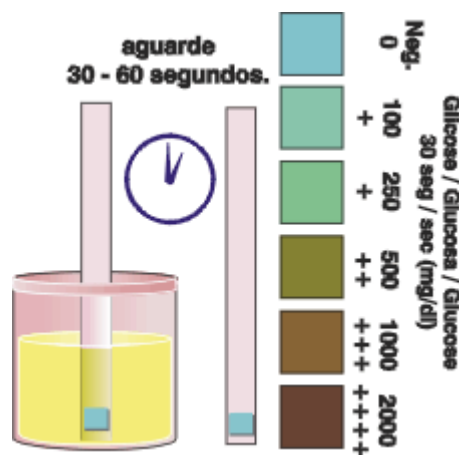
Actualment, es disposa d'eines fiables per al diagnòstic i cribratge de la diabetis mellitus. Històricament, però, l'examen de les concentracions de glucosa en els malalts diabètics era tot un repte. De fet, durant molts anys, l'única eina de que disposaven els metges per al control de la malaltia era la presència explícita de símptomes d'hiperglucèmia.

Abans de l'any 1975, el control del pacient diabètic consistia de forma gairebé exclusiva en la determinació en orina de la presència de glucosa i de cetones<sup>(42-44)</sup>. Sovint, el principal objectiu d'aquest control era obtenir informació addicional, a part de l'anamnesi i exploració física del pacient, per a poder realitzar canvis en la teràpia emprada fins el moment per tal d'evitar o eliminar símptomes d'hiperglucèmia com la poliúria, la polidípsia o la polifàgia, més que, com succeeix en l'actualitat, per assolir objectius terapèutics concrets i eficaços<sup>(45)</sup>. Les raons per les quals el control de les concentracions de glucosa del pacient mitjançant la seva determinació en orina no és desitjable, són les següents<sup>(42-44,46-51)</sup>:

- El llindar per a l'inici d'eliminació de glucosa per l'orina es situa a un equivalent en concentracions plasmàtiques d'aproximadament 10 mmol/L, no obstant, existeix una important variabilitat interindividual. A més, els pacients amb anys d'evolució de la malaltia poden presentar un llindar més

elevat i en determinats grups poblacionals, com nens i dones embarassades, aquest llindar pot disminuir considerablement.

- La concentració de glucosa pot sobreestimar-se o infraestimar-se en funció de la ingesta de líquids del pacient.
- El resultat de la determinació no es correlaciona amb la concentració plasmàtica mitjana de glucosa en el moment de la prova, sinó amb la concentració plasmàtica des de l'última micció.
- Un resultat negatiu no distingeix entre hipoglucèmia, euglucèmia o hiperglucèmia lleu o moderada.
- Les tires reactives per a detectar glucosa en orina solen utilitzar una escala patró de colors a partir del qual es compara la tira reactiva problema (figura 6). Aquest fet les fa molt menys útils que els actuals dispositius digitals amb lectura per reflectància.
- Existeixen diversos fàrmacs que poden interferir en les determinacions de glucosa en orina.
- Existeix elevada imprecisió a concentracions baixes de glucosa.



**Figura 6: Esquema d'una escala de colors per a l'estimació de les concentracions de glucosa en orina mitjançant tires reactives. (Font: <http://www.confirme.com.br/es-es/faq>).**

Existeixen nombroses investigacions i proves clíniques que referenden aquestes limitacions<sup>(42,52-59)</sup>, sempre tenint en compte que la determinació de glucosa en orina només permet una estimació grollera de les concentracions de glucosa en el plasma i que no aporta informació sobre concentracions de glucosa per sota de la concentració llindar d'eliminació renal, com a limitacions més importants<sup>(42,50,53-56)</sup>.

A partir de l'any 1975, van esdevenir grans canvis en el control del pacient diabètic mitjançant l'aparició d'altres proves de laboratori. Aquest canvis, van venir motivats, principalment, per l'aparició de proves objectives de que les complicacions cròniques de la diabetis eren resultat d'un estat hiperglicèmic crònic<sup>(45)</sup>.

Anys més tard, cap a mitjans de la dècada de 1980, ja van aparèixer proves per a la mesura de proteïnes que havien sofert processos de glicació y que podrien ser útils per a la determinació del grau de control metabòlic dels pacients<sup>(45)</sup>. A més a més, es van desenvolupar petits analitzadors que permetien als pacients autocontrolar les seves concentracions sanguínies de glucosa mitjançant mètodes de tires reactives de química seca utilitzant sang capil·lar<sup>(48)</sup> (figura 7). D'aquesta manera, els professionals sanitaris disposaven de proves que permetien un diagnòstic acurat de la diabetis i es permetia, amb els petits sistemes de química seca, que el pacient es fes responsable del curs de la malaltia i pogués controlar còmodament les seves concentracions de glucosa de forma que es disminuís la possible aparició de complicacions diabètiques.



**Figura 7: Dispositiu per a l'autocontrol de les concentracions de glucosa mitjançant sang capil·lar.**

Durant molt temps, el diagnòstic de la diabetis mellitus s'ha basat, de forma gairebé exclusiva, en l'anamnesi i exploració física del pacient i en la mesura al laboratori clínic de les concentracions sèriques o plasmàtiques de glucosa, ja fos a través de la mesura de les concentracions de glucosa en dejú o de la mesura de les concentracions de glucosa amb la prova de tolerància oral a la glucosa.

Els criteris bàsics de diagnòstic per determinar l'estat diabètic del pacient consistien en:

1. Concentració de glucosa en plasma en dejú  $\geq 7,0$  mmol/L.

2. Concentració de glucosa en plasma  $\geq 11,1$  mmol/L a les 2 hores d'una prova de tolerància oral a la glucosa, després d'una càrrega de 75 g de glucosa anhidra dissolta en aigua.

L'any 2010, la American Diabetes Association (ADA), que publica anualment els estàndards de diagnòstic i tractament de diabetis mellitus, no havia considerat mai, fins aleshores, la inclusió de la mesura de l'hemoglobina glicada com a magnitud adequada per al diagnòstic de la diabetis mellitus. L'any 2010, però, l'ADA reconeix que mai havia inclòs la hemoglobina  $A_{1c}$  com a criteri diagnòstic degut principalment a la manca d'estandardització dels mètodes emprats per a la seva mesura. No obstant, els resultats de mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$  actualment estan essent altament estandarditzats de forma que la comparació de resultats entre laboratoris és molt més satisfactòria<sup>(60)</sup>. A més a més, una recent comunicació emesa per un comitè d'experts després de revisar proves epidemiològiques tan establertes com emergents<sup>(61)</sup>, recomana la utilització de les mesures d'hemoglobina  $A_{1c}$  per al diagnòstic de diabetis mellitus, establint-se el punt de tall en el 6,5%. Aquest valor correspondria a l'obtingut mitjançant un mètode certificat per la NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) i, per tant, seria un resultat traçable als resultats de l'estudi de referència DCCT (Diabetes Control and Complications Trial)<sup>(60)</sup>, descrit a l'apartat 1.6.1.

Existeixen nombroses avantatges de l'ús de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$  respecte a d'altres proves clàssiques com la determinació de les concentracions de glucosa en plasma o sèrum després d'un dejuni de 8 hores o bé la determinació de la concentració plasmàtica de glucosa a les 2 hores<sup>(61)</sup>. Entre aquests avantatges destaquen:

1. Estandardització a nivell internacional a través d'un mètode de referència d'elevada qualitat metrològica. Les mesures de la concentració de glucosa no estan tan ben estandarditzades.
2. Traçables als resultats clínics dels estudis DCCT i UKPDS (descrits a l'apartat 1.6).
3. Menor variabilitat biològica que la determinació de les concentracions de glucosa.
4. Menor inestabilitat preanalítica que la glucosa.

5. No hi ha necessitat de que el pacient realitzi un dejuni previ a l'obtenció de la mostra.
6. Relativament poc afectada per variacions agudes de les concentracions sanguínies de glucosa (estrès, malaltia,...).

Per a l'any 2010, l'ADA va publicar els següents criteris per al diagnòstic de la diabetis mellitus<sup>(60)</sup>:

1. Hemoglobina  $A_{1c} \geq 6,5\%$ . La mesura s'ha d'efectuar mitjançant un mètode que hagi obtingut la certificació que atorga la NGSP, i per tant, que sigui traçable als resultats de l'estudi DCCT.
2. Concentració de glucosa en plasma en dejú  $\geq 7,0$  mmol/L. Es defineix dejú com l'absència d'ingesta calòrica, durant al menys 8 hores.
3. Concentració de glucosa en plasma  $\geq 11,1$  mmol/L a les 2 hores en el transcurs d'una prova de tolerància oral a la glucosa. La prova de tolerància oral a la glucosa s'ha d'efectuar segons descriu la Organització Mundial de la Salut utilitzant una càrrega de glucosa que contingui l'equivalent a 75 g de glucosa anhidra dissolta en aigua.
4. Pacients que presentin símptomes clàssics d'hiperglucèmia o crisi hiperglicèmica, en que es presenti una concentració de glucosa en plasma  $\geq 11,1$  mmol/L.

En cas d'absència d'hiperglicèmia inequívoca, els criteris 1, 2 i 3 requereixen la repetició de les proves.

Per il·lustrar l'evolució dels criteris diagnòstics de la diabetis mellitus, a la taula següent (taula 1) s'exposa un resum històric d'aquests criteris segons les publicacions de l'ADA.

Taula 1. Evolució dels criteris diagnòstics de diabetis mellitus en els últims anys.

|                                          | 2002 <sup>(62)</sup> | 2003 <sup>(63)</sup> | 2004 <sup>(64)</sup> | 2005 <sup>(65)</sup> | 2006 <sup>(66)</sup> | 2007 <sup>(67)</sup> | 2008 <sup>(68)</sup> | 2009 <sup>(69)</sup> | 2010 <sup>(60)</sup> |
|------------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Hemoglobina A <sub>1c</sub> <sup>1</sup> | No utilitzada        | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | ≥ 6,5%               |
| Glucosa plasmàtica en dejú <sup>2</sup>  | ≥ 7,0 mmol/L         | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  |
| TTOG (2h) <sup>3</sup>                   | ≥ 11 mmol/L          | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  |
| Glucosa casual <sup>4</sup>              | ≥ 11 mmol/L          | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  | Íd.                  |

<sup>1</sup>: Resultat obtingut segons un mètode traçable al sistema NGSP.

<sup>2</sup>: Dejú entès com a absència d'ingesta calòrica durant 8 hores.

<sup>3</sup>: Aquest test s'ha de realitzar segons la descripció de la Organització Mundial de la Salut (OMS) mitjançant la ingesta d'una dissolució de 75 g de glucosa anhidra en aigua.

<sup>4</sup>: Juntament amb signes i símptomes d'hiperglicèmia.

## 1.5.2 ALTRES PROVES DE CONTROL GLUCÈMIC

### 1.5.2.1 PROVES DE CETONES EN ORINA

Tot i que, en l'actualitat, aquestes proves han perdut molta importància, la detecció de cetones en orina ha estat una eina important durant molt temps per a la monitorització de pacients diabètics, en particular, per al control metabòlic de pacients amb diabetis tipus 1<sup>(50,51)</sup>.

El fonament bioquímic de la utilitat d'aquestes proves és que la presència de cetones en orina estaria indicant cetoacidosis, una de les complicacions clàssiques de la diabetis tipus 1. Donat que la cetoacidosis es una complicació, que com s'ha comentat anteriorment, suposa una veritable urgència mèdica, seria útil controlar les concentracions de cossos cetònics en orina.

Cal tenir en compte, però, que les proves de cetones en orina no són fiables ni per al diagnòstic ni per al seguiment del tractament de la cetoacidosis establerta<sup>(62,63)</sup>. Encara que els àcids acetoacètic i  $\beta$ -hidroxibutíric es reabsorbeixen al túbul renal, les seves

concentracions en orina sovint excedeixen enormement les seves concentracions en sang, per tant, no es podria basar el diagnòstic de cetoacidosi en la determinació de cetones en orina. Cal afegir també que, durant la recuperació de la cetoacidosi, es poden detectar cossos cetònics en orina molt temps després de que les concentracions dels mateixos hagin baixat per sota de les concentracions que es troben en estats de cetoacidosi<sup>(45)</sup>.

### 1.5.2.2 PROTEÏNES SÈRIQUES GLUCOSILADES

De la mateixa manera que la proteïna hemoglobina es glucosila, altres proteïnes presents a la sang segueixen aquest procés de glicosilació.

L'albumina glicosilada fou una de les proteïnes en les quals es va centrar certa atenció com a possible alternativa a l'hemoglobina glucosilada. El recanvi de l'albumina humana en sèrum és més curt degut a la menor vida mitja de l'albumina, d'aproximadament 14 dies, enfront els 120 dies de vida mitja de l'eritròcit, per tant, ja no ofereix un interval de temps de control tan ampli com la hemoglobina glucosilada. No obstant, la mesura d'albumina glucosilada (i, com també s'ha demostrat, del total de proteïnes glucosilades en sèrum) es correlaciona bé amb la proporció d'hemoglobina glucosilada. Per aquest motiu s'havia suggerit, la mesura de proteïnes glicades, com a possible alternativa per al control rutinari de les concentracions de glucosa en pacients diabètics<sup>(72-79)</sup>. No obstant, la utilitat clínica de la determinació de proteïnes glucosilades en sèrum, diferents de l'hemoglobina glucosilada, no ha estat ben establert i no existeixen proves concloents que les relacionin amb les complicacions cròniques de la diabetis<sup>(80)</sup>. No obstant, alguns estudis relativament recents han proposat l'albumina glicada com a millor biomarcador que l'hemoglobina glicada per al control metabòlic a curt termini, sobretot per a la predicció del risc de complicacions vasculars de la diabetis mellitus<sup>(81)</sup>.

## 1.6 ESTUDIS DCCT I UKPDS

Els estudis DCCT (Diabetes Complications Control Trial)<sup>(82)</sup> publicat l'any 1993, i UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study)<sup>(83)</sup>, publicat l'any 1998, van ser dos estudis clau en l'estudi del tractament del pacient diabètic. Ho van ser per dos motius fonamentals. El primer de tots, que tot i que s'havia observat en nombrosos

estudis epidemiològics i en estudis utilitzant models animals previs al DCCT i UKPDS<sup>(84-89)</sup> que les elevades concentracions de glucosa en sang eren directament responsables de l'aparició de les complicacions vasculars de la diabetis, mai fins llavors cap estudi clínic havia demostrat clarament l'efecte beneficiós del tractament intensiu de la diabetis sobre l'aparició de les esmentades complicacions<sup>(90-92)</sup>. Un segon motiu és que, mitjançant aquests estudis, es va proposar la hemoglobina A<sub>1c</sub> com el patró or a l'hora de definir el control metabòlic dels pacients i establir el risc que té un pacient de desenvolupar alguna de les complicacions cròniques. A continuació, s'exposen les característiques i resultats d'ambdós estudis.

### **1.6.1 ESTUDI DCCT<sup>(82)</sup>**

L'estudi DCCT es va portar a terme als Estats Units amb pacient diabètics de tipus 1. Fou un estudi multicèntric aleatoritzat dissenyat específicament per comparar els efectes de la teràpia convencional de la diabetis enfront una teràpia intensiva sobre l'aparició de complicacions cròniques.

Es van reclutar 1441 pacients diabètics tipus 1, amb els següents criteris:

1. Dependència d'insulina objectivada mitjançant dèficit de secreció de pèptid-C
2. Edat entre 13 i 39 anys
3. Absència d'hipertensió arterial i hipercolesterolèmia
4. Complicacions diabètiques greus

D'aquests 1441 pacients es van obtenir dues cohorts:

1. 726 pacients amb diabetis tipus 1 de 1 a 5 anys d'evolució amb absència de retinopatia a l'inici de l'estudi i excreció d'albúmina en orina inferior a 40 mg/dia. Aquesta cohort fou la de prevenció primària.
2. 715 pacients amb diabetis tipus 1 d'un a 15 anys d'evolució, retinopatia no proliferativa lleu a moderada i excreció d'albúmina de menys de 200 mg/dia.

Tots els pacients es van assignar aleatòriament a seguir teràpia intensiva o convencional previ consentiment informat.

La teràpia convencional consistia en:

1. Una o dues injeccions diàries d'insulina
2. Autocontrol de les concentracions de glucosa en sang o orina
3. Mesures higiènic-dietètiques: Alimentació adequada, pràctica d'exercici físic,...
4. No s'incloïen de forma usual ajustos en la dosi d'insulina

La teràpia intensiva consistia en:

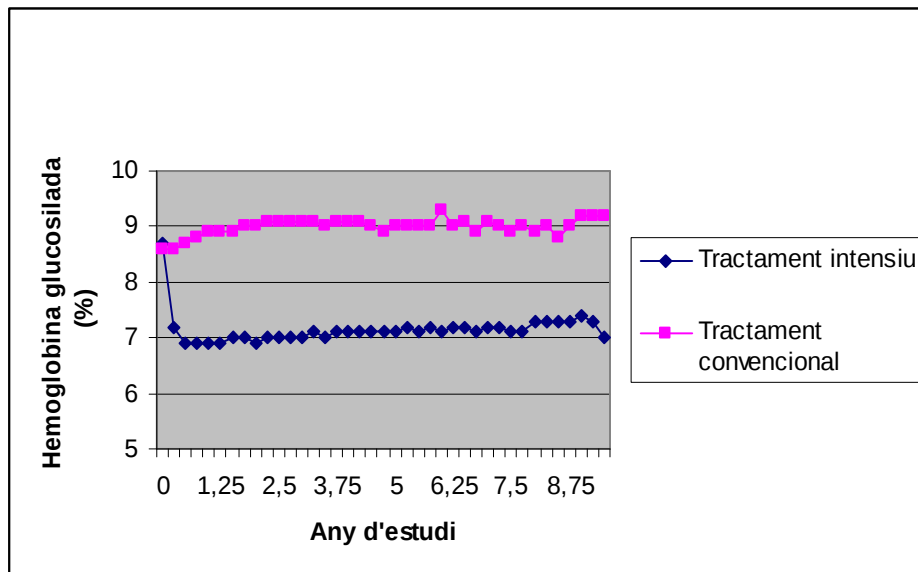
1. Administració d'insulina tres o més vegades al dia mitjançant injecció o bomba externa
2. Autocontrol de les concentracions de glucosa en sang almenys 4 vegades al dia.
3. Ajustos de la dosi d'insulina segons els resultats de l'autocontrol de les concentracions de glucosa en sang
4. Mesures higiènic-dietètiques amb exercici físic

Els objectius amb el tractament convencional foren l'absència de símptomes atribuïbles a la hiperglucèmia, absència de cetonúria, manteniment d'un creixement i desenvolupament normal i manteniment del pes ideal.

En quan al grup amb teràpia intensiva, els objectius foren concentracions de glucosa en sang preprandials de 3,9 a 6,7 mmol/L, concentracions de glucosa postprandials inferiors a 10 mmol/L, una concentració de glucosa a les tres de la matinada de més de 3,6 mmol/L i una proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$ , mesurada mensualment, inferior al 6%.

En els resultats, cal esmentar en primer lloc que s'observaren importants diferències entre els dos tipus de tractament en quant a la reducció de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$ , essent els pacients que rebien teràpia intensiva els que més aconseguien reduir la seva proporció de forma significativa. De fet, com es pot veure a la figura 8, els pacients que van estar sota teràpia convencional no mostraven, en conjunt, reducció de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$ . Aquest fet representa un dels punts de partida més importants per aquest treball ja que, a partir d'aquesta dada, resulta plausible relacionar la mesura de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$  amb l'estat clínic i el pronòstic dels pacients. És a dir, es disposa d'una prova de laboratori robusta que ens permet saber de

forma extremament fiable quin és el control metabòlic del pacient i quin és el seu risc posterior de patir complicacions.



**Figura 8: Diferència en la proporció d'hemoglobina glucosilada entre la cohort en tractament convencional i la cohort en tractament intensiu. (Adaptat de: The DCCT Group 1993, ref. 74).**

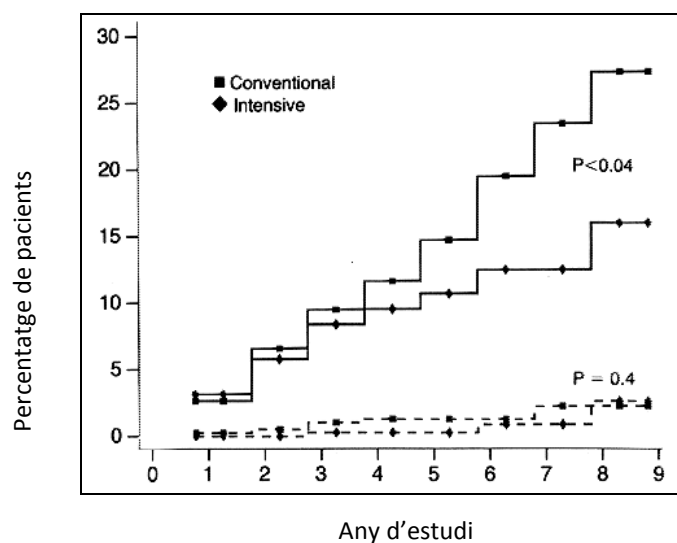
El seguiment dels pacients es va efectuar durant una mitjana de sis anys i mig i, principalment, es va monitoritzar l'aparició i la progressió de retinopatia, encara que també es van controlar altres variables com nefropatia, neuropatia i complicacions macrovasculars.

Els resultats de l'estudi van permetre concloure que el tractament intensiu en pacients diabètics tipus 1 permet retardar l'establiment i alentir la progressió de retinopatia.

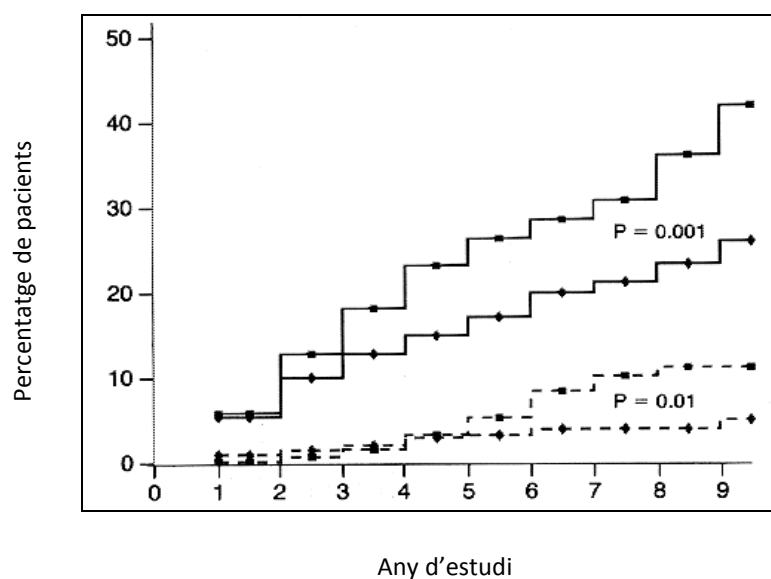
A més a més, també es reduïa el risc d'albuminúria i microalbuminúria. A la cohort de pacients en prevenció primària, s'observà que no existien diferències estadísticament significatives entre el seguiment de tractament intensiu o convencional sobre la incidència d'excreció d'albúmina superior o igual a 300 mg/24 hores. En el cas de la cohort sotmesa a intervenció secundària, sí que es van poder observar diferències estadísticament significatives en la incidència acumulada d'excreció d'albúmina superior a 300 mg/24 hores segons si els pacients rebien tractament intensiu o convencional.

A la figura 9, es pot observar clarament l'avantatge clínic del tractament intensiu enfront del convencional en la incidència acumulada d'albuminúria, mentre que a la

figura 10 es pot observar la mateixa corba, però en el cas de la cohort d'intervenció secundària.



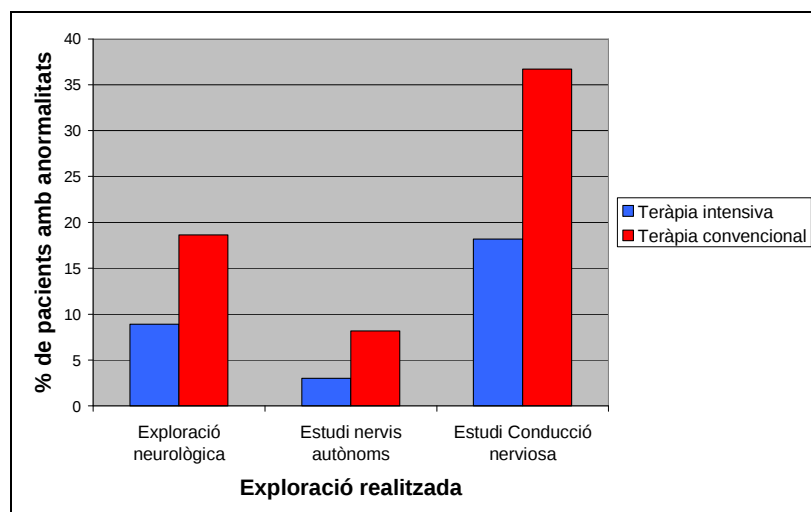
**Figura 9: Diferències en la incidència acumulada d'excreció d'albumina en la cohort de prevenció primària segons recepció de tractament intensiu o convencional. La línia contínua indica excreció d'albumina  $\geq 40$  mg/24 hores i la discontinua  $\geq 300$  mg/24 hores. (Font: The DCCT Group 1993, ref. 74).**



**Figura 10: Diferències en la incidència acumulada d'excreció d'albumina en la cohort d'intervenció secundària segons recepció de tractament intensiu o convencional. La línia contínua indica excreció d'albumina  $\geq 40$  mg/24 hores i la discontinua  $\geq 300$  mg/24 hores. (Font: The DCCT Group 1993, ref. 74).**

La capacitat del tractament intensiu en la reducció del desenvolupament de neuropatia suggereix que aquesta es podria prevenir, tal i com es mostra a la figura següent (figura 11), en la qual es mostra el clar avantatge clínic del tractament intensiu de la diabetis

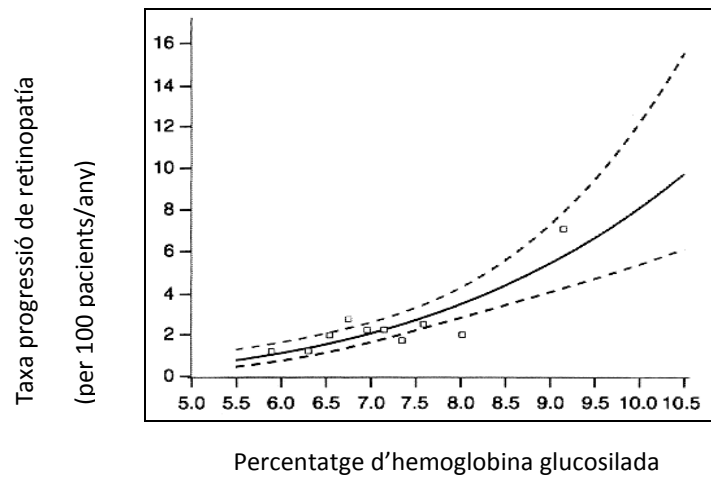
respecte el tractament convencional per tal de prevenir les complicacions neurològiques de la malaltia.



**Figura 11. Comparació del percentatge de pacients amb anormalitats en l'exploració neurològica, en estudis dels nervis autònoms i en estudis de conducció nerviosa entre els grups de pacients amb teràpia intensiva i teràpia convencional. (Adaptat de: The DCCT Group 1993, ref. 74).**

En el cas de la malaltia macrovascular, degut sobretot a que els pacients inclosos a l'estudi eren relativament joves, la possibilitat de determinar diferències relacionades amb el tractament en les taxes d'aparició d'aquest tipus de complicacions era limitada. És aquest últim, un dels motius pel qual es va posar en marxa posteriorment l'estudi UKPDS, ja que calia avaluar aquest risc en una població més adequada, ja que l'edat podia ser un factor que esbiaixés els resultats d'aquest risc.

A la figura 12, es mostra clarament un dels principals resultats de l'estudi DCCT. Es pot observar com, a mesura que augmenta la proporció d'hemoglobina glicada en els pacients, també augmenta la progressió de retinopatia diabètica.



**Figura 12: Progressió de retinopatia en funció de la proporció d'hemoglobina glucosilada. (Adaptat de The DCCT Group, 1993, ref. 74).**

La pregunta sobre si la reducció de la concentració de glucosa era responsable dels beneficis de la teràpia intensiva i si es podia assignar un objectiu de control glicèmic que reduïx el risc de complicacions cròniques i minimitzi el risc d'hipoglucèmia no es va poder respondre de forma directa. No obstant, es va analitzar la relació entre la taxa de desenvolupament de retinopatia amb l'exposició a altes concentracions de glucosa, mesurada com a proporció d'hemoglobina glicada. En efectuar aquest anàlisi, es va poder concloure que el risc s'incrementava de forma continua amb l'increment de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$ . Per altra banda, el risc d'hipoglucèmia s'incrementava a mesura que disminuïa la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$ .

Aquest estudi, va representar la confirmació que el tractament intensiu de la diabetis mellitus era fonamental per a la prevenció de les complicacions de la diabetis i s'obria la porta a les mesures d'hemoglobina glicada com a patró or per al control metabòlic dels pacients.

Així mateix, tot i que l'estudi va incloure només pacients diabètics tipus 1, s'esmentava que aquestes mateixes conclusions podrien ésser vàlides per a pacients amb diabetis tipus 2, tal i com ja apuntaven dades d'altres estudis. Aquestes hipòtesis esperaven la confirmació que va oferir l'estudi UKPDS.

### 1.6.2 ESTUDI UKPDS<sup>(83)</sup>

L'estudi UKPDS fou l'estudi equivalent al DCCT, encara que aquest fou desenvolupat sobre pacients diabètics de tipus 2.

Aquest estudi es basava en hipòtesis similars al DCCT, que la millora en el control de les concentracions de glucosa és beneficiosa de cara a prevenir l'aparició de les complicacions cròniques de la diabetis. No obstant, en aquest cas es va voler estudiar més a fons l'impacte del tractament intensiu en l'aparició de complicacions macrovasculars ja que, com s'ha mencionat anteriorment, l'edat dels pacients va impedir poder extreure conclusions al respecte en l'estudi DCCT.

Per a aquest estudi es van reclutar 3867 pacients recentment diagnosticats de diabetis tipus 2 amb una mitjana d'edat de 54 anys i una concentració de glucosa en sang en dejú de més de 6 mmol/L.

Els principals criteris d'exclusió foren:

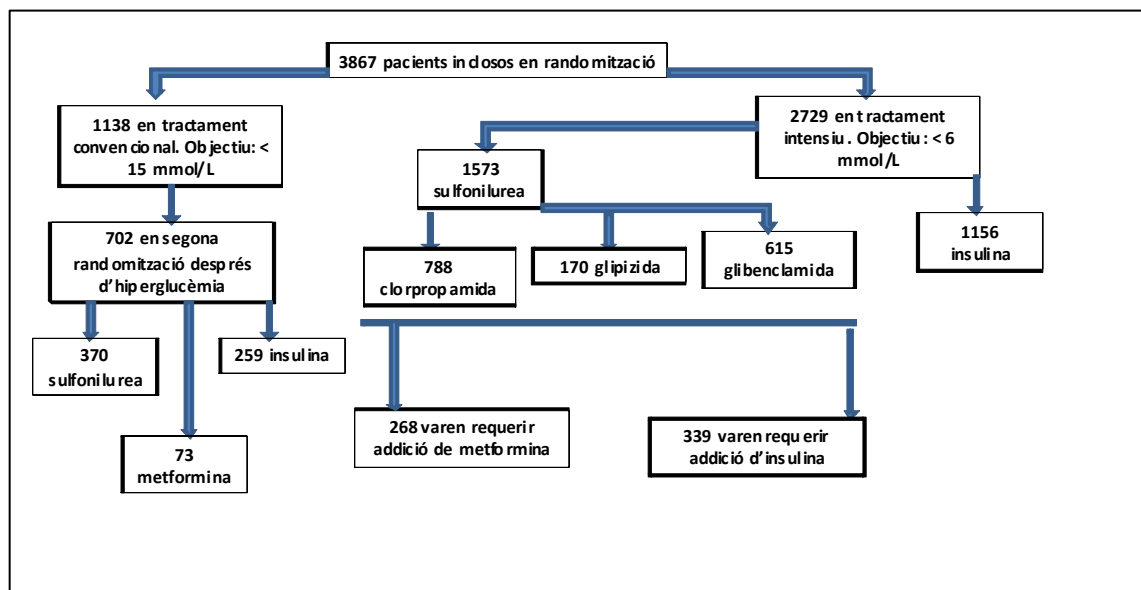
1. Cetonúria major de 3 mmol/L.
2. Concentració de creatinini en sèrum superior a 175 µmol/L.
3. Història d'infart de miocardi en els 12 mesos previs a la inclusió a l'estudi.
4. Presència d'angina o insuficiència cardíaca.
5. Patir de més d'un tipus de malaltia vascular.
6. Retinopatia que requerís tractament amb làser.
7. Hipertensió arterial maligna.
8. Malalties endocrines no clínicament controlades.
9. Professions incompatibles amb tractament amb insulina.

Els pacients van ser distribuïts aleatòriament en dos grups que es descriuen a continuació, i segons es mostra a l'esquema de la figura 13:

1. Grup de tractament convencional: L'objectiu en aquest grup era aconseguir una concentració de glucosa en plasma en dejú inferior a 15 mmol/L i el tractament dels quals consistia en dieta. Molts dels pacients van tenir en el transcurs de l'estudi concentracions plasmàtiques de glucosa en dejú superiors a 15 mmol/L, motiu pel qual van ser secundàriament aleatoritzats a seguir un tractament amb sulfonilurea o insulina, a menys que el pacient

patís de sobrepès, situació en la qual se'ls assignava tractament amb metformina.

2. Grup de tractament intensiu: L'objectiu en aquest grup era aconseguir concentracions plasmàtiques de glucosa en dejú inferiors a 6 mmol/L i, en pacients tractats amb insulina concentracions entre 4 i 7 mmol/L. El grup de tractament convencional es dividia en dos braços, un de tractament amb sulfonilurees i un altre de tractament amb insulina.



**Figura 13: Esquema del disseny i aleatorització de pacients a l'estudi UKPDS. (Adaptat de: The UKPDS Group, 1998, ref. 75).**

S'estudiaren diverses variables per a analitzar si existien diferències entre els resultats fruit de seguir un tractament convencional o un tractament intensiu, entre elles malalties cardíaques (infart de miocardi, angina de pit,...), necessitat d'amputació, insuficiència renal i problemes oftalmològics (retinopatia diabètica, cataractes,...).

Després d'un seguiment dels pacients de 10 anys de mitjana, es va poder establir que la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub> es va reduir en un 11% en el grup de tractament intensiu respecte al grup de tractament convencional. El risc de patir complicacions cròniques de diabetis es va reduir significativament en el grup de tractament convencional. No obstant, en avaluar l'efecte del tractament intensiu sobre les complicacions macrovasculars no es va observar diferència entre els dos tipus de tractament.

Per tant, es va poder concloure que una reducció de l'11% en la proporció d'hemoglobina s'associa a una reducció del risc de patir complicacions cròniques de la diabetis, en altres paraules, semblava que mantenir la proporció d'hemoglobina glucosilada per sota del 7% seria un bon objectiu terapèutic.

Les conclusions que s'extreuen d'aquests dos estudis són inequívokes. En primer lloc, la diabetis és una malaltia que cal tractar-la de forma intensiva des del seu diagnòstic per evitar un increment en la morbiditat i mortalitat d'aquests pacients. Per altra banda, i centrant-nos en el tema del treball, es defineix l'hemoglobina glicada com una prova que permet establir quin es el control metabòlic del pacient i així poder establir objectius de control metabòlic.

Cal tenir en compte un fet molt important, clau en el desenvolupament d'aquest treball. La traçabilitat d'un resultat de laboratori d'hemoglobina glicada  $A_{1c}$  als resultats clínics que es deriven d'aquests dos estudis, només es pot realitzar si els instruments emprats son comparables als utilitzats en aquests treballs, per tant, cal que estiguin calibrats segons l'esquema NGSP.

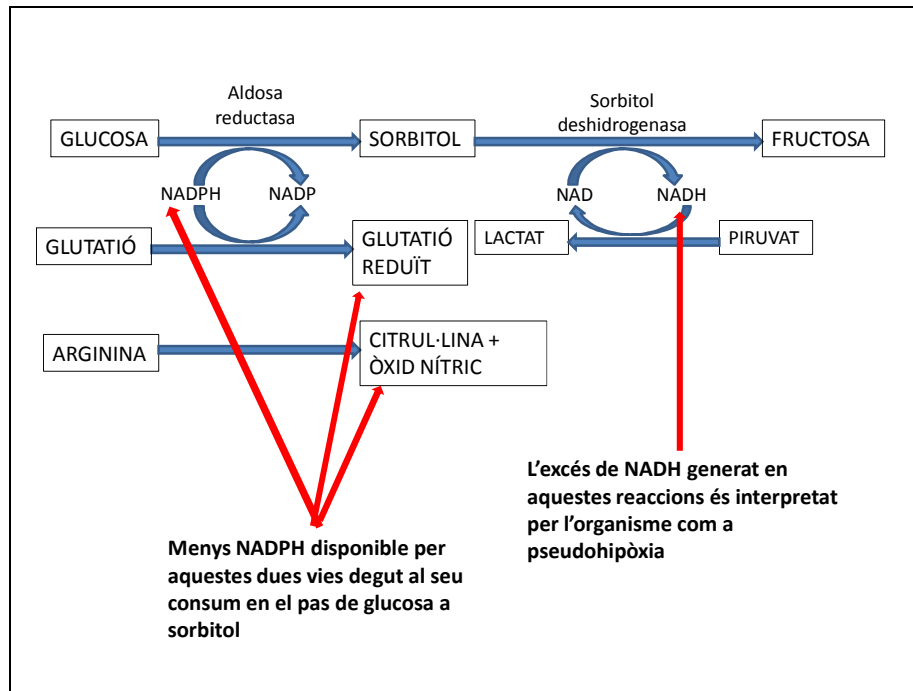
### **1.7 PAPER DE LA HIPERGLUCÈMIA EN LES COMPLICACIONS DE LA DIABETES**

Com s'ha descrit anteriorment, sembla evident que l'augment de la concentració plasmàtica de glucosa està directament relacionada amb les complicacions diabètiques. No obstant, encara no es coneixen perfectament els mecanismes que relacionen la presència hiperglucèmia amb les complicacions cròniques<sup>(93)</sup>. Aquest fet és d'una importància clau, ja que el coneixement dels mecanismes bioquímics de dany cel·lular de forma detallada, permetria facilitar el desenvolupament de nous agents terapèutics contra la malaltia.

Per explicar aquesta relació, entre concentracions elevades de glucosa en sang i dany bioquímic i cel·lular, s'han proposat diferents hipòtesis:

1. Teoria del sorbitol<sup>(94)</sup>: Aquesta teoria, proposada fa més de 30 anys, implica, a grans trets, que en teixits no dependents d'insulina, elevades concentracions de glucosa afavoririen la via de l'aldosa reductasa. Aquesta alteració en l'activitat de l'aldosa reductasa només té lloc a elevades concentracions de glucosa ja que és un enzim de baixa afinitat per ella. En

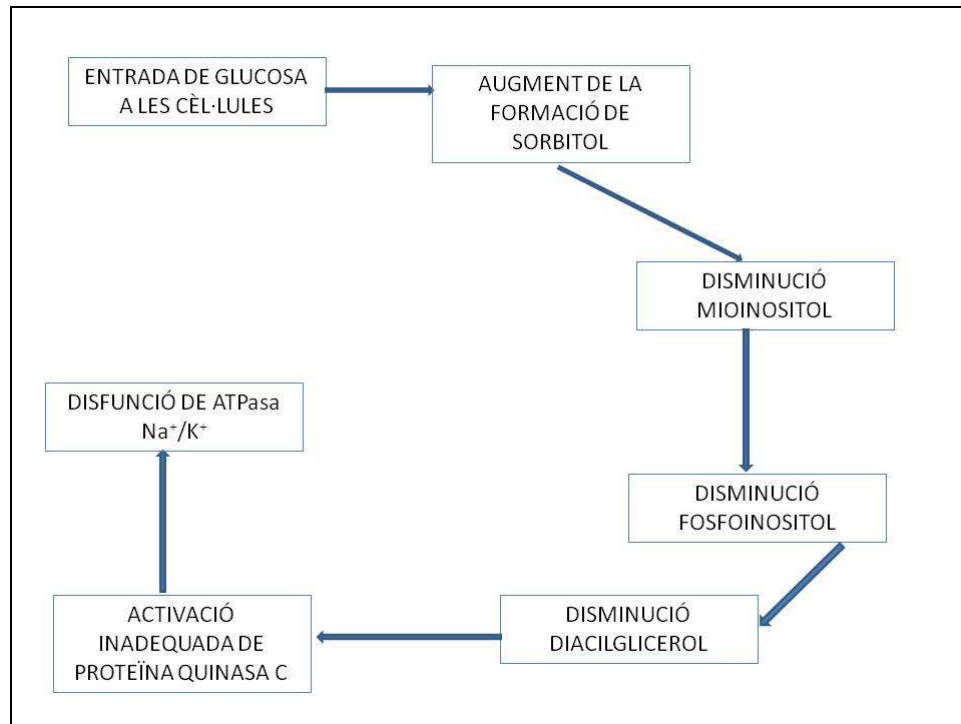
experiments amb models animals, en els que se'ls provoca artificialment un augment molt important de les seves concentracions de glucosa, s'activa aquesta via bioquímica produint-se sorbitol com a producte final. L'increment de sorbitol sembla afectar el metabolisme energètic cel·lular i la integritat de la membrana cel·lular entre d'altres funcions. Està demostrat que increments en la concentració de sorbitol, en determinats teixits, podrien resultar en canvis osmòtics. Aquest sembla ésser el mecanisme bioquímico que explicaria la formació de cataractes i el dany en la conducció nerviosa que causaria, en darrer terme, neuropatia. Però les conseqüències de l'activació de l'aldosa reductasa no es limiten a aquestes anomalies. L'aldosa reductasa utilitza NADPH per a la transformació de la glucosa en sorbitol. Aquesta depleció en les reserves de NADPH es tradueixen en una menor disponibilitat del mateix per a dues vies metabòliques de gran importància. En primer lloc, es disposaria de menys glutatió reduït. Per tant, el fràgil equilibri bioquímico entre agents oxidants i antioxidants, es veuria decantat cap a la banda dels oxidants. En segon lloc, la reducció en la disponibilitat de NADPH representaria una reducció en la via de síntesi de l'òxid nítric a partir d'arginina. Aquest podria ser un dels mecanismes subjacents en l'aparició de complicacions vasculars, ja que el descens en la producció d'aquest agent vasodilatador podria promoure vasoconstricció i menor irrigació sanguínia a determinats teixits<sup>(95)</sup>. Una última conseqüència de l'activació d'aquesta via seria l'augment de NADH derivat del consum de  $\text{NAD}^+$  en la via de metabolització del sorbitol a fructosa. Aquest augment en el NADH, seria interpretat per l'organisme com una hipòxia. En realitat, a aquest fenomen se l'anomena pseudohipòxia, ja que existeix una bona ventilació alveolar i l'intercanvi de gasos i l'aprofitament de l'oxigen als teixits són satisfactoris. No obstant, s'inicia la sortida de piruvat de la mitocòndria i la seva transformació en lactat<sup>(96,97)</sup>. A la figura següent (figura 14) es mostra un esquema de la bioquímica de la teoria del sorbitol.



**Figura 14: Ruta metabòlica del sorbitol i implicacions en la fisiopatologia de la diabetes mellitus.**

(Adaptat de Guglucci, 2000, ref. 85).

2. Modificació de l'activitat proteïna cinasa C: Concentracions elevades de glucosa porten a una modificació de l'activitat de la proteïna cinasa C. La proteïna cinasa C, regula diverses funcions vasculars mitjançant la modulació d'activitats enzimàtiques com la de la fosfolipasa A2, l'ATPasa Na/K o intervé en l'expressió de determinats gens que codifiquen components de la matriu extracel·lular i proteïnes contràctils. Quan l'activitat de la proteïna C no està correctament regulada, algunes de les anormalitats vasculars que apareixen inclouen canvis en el flux sanguini renal i retinal<sup>(98)</sup>. A més, la hiperactivitat de la proteïna cinasa C sensibilitza les cèl·lules musculars llises als agents vasoconstrictors i als factors de creixement, apareixent hipertensió i, posteriorment, plaques d'ateroma. A la figura següent (figura 15) es mostra un diagrama de flux que il·lustra la seqüència d'esdeveniments que porten a una incorrecta activitat de la proteïna cinasa C.



**Figura 15: Elevades concentracions de glucosa i cascada d'efectes que condueixen a elevació de proteïna cinasa C i disfunció d'ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ .** (Adaptat de: Gugliucci 2000, ref. 85).

3. Glicosilació de macromolècules: La presència d'elevades concentracions de glucosa produeix la glicosilació de macromolècules de l'organisme i aquesta modificació química pot afectar a la seva funció. Tot i que l'hemoglobina fou una de les primeres proteïnes per a les que es va descriure la seva glicació<sup>(99)</sup>, aquests processos de glicació, tal i com s'ha demostrat en estudis previs, pot afectar a quasi qualsevol proteïna.

### 1.8 HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

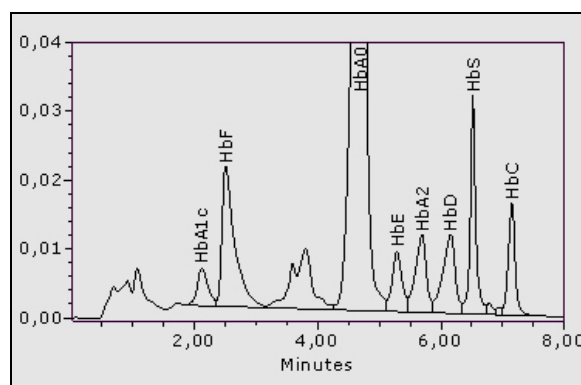
Com s'ha comentat en l'últim punt de l'apartat anterior, la presència d'elevades concentracions de glucosa a l'organisme afavoreix que es glucosilin macromolècules de l'organisme.

Les reaccions de glucosilació es coneixen des de fa dècades. De fet, es van descobrir per Maillard l'any 1912<sup>(100)</sup> en estudiar certs processos químics que succeïen en determinats aliments. Maillard va descobrir que els sucres reaccionen de forma no enzimàtica amb un ampli ventall de proteïnes per a formar uns productes anomenats de glucosilació primària, fructosamines o productes d'Amadori.

En els humans, també es produeix el mateix procés químic de glucosilació que va descriure Maillard per als aliments. La primera macromolècula de l'organisme per a la que es va demostrar aquest procés de glucosilació fou l'hemoglobina, encara que molts estudis han demostrat que els processos de glucosilació que sofreix l'hemoglobina, afecten a pràcticament qualsevol proteïna<sup>(99)</sup>.

Tal i com s'ha descrit en apartats anteriors, l'hemoglobina glucosilada, a partir de les conclusions obtingudes en els estudis DCCT i UKPDS, ha revolucionat la monitorització de la diabetis per part dels professionals sanitaris esdevenint la pedra angular en l'avaluació del control metabòlic dels pacients diabètics.

En humans adults sans, l'hemoglobina consisteix en aproximadament un 97% d'hemoglobina A<sub>0</sub>, un 2,5% d'hemoglobina A<sub>2</sub> i un 0,5% d'hemoglobina F o hemoglobina fetal<sup>(43,101)</sup>. Si s'efectua una separació de l'hemoglobina per mètodes cromatogràfics, hom pot observar diversos pics menors dins la fracció d'hemoglobina A identificats com a hemoglobina A<sub>1</sub>. Aquesta hemoglobina A<sub>1</sub>, inclou diverses formes d'hemoglobina glucosilada que s'han identificat com hemoglobina A<sub>1a</sub>, hemoglobina A<sub>1b</sub> i hemoglobina A<sub>1c</sub>. Aquesta nomenclatura es va establir segons l'ordre en que el·luïen emprant tècniques cromatogràfiques aquestes tres fraccions de l'hemoglobina A<sub>1</sub><sup>(102)</sup>. A la figura següent (figura 16) es pot observar la imatge típica d'un cromatograma on s'observa la separació de les diferents fraccions d'hemoglobina glicada. La identificació de la substància es realitza a través del seu temps de retenció i la seva quantificació en funció de l'àrea de pic del component considerat.



**Figura 16: Cromatograma on es mostren les diferents fraccions d'hemoglobina en sang humana.**

La producció de tres fraccions d'hemoglobina glicada es deu a que dins la pròpia molècula d'hemoglobina existeixen nombrosos punts per on, potencialment, pot

produir-se la glucosilació. Un dels punts per on la molècula d'hemoglobina pot glucosilar-se fàcilment és la zona corresponent als residus valina N-terminal de les cadenes alfa i beta que conformen la molècula. Encara que aquest és el punt majoritari per on pot glucosilar-se l'hemoglobina, també existeixen altres punts de glucosilació secundaris com, per exemple, el residu lisina en posició 8 respecte l'extrem N-terminal de la cadena beta<sup>(103-106)</sup>.

L'hemoglobina A<sub>1c</sub>, és la principal forma d'hemoglobina glucosilada que es troba en humans.

### 1.8.1 DEFINICIÓ QUÍMICA

L'hemoglobina glucosilada es defineix com l'adducte estable de la glucosa i el grup amino N-terminal de la cadena beta de l'hemoglobina A<sub>0</sub><sup>(107,108)</sup>.

### 1.8.2 NOMENCLATURA I UNITATS<sup>(107)</sup>

Químicament, l'hemoglobina A<sub>1c</sub> rep el següent nom: N-(1-deoxifructosil)hemoglobina.

Un document preparat pel Comitè de Nomenclatura, Propietats i Unitats IFCC-IUPAC (C-NPU; Committee on Nomenclature, Properties and Units-International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine-International Union of Pure and Applied Chemistry) que ha estat aprovat per les societats nacionals afiliades a la IFCC, proposa el nom sistemàtic per a anomenar l'hemoglobina glucosilada com:

- Cadena beta de l'hemoglobina(San)—N-(1-desoxifructos-1-il)cadena beta de l'hemoglobina.

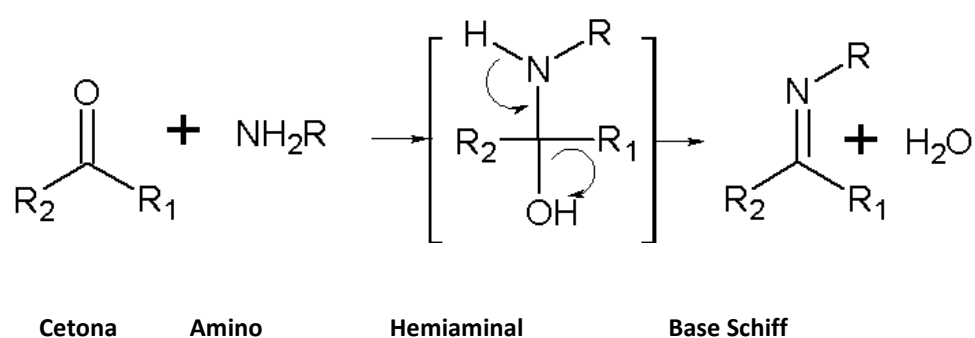
Tot i la idoneïtat d'aquest nom, el document només recomana el seu ús quan aquest es refereix a hemoglobina A<sub>1c</sub> mesurada específicament amb el mètode de referència de la IFCC. No es recomana el seu ús quan l'hemoglobina A<sub>1c</sub> es mesura mitjançant mètodes de mesura de rutina al laboratori clínic ja que no es mesura específicament hemoglobina A<sub>1c</sub> (veure apartats posteriors).

Els resultats de mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$  s'informen com el quocient entre la concentració d'hemoglobina  $A_{1c}$  i la concentració d'hemoglobina  $A_0$  en forma de percentatge, d'aquesta forma és com s'expressen els resultats obtinguts segons els sistemes d'estandarització suec, japonès i nord-americà. No obstant, la IUPAC recomana que les unitats emprades en la mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$  mitjançant el mètode de referència o mètodes calibrats de forma traçable al mètode de referència de la IFCC siguin milimols d'hemoglobina  $A_{1c}$  per mol d'hemoglobina  $A_0$  (mmol/mol).

### 1.8.3 FORMACIÓ DE L'HEMOGLOBINA GLUCOSILADA<sup>(43)</sup>

La reacció de la glucosa amb l'hemoglobina per a formar hemoglobina glucosilada transcorre en diverses etapes.

La primera etapa és la formació d'una base de Schiff. La base de Schiff es forma a partir de la reacció dels grups funcionals aldehyd, aportat per la molècula de glucosa, i el grup funcional amina, aportat per la cadena beta de l'hemoglobina (figura 17). La reacció del grup carbonil amb el grup amino forma un producte intermedi de reacció anomenat hemiaminal. Els hemiaminals de les amines primàries, com és el cas de la formació d'hemoglobina  $A_{1c}$ , es deshidraten amb molta facilitat donant lloc a un doble enllaç carboni-nitrogen, grup funcional anomenat imina.



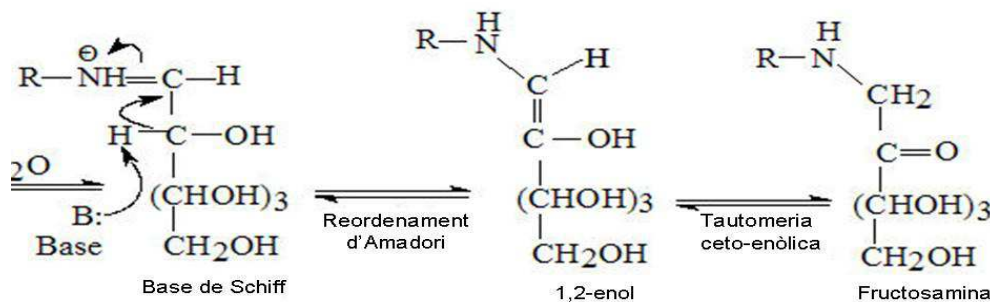
**Figura 17: Mecanisme químic de la formació de la base de Schiff. S'observa la formació de l'hemiaminal, a partir de compostos amb grup funcional ceto i compostos amb grup funcional amino, com a espècie química intermèdia i posterior deshidratació.**

La formació de les imines és reversible, és a dir que la condensació que té lloc entre la glucosa i la valina (residu que aporta el grup amino) pot anar en sentit contrari.

L'hemoglobina glucosilada formada en aquesta primera etapa, estrictament, és hemoglobina A<sub>1c</sub>, però se l'anomena fracció làbil degut, precisament, al caràcter reversible d'aquesta primera reacció.

La base de Schiff, pot seguir una sèrie de processos químics que transformaran l'hemoglobina A<sub>1c</sub> en una molècula més estable i que formarà la fracció estable de l'hemoglobina A<sub>1c</sub>.

Per a formar la fracció estable, la base de Schiff, sofreix un procés químic anomenat reordenació d'Amadori (figura 18). Aquesta reacció, amb un equilibri molt desplaçat cap a la formació de productes, forma una cetoamina estable que es considera la fracció estable de l'hemoglobina glucosilada.



**Figura 18: Reordenament d'Amadori a partir d'una base de Schiff per formar la cetoamina (fructosamina) estable en el residu valina N-terminal de la cadena beta de l'hemoglobina.**

#### 1.8.4 SIGNIFICAT I UTILITAT CLÍNICA DE L'HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

La formació de l'hemoglobina glucosilada, com totes les reaccions químiques, està subjecta a la Llei d'Acció de Masses. Per tant, la formació d'hemoglobina A<sub>1c</sub> estarà tant més afavorida com major sigui la concentració de glucosa en la sang del pacient.

La glucosa pot travessar lliurement la membrana de l'eritròcit, per tant, com més alta sigui la concentració de glucosa en l'ambient en el qual es troba l'eritròcit, més afavorida es veu la formació d'hemoglobina A<sub>1c</sub>.

L'eritròcit té una vida mitjana aproximada de 120 dies. En quan ha tingut lloc la reordenació d'Amadori, l'hemoglobina A<sub>1c</sub> romandrà durant tot el temps de vida de

l'eritròcit. És per aquest motiu que l'hemoglobina  $A_{1c}$  reflecteix de forma força aproximada les concentracions de glucosa en la sang del pacient.

Com s'ha esmentat en l'apartat de diagnòstic de la diabetis mellitus, la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$ , ja és actualment criteri diagnòstic de la malaltia. Per altra banda, des de la publicació dels estudis DCCT i UKPDS, la mesura de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$  s'ha emprat fonamentalment per al control metabòlic dels pacients.

Les guies clíniques actuals fan les següents recomanacions respecte la utilització de la mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$  per al control del tractament de pacients diabètics<sup>(60)</sup>:

1. Efectuar la mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$  almenys dues vegades l'any en pacients que assoleixen els objectius de tractament o tenen un control de les concentracions de glucosa estable.
2. Efectuar la mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$  trimestralment en aquells pacients als quals se'ls ha canviat el tractament o no assoleixen els objectius de tractament.

L'actual objectiu de control metabòlic dels pacients diabètics està establert en un percentatge d'hemoglobina  $A_{1c}$  del 7% (segons calibració traçable a l'esquema d'estandardització NGSP) de forma general i es recomana un canvi de tractament en aquells pacients que superen o igualen un 8%. L'interval de referència de l'hemoglobina  $A_{1c}$  està establert en xifres del 4,0 al 6,0%. Cal mencionar, però, que aquestes xifres s'han extret dels estàndards de tractament publicats per l'ADA l'any 2010 i estan basats en mètodes traçables al sistema d'estandardització nord-americà NGSP. Aquestes xifres poden variar significativament segons el sistema pel qual està estandarditzat el sistema de mesura emprat<sup>(60)</sup>.

#### **1.8.5 MÈTODES DE MESURA DE L'HEMOGLOBINA $A_{1c}$**

Existeixen diferents mètodes per a la mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$  i aquests mètodes s'han basat, fonamentalment en les característiques físiques o químiques de les diferents espècies, glucosilades o no, de l'hemoglobina<sup>(109)</sup>:

1. Diferències en la seva càrrega elèctrica
2. Diferències estructurals

### 3. Diferències en la reactivitat química

A continuació, es mostra un resum dels mètodes segons la característica físico-química de l'hemoglobina A<sub>1c</sub> que aprofiten:

- Diferències en la càrrega
  - o Electroendòsmosi en agar
  - o Electroforesi en gel d'agarosa
  - o Cromatografia d'intercanvi iònic
  - o Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)
- Diferències en l'estructura química
  - o Cromatografia d'afinitat
  - o HPLC d'afinitat
  - o Immunoassajos

Un dels fonaments de la separació és que la unió d'una molècula de glucosa a l'aminoàcid valina N-terminal de la cadena beta de l'hemoglobina resulta en una lleugera diferència en la càrrega de l'hemoglobina A<sub>1c</sub> respecte a l'hemoglobina no glucosilada. Aquest fet, produeix un canvi en el seu patró de migració en el marc d'un camp elèctric o una resina d'intercanvi iònic, fent possible la seva separació<sup>(109)</sup>.

En el cas dels canvis en l'estructura química s'aprofiten per a fer reaccionar la molècula amb un reactiu, sigui aquest un suport de fase sòlida per a cromatografia o un anticòs que reaccioni específicament amb algun punt de la molècula.

A la dècada de 1950<sup>(102)</sup> ja es van descriure els primers mètodes per a la separació de fraccions minoritàries d'hemoglobina. Aquests mètodes, però, eren extraordinàriament laboriosos. No fou fins l'any 1971, que Trivelli i col·laboradors desenvoluparen una tècnica de separació la qual emprava columnes d'intercanvi catiònic curtes. Posteriorment al seu pas per la columna, les fraccions separades eren quantificades mitjançant espectrofotometria a una longitud d'ona de 415 nm<sup>(110)</sup>.

Al llarg de la dècada de 1970 es van anar perfeccionant, els mètodes de Trivelli, amb l'ús de “mini columnes” cromatogràfiques per a poder-los comercialitzar i poder implantar-los en la rutina dels laboratoris clínics, encara que només permetien la mesura de la proporció de l'hemoglobina A<sub>1</sub> total, és a dir, la suma d'hemoglobina A<sub>1a</sub>, A<sub>1b</sub> i A<sub>1c</sub>. A més, aquests mètodes tenien tendència a mostrar una pobra reproductibilitat

dels resultats degut a una important dependència de les condicions de pH i temperatura, interferències lipèmiques i a la impossibilitat de separació de la fracció làbil d'hemoglobina A<sub>1c</sub> (base de Schiff)<sup>(111,112)</sup>.

No va ésser fins l'any 1983, que es va comercialitzar un mètode per a mesurar específicament hemoglobina A<sub>1c</sub>. En el desenvolupament d'aquest mètode es salvaren les limitacions dels mètodes anteriors com la presència d'interferències i la baixa reproductibilitat<sup>(109)</sup>.

En l'actualitat, els mètodes més emprats en els laboratoris clínics són els següents:

- Cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)
  - o HPLC d'intercanvi catiònic
  - o HPLC d'afinitat
- Electroforesi
- Immunoassajos
  - o Immunturbidimetria
- Separació d'afinitat amb àcid borònic

No és objecte d'aquesta introducció comentar cadascuna de les tècniques que permeten, actualment, quantificar la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub> en els laboratoris clínics. No obstant, en aquest estudi, s'ha emprat el mètode més freqüent per a la mesura de la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub> que és HPLC mitjançant columnes d'intercanvi catiònic (veure apartat de Material i Mètodes).

## **1.9 PROGRAMES NACIONALS D'ESTANDARDITZACIÓ DE MESURES D'HEMOGLOBINA A<sub>1c</sub>**

### **1.9.1 PRIMERES INICIATIVES D'ESTANDARITZACIÓ**

Amb la publicació dels estudis DCCT i UKPDS, es va proposar la mesura de la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub> com a pedra angular en l'avaluació del control metabòlic dels pacients diabètics, ja que els seus augments estaven directament relacionats amb el risc de patir complicacions cròniques de la malaltia.

A pesar de la seva importància, ben aviat es va fer evident que la manca d'estandardització de resultats de mesura d'hemoglobina A<sub>1c</sub> feia impossible la

comparació de resultats entre laboratoris, ja que els diferents mètodes emprats proporcionaven resultats diferents. Aquestes diferències es van posar de manifest mitjançant diversos estudis<sup>(113-116)</sup>. La manca d'un mètode de referència d'elevada qualitat metrològica, juntament amb l'absència de materials de referència primaris d'alta puresa, feia difícil l'harmonització de resultats.

Per fer front a aquesta mancança, es van posar en marxa tres iniciatives de caràcter nacional per a millorar la comparabilitat de resultats entre laboratoris. Aquestes iniciatives, basades en mètodes escollits arbitràriament i que no compleixen requisits per a ser considerats mètodes de referència (com, per exemple, falta d'especificitat), es van posar en marxa a Japó, Regne Unit i Suècia. Aquest fet s'emmarca en estudis anteriors al desenvolupament d'aquests esquemes nacionals d'estandardització, en què demostraven que la comparabilitat de resultats entre laboratoris millora de forma molt important en el cas que tots els mètodes es calibrin amb el mateix lot de calibradors o bé s'ajustin a esquemes d'estandardització basats, si no en un mètode de referència d'elevada qualitat metrològica, sí en mètodes de comparació designats de forma arbitrària<sup>(117-118)</sup>. A continuació s'explica el fonament de cadascuna d'aquestes iniciatives d'estandardització.

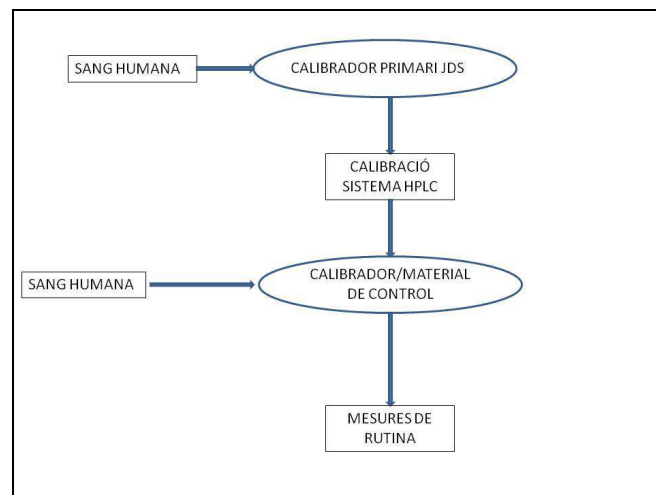
#### **1.9.1.1 Japanese Diabetes Society/Japanese Society of Clinical Chemistry (JDS/JSCC)<sup>(119)</sup>**

La base del sistema d'estandardització japonès són calibradors nacionals. L'any 1995, la Japan Diabetes Society, va desenvolupar un primer lot de calibradors<sup>(120)</sup>. Els valors d'aquests primers calibradors es va assignar mitjançant els mètodes HPLC d'intercanvi catiònic de TOSOH i Kyoto Daiichi. La raó per la qual es van escollir aquest dos mètodes fou que la gran majoria de laboratoris japonesos empraven en la seva pràctica rutinària un d'aquests dos mètodes.

Amb aquest primer lot de calibradors, es procedia a la calibració d'aquests mètodes HPLC i, posteriorment, es podien assignar valors a materials de calibració secundaris. A partir d'aquí, es va aconseguir que la gran majoria de laboratoris clínics japonesos calibressin els analitzadors que empraven de forma rutinària de forma traçable a aquest primer lot de calibradors.

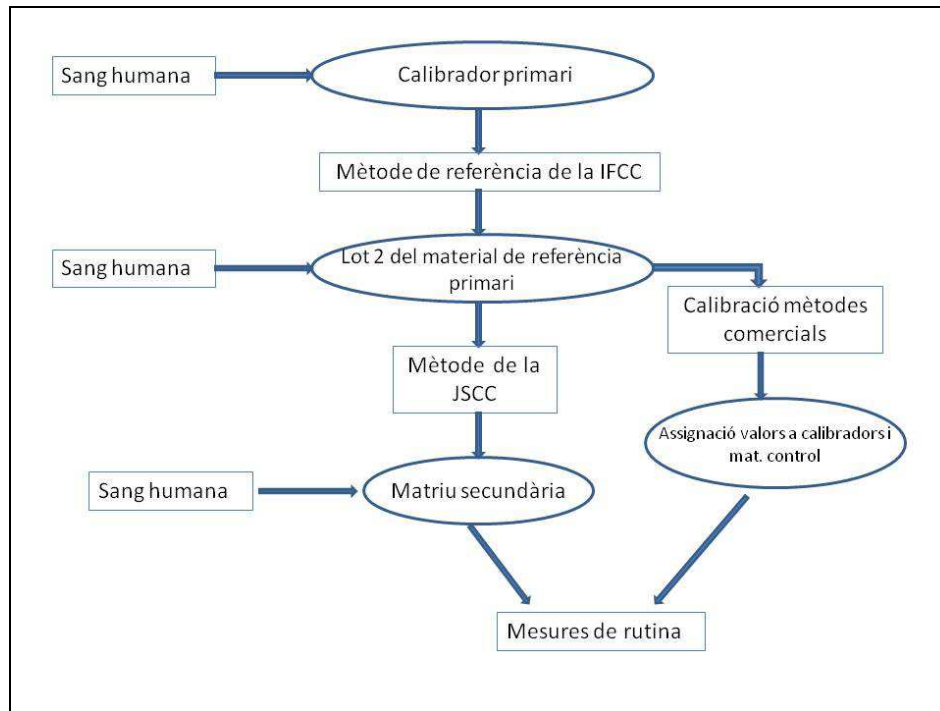
En la figura 19, es mostra un diagrama de flux on es descriu, de forma resumida, el procés d'estandardització, a nivell nacional, de les mesures d'hemoglobina  $A_{1c}$  a partir del primer lot de calibradors del sistema. Aquest primer lot es va emprar durant aproximadament sis anys, des de l'any 1995 fins l'any 2001<sup>(121)</sup>.

Amb el pas del temps el primer lot de calibradors es va anar esgotant i es va fer necessària la creació d'un segon lot de calibradors. Al mateix temps, la Japanese Society of Clinical Chemistry va desenvolupar un nou mètode d'HPLC (KO500) d'intercanvi iònic amb major resolució que l'utilitzat a l'inici del programa d'estandardització<sup>(122)</sup>. D'aquesta manera, els valors d'hemoglobina  $A_{1c}$  al lot 2 de calibradors es va assignar mitjançant aquest nou mètode HPLC KO500. No obstant, la calibració inicial d'aquest nou mètode es va fer de forma ajustada al primer lot de calibradors.



**Figura 19: Esquema sistema d'estandardització japonès JDS/JSCC amb el lot 1 de calibradors primaris (Ref. 121).**

La figura següent (figura 20) mostra l'esquema de preparació i estandardització del sistema JDS/JSCC a partir del lot 2 de material de referència utilitzat des de l'any 2001. Cal mencionar que l'assignació dels valors d'aquest lot de calibradors es va efectuar mitjançant el mètode de referència de la IFCC<sup>(108)</sup>. Per la seva banda, els materials de calibració primaris, es van preparar a partir de barreges d'hemoglobina  $A_0$  i hemoglobina  $A_{1c}$ , l'origen de les quals fou sang humana.



**Figura 20: Esquema d'estandardització JDS/JSCC a partir del lot 2 de calibradors. (Adaptat de Tominaga M. et al. Ref. 121).**

### 1.9.1.2 National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)<sup>(123)</sup>

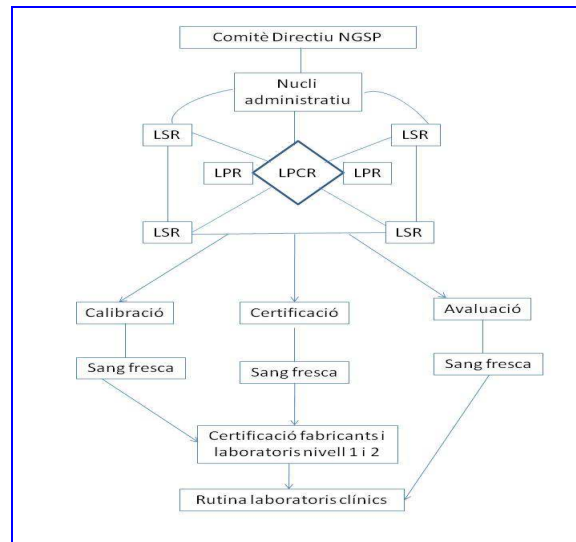
Aquesta iniciativa d'estandardització va ser la proposada als Estats Units posteriorment a que l'estudi DCCT mostrés la relació entre l'hemoglobina  $A_{1c}$  i el risc de complicacions de la diabetis. Aquest esquema d'estandardització es basa en el sistema HPLC d'intercanvi iònic que utilitza resina Bio-Rex 70<sup>(124)</sup>. Aquest mètode HPLC va ser l'escollit per dues raons fonamentals. En primer lloc té una gran estabilitat a llarg termini. En segon lloc, fou el mètode emprat per a les mesures d'hemoglobina  $A_{1c}$  de l'estudi DCCT. Per tant, tot instrument amb certificació de traçabilitat NGSP proporciona resultats directament relacionats amb l'estudi DCCT.

El sistema està basat en una xarxa de laboratoris<sup>(123)</sup> (figura 21). En primer lloc, el laboratori primari central de referència. Aquest laboratori estableix la calibració inicial de referència per a tot el sistema amb HPLC equipat amb resines Bio-Rex 70.

En segon lloc, els laboratoris primaris de referència. Al igual que el laboratori central primari de referència, també fan servir el mètode HPLC equipat amb Bio-Rex 70. Intercanvien constantment mostres amb el laboratori primari central de referència i

permetrien mantenir en funcionament tot el sistema encara que el laboratori central no pogués seguir de forma eventual amb la seva tasca<sup>(123)</sup>.

En tercer lloc, els laboratoris secundaris de referència. Aquests, treballen directament amb els fabricants de la indústria de diagnòstic *in vitro* per tal d'assessorar-los en l'estandardització dels seus mètodes i en proporcionar-los dades d'intercomparació per a la obtenció de la certificació de traçabilitat NGSP<sup>(123)</sup>.



**Figura 21: Esquema de l'organització i processos del sistema d'estandardització nord-americà NGSP.**

**LPCR: Laboratori Primari Central de Referència, LPR: Laboratori Primari de Referència, LSR: Laboratori Secundari de Referència. (Adaptat de: Little R, 2003; Ref. 123).**

### 1.9.1.3 Sistema d'estandarització suec<sup>(125)</sup>

Aquest esquema d'estandardització es basa en el mètode Mono-S d'Amersham Biosciences. Mensualment, a quaranta hospitals suecs, se'ls envien mostres de sang per a que les analitzin mitjançant diversos sistemes HPLC. Cinc d'ells utilitzen el sistema Mono-S en forma de xarxa de laboratoris nacionals. Aquests laboratoris, s'utilitzen per a la calibració de tots els instruments de mesura d'hemoglobina A<sub>1c</sub> de Suècia cada dos anys.

Amb aquestes tres iniciatives d'estandardització va millorar de forma considerable la qualitat dels resultats d'hemoglobina A<sub>1c</sub> que proporcionaven els laboratoris clínics. La gran majoria de laboratoris dels Estats Units proporcionaven resultats traçables al sistema NGSP, la gran majoria dels japonesos al sistema JDS/JSCC i els laboratoris suecs feien traçables els seus resultats al seu sistema d'estandardització. Degut a aquesta

coexistència de tres esquemes d'estandardització, els resultats proporcionats entre diversos laboratoris continuaven sense ésser comparables. Per tant, era necessari establir un únic mètode de referència internacional al qual fer traçables els resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$ .

## **1.10 ESTANDARDITZACIÓ GLOBAL DE MESURES D'HEMOGLOBINA GLUCOSILADA**

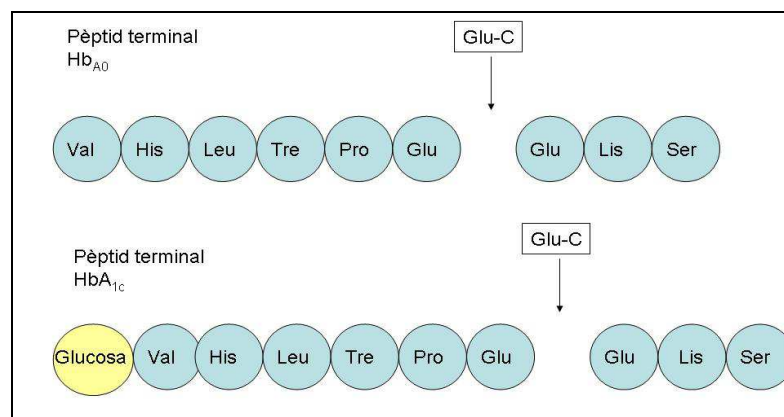
### **1.10.1 MÈTODE DE REFERÈNCIA DE LA IFCC PER A LA MESURA D'HEMOGLOBINA $A_{1c}$ <sup>(108)</sup>**

El primer pas important vers la consecució de l'estandardització mundial de les mesures d'hemoglobina glucosilada fou la creació del Grup de Treball de la IFCC per a l'hemoglobina  $A_{1c}$ <sup>(126)</sup>. Els objectius que aquest grup havia d'aconseguir eren fonamentalment cinc:

1. Producció de materials de referència altament purificats d'hemoglobina  $A_{1c}$  i hemoglobina  $A_0$ <sup>(127)</sup>.
2. Desenvolupament d'un mètode de referència per a la mesura específica d'hemoglobina  $A_{1c}$  en sang humana<sup>(108)</sup>.
3. Implementació d'una xarxa de laboratoris de referència.
4. Posada en marxa d'estudis per a avaluar la relació existent entre el mètode de referència desenvolupat i els mètodes designats de comparació dels Estats Units, Japó i Suècia que ja estaven implantats<sup>(128)</sup>.
5. Producció de materials de referència secundaris per a la seva distribució a la indústria del diagnòstic *in vitro* per referenciar-se al mètode de referència.

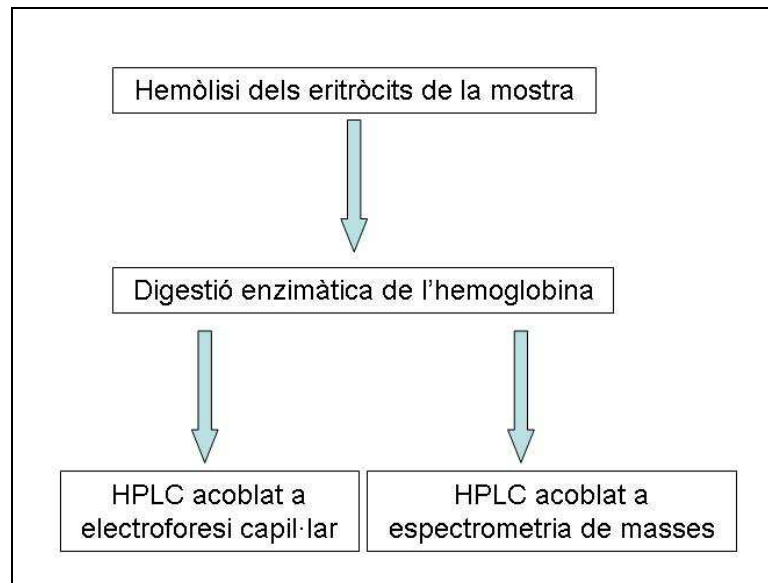
L'any 2002 es va publicar un treball en el que es descrivia l'obtenció de materials de referència primaris d'hemoglobina  $A_0$  i hemoglobina  $A_{1c}$  d'elevada puresa i el mètode de referència per a mesurar específicament hemoglobina  $A_{1c}$  en sang humana. En realitat, en aquest treball no es descrivia un únic mètode de referència sinó que se'n desenvolupaven dos que es demostrava que eren equivalents. A continuació es descriu el principi del mètode de referència de la IFCC<sup>(108)</sup>.

En un primer pas es realitza un rentat i hemòlisi dels eritròcits presents a la mostra per tal d'alliberar-ne l'hemoglobina que contenen. Posteriorment, l'hemoglobina alliberada és hidrolitzada mitjançant l'enzim amb activitat endoproteïnasa Glu-C (figura 22). Amb aquesta hidròlisis s'alliberen els hexapèptids N-terminals de les cadenes beta de l'hemoglobina A<sub>0</sub> i A<sub>1c</sub>. L'elecció de l'endoproteïnasa Glu-C no va ser casual. Podria obtenir-se fàcilment l'octapèptid N-terminal de la cadena beta de l'hemoglobina mitjançant una digestió amb tripsina. No obstant, la vuitena posició d'aquest octapèptid l'ocuparia l'aminoàcid lisina i aquest és un punt potencial de glicosilació. La glicosilació d'aquest punt, doncs, podria ser font d'interferències en mostres amb elevat contingut en hemoglobina glucosilada.



**Figura 22: Digestió proteolítica per a l'obtenció dels pèptids N-terminals de la cadena beta de l'hemoglobina. (Adaptat de: Jeppsson 2002, ref. 108).**

Per a la mesura de la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub> es poden utilitzar les dues tècniques demostrades com a equivalents (figura 23). La primera d'elles consisteix en una separació mitjançant HPLC acoblat a un sistema d'espectrometria de masses per ionització electrospray. La segona consisteix també en una separació mitjançant un sistema HPLC però acoblat a electroforesi capil·lar amb detector fotomètric a una longitud d'ona de 214 nm.



**Figura 23: Representació esquemàtica del procediment de referència de la IFCC.** (Adaptat de: Jeppsson, JO 2002, ref. 108).

Per a la calibració dels mètodes de referència es van desenvolupar materials de referència primaris que consistien en hemoglobina  $A_0$  i  $A_{1c}$  en forma altament pura<sup>(127)</sup>. Aquests materials estan disponibles a través de l'Institute for Reference Materials and Measurements amb els codis d'identificació IRMM 466 i 467 per a l'hemoglobina  $A_0$  i l'hemoglobina  $A_{1c}$ , respectivament. A partir de barreges d'aquests materials de referència es van obtenir sis solucions amb diferents proporcions d'hemoglobina glucosilada per a la calibració dels mètodes de referència.

### 1.10.2 SISTEMA DE REFERÈNCIA DE LA IFCC

El desenvolupament d'un mètode de referència és un pas important vers l'estandardització de les mesures de qualsevol magnitud. No obstant, és necessari la creació d'un sistema per garantir la traçabilitat del resultat obtingut a l'analitzador emprat a la rutina del laboratori clínic fins al mètode de referència.

Tal i com s'exposarà més endavant, el desenvolupament del mètode de referència i del seu sistema de referència, no només permeten a qualsevol laboratori clínic fer traçables els seus resultats d'hemoglobina glucosilada al sistema de major qualitat metrològica sinó que, a més a més, l'estandardització de mesures de laboratori permetrà fer que els resultats obtinguts siguin intercanviables en l'espai i en el temps. Aquest fet té una

notable importància, ja que d'aquesta manera s'aconsegueix millorar de forma molt significativa l'atenció al pacient i, a més, es permet l'aplicació universal de resultats d'estudis clínics i recomanacions de guies de pràctica clínica que s'han desenvolupat en diferents llocs o moments.

Per a poder posar en marxa un sistema d'estandardització de mesures era necessari, en primer lloc, disposar dels seus dos elements clau, el procediment de referència i el material de referència. De fet, la principal causa de manca d'estandardització de mesures en l'àmbit del laboratori clínic ve donat perquè encara no s'han desenvolupat aquests dos elements clau.

L'Organització Internacional d'Estandardització (ISO), ha publicat diversos documents en que s'esmenta la importància de la millora en els resultats que proporciona un laboratori i la millora de la seva comparabilitat obtinguda a partir de materials i sistemes de referència internacionalment reconeguts. En el cas del component que ens ocupa en aquest treball, l'hemoglobina glucosilada, la posada en marxa dels esquemes nacionals d'estandardització va permetre una millora substancial en la qualitat i intercanviabilitat dels resultats, no obstant, no eren sistemes basats en els dos elements bàsics dels sistemes internacionals de referència.

Per altra banda, apareix el problema de la incertesa de mesura. En els procediments no estandarditzats segons procediments i materials de referència internacionalment acceptats, la incertesa de mesura no està controlada. En el sistema de referència de la IFCC, com en qualsevol altre, existeix una incertesa en l'assignació dels valors als calibradors primaris, que es transfereix inevitablement als resultats finals. Certament, la incertesa de mesura augmenta a mesura que es baixa a través de la cadena de traçabilitat dels resultats, però a diferència del que succeeix en procediments no estandarditzats, aquesta incertesa es pot quantificar i documentar.

En últim lloc, cal esmentar també el problema de la commutabilitat. La commutabilitat d'un material és la capacitat que té un calibrador o un material de referència de comportar-se analíticament com ho faria una mostra humana real. Només es pot acceptar un sistema de referència si els materials utilitzats en el seu establiment són commutables amb mostres d'origen humà.

En la figura següent (figura 24), es mostra l'esquema del sistema de referència per a l'estandardització de les mesures d'hemoglobina  $A_{1c}$  basat en el mètode de referència IFCC.

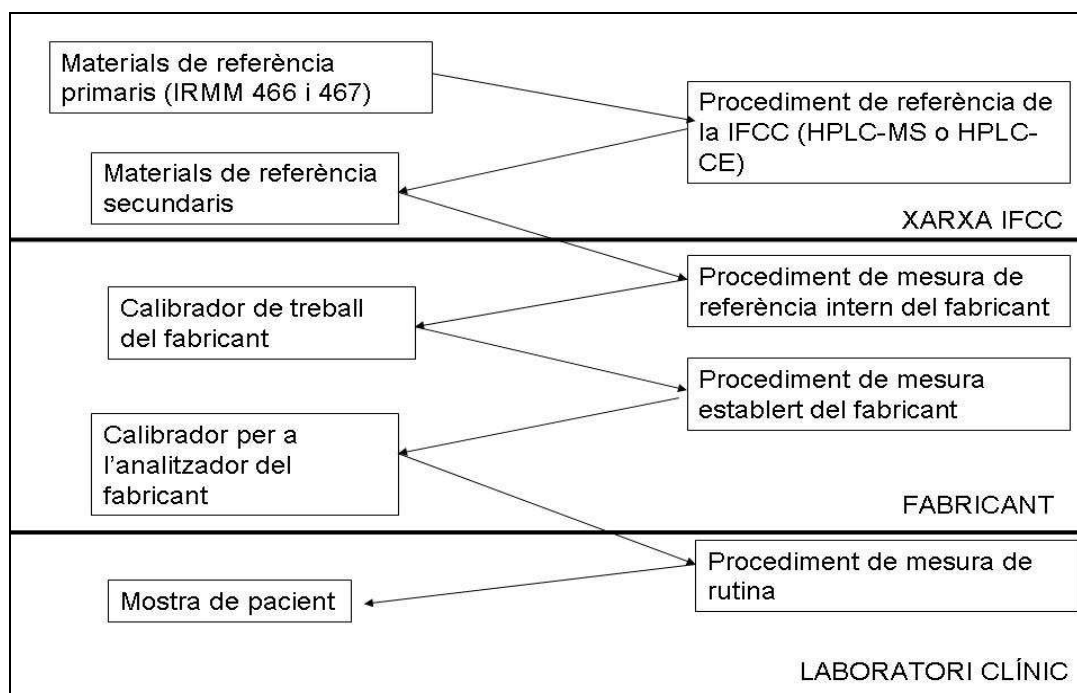


Figura 24: Cadena de traçabilitat de resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$ . (Adaptat de: Mosca A et al, 2007, ref. 129).

### 1.10.3 RELACIÓ NUMÈRICA ENTRE EL MÈTODE DE REFERÈNCIA I ELS ESQUEMES NACIONALS D'ESTANDARDITZACIÓ<sup>(126)</sup>

Amb el desenvolupament del mètode de referència es van posar en circulació nous valors d'hemoglobina glucosilada. Degut a l'elevada especificitat del mètode de referència, els valors obtinguts eren considerablement més baixos que els produïts en calibracions traçables als esquemes NGSP, JDS/JSCC i suec. Aquests últims mètodes són menys específics que el de referència i en el pic cromatogràfic corresponent a l'hemoglobina  $A_{1c}$  coexisteixen amb ella altres substàncies que no ho són. Així mateix, aquests últims resultats continuaven essent de gran utilitat. Per exemple, els resultats traçables al sistema d'estandardització NGSP comunicaven directament amb els resultats clínics dels estudis DCCT i UKPDS, per tant, la introducció de nous valors numèrics podrien comportar confusió entre els professionals sanitaris. En aquest sentit, resultava essencial estudiar la relació numèrica existent entre el sistema de referència de la IFCC i els tres esquemes nacionals d'estandardització.

L'any 2004, Hoelzel i col·laboradors van elaborar un estudi<sup>(126)</sup> que permetés obtenir equacions de transformació de resultats pertanyents als sistemes d'estandardització nacionals a resultats traçables al sistema de referència de la IFCC. Aquest estudi multicèntric internacional constava en realitat de tres subestudis, un per a cada esquema d'estandardització, per a poder obtenir una equació per esquema nacional.

Es va poder observar, primer de tot, que la relació entre els resultats obtinguts pels sistemes d'harmonització de caràcter nacional i els resultats que emanaven del sistema de referència de la IFCC, estaven relacionats de forma lineal. Per tant, les equacions de transformació es van obtenir pel mètode de regressió lineal.

En segon lloc, s'observaren diferències estadísticament significatives entre els resultats que proporcionaven els sistemes arbitraris d'estandardització i els que proporcionava el mètode de referència. Aquest fet tampoc era estrany, ja que abans s'ha esmentat que els esquemes nacionals es basaven en mètodes no tan específics per a mesurar hemoglobina  $A_{1c}$  com el mètode de referència i que aquest últim, era el que proporcionava, lògicament, els resultats més baixos. Així, els resultats més alts eren aquells provinents del sistema NGSP i els més baixos els provinents del sistema d'harmonització suec. L'esquema JDS/JSCC produïa resultats intermitjos entre NGSP i el sistema suec.

El fet que existeixi una sòlida relació lineal entre els tres sistemes fa que alhora que es poden estandarditzar els resultats a nivell mundial mitjançant el nou mètode de referència, es pugui obtenir resultats amb els quals els professionals sanitaris estan altament familiaritzats i evitar una pèrdua de qualitat assistencial per confusió entre resultats de diferent naturalesa.

#### **1.10.4 CONSENS INTERNACIONAL D'ESTANDARDITZACIÓ DE MESURES D'HEMOGLOBINA $A_{1c}$**

L'any 2007, posteriorment a l'aparició del sistema de referència de la IFCC i la publicació de les equacions que relacionaven els quatre sistemes, l'ADA, la European Association for the Study of Diabetes, la IFCC i la International Diabetes Federation, van publicar de forma conjunta un document de consens<sup>(130,131)</sup> per tal d'assolir l'harmonització de resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$ . Les quatre associacions científiques van acordar els següents punts per establir l'estandardització global:

1. L'estandardització de resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$  ha de ser de caràcter mundial.
2. L'actual sistema de referència de la IFCC esdevé la única referència vàlida a partir de la qual implementar l'estandardització. Aquest punt implica la necessitat de calibrar els instruments d'acord amb la IFCC.
3. Els resultats que han d'aparèixer als informes de laboratori han de ser:
  - a. Resultats en unitats IFCC mmol/mol i
  - b. Resultats NGSP expressats en percentatge. Aquests s'han d'obtenir a partir de la transformació de resultats IFCC amb l'equació mestra desenvolupada a tal efecte.
4. Els objectius de concentracions de glucosa a aconseguir en pacients diabètics que apareguin en guies clíniques s'han d'expressar en unitats IFCC i NGSP.

#### **1.10.5 CONSENS NACIONAL D'HARMONITZACIÓ DE RESULTATS D'HEMOGLOBINA $A_{1c}$ A ESPANYA<sup>(132)</sup>**

Tenint en compte el consens exposat en l'apartat anterior, la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) conjuntament amb la Sociedad Española de Diabetes (SED), es va elaborar un document de caràcter nacional per tal de dur a terme l'estandardització a nivell estatal. Des del punt de vista formal, aquest document, publicat l'any 2009, és una transposició directa del consens internacional de ADA, IFCC, IDF i EASD a l'abast nacional, però amb algunes particularitats de caràcter pràctic i metrològic que no s'incloïen, o almenys no s'esmentaven explícitament, en el document internacional. Aquestes particularitats són:

1. La transformació de IFCC a NGSP s'ha d'efectuar de forma automàtica aplicant l'equació de transformació al sistema informàtic del laboratori.
2. La imprecisió, expressada com a coeficient de variació (CV%), dels mètodes utilitzats als laboratoris espanyols, hauria de ser inferior al 4%.
3. L'objectiu final d'imprecisió a assolir amb el procés d'harmonització es un coeficient de variació inferior al 2%.

4. En el cas que un determinat laboratori clínic calibri els seus analitzadors per informar resultats en unitats JDS/JSCC, s'aplicaria, si s'estima convenient, un període de transició en el qual s'informarien resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$  en unitats JDS/JSCC i unitats NGSP.

### **1.11 RELACIONS MATEMÀTIQUES ENTRE HEMOGLOBINA $A_{1c}$ I CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA**

#### **1.11.1 CONCENTRACIONS MITJANES ESTIMADES DE GLUCOSA**

Com es desprèn de l'exposició anterior, l'hemoglobina  $A_{1c}$ , és el millor paràmetre d'avaluació de l'estat metabòlic d'un pacient diabètic<sup>(45,133,134)</sup>. Aquest fet és degut a la clara relació entre els nivells d'hemoglobina  $A_{1c}$  i l'aparició de complicacions de la malaltia. A més a més, l'hemoglobina glucosilada és ara una nova eina diagnòstica de la diabetis i els objectius de control dels pacients s'estableixen en base als seus resultats.

La realitat, però, és força més complexa per diversos motius. En primer lloc, existeixen diversos mètodes per a la mesura de la proporció d'hemoglobina glucosilada. En segon lloc, existien fins fa poc temps tres esquemes d'estandardització de resultats que proporcionaven resultats significativament diferents entre ells<sup>(126)</sup>. En tercer lloc, el mètode de referència va començar el procés d'estandardització de mesures, però va comportar informar de resultats d'hemoglobina glicada més baixos dels que s'havia informat fins llavors. Per últim, en quart lloc, el control metabòlic en el dia a dia del pacient té poc a veure amb l'hemoglobina  $A_{1c}$ .

Els pacients diabètics controlen de forma regular, quasi diàriament, les seves concentracions sanguínies de glucosa mitjançant glucòmetres de sang capil·lar. Aquests glucòmetres, en la seva majoria, expressen les concentracions de glucosa en mg/dL. Si les proporcions d'hemoglobina glucosilada s'expressen en tant per cent o en milimols per mol, la concentració de glucosa al domicili del pacient en mg/dL i al seu centre d'atenció mèdica en milimols per litre, les discrepàncies sorgides són un problema de primer ordre.

Als pacients els pot resultar difícil comprendre el valor d'un resultat d'hemoglobina glucosilada, una informació radicalment diferent del que els mostra el glucòmetre del seu domicili. Per altra banda, el professional sanitari té la difícil tasca de traduir la

informació que aporta l'hemoglobina A<sub>1c</sub> a dades que el pacient pugui comprendre. Era necessari disposar d'una eina que transformés els resultats d'hemoglobina glucosilada en concentracions de glucosa mitjanes eliminant una important font de confusió.

Diversos treballs ja havien estudiat la relació numèrica existent entre l'hemoglobina A<sub>1c</sub> i les concentracions de glucosa en sang de les 5 a 12 setmanes prèvies<sup>(135-142)</sup>. No obstant, aquests estudis presentaven algunes limitacions importants com mesura de concentracions de glucosa en sang capil·lar poc freqüent i cohorts de pacient relativament petites compostes, principalment, d'individus diabètics de tipus 1<sup>(135-140)</sup>.

En aquest sentit, es va posar en marxa un estudi multicèntric internacional<sup>(143)</sup> per estimar les concentracions de glucosa mitjanes a partir d'un valor donat d'hemoglobina glucosilada. En aquest estudi, mitjançant regressió lineal simple es van obtenir les següents equacions de transformació:

$$\text{GME}_{\text{mg/dL}} = 28,7 * \text{HbA}_{1c}[\text{NGSP}(\%)] - 46,7$$

$$\text{GME}_{\text{mmol/L}} = 1,59 * \text{HbA}_{1c}[\text{NGSP}(\%)] - 2,59$$

Essent GME, Glucosa Mitjana Estimada i el coeficient de correlació  $R^2 = 0,84$ .

Els resultats d'aquest estudi proporcionaven una evidència sòlida que la interpretació de l'hemoglobina A<sub>1c</sub> com a concentracions de glucosa mitjana estimada de forma semblant a com es realitza entre la concentració de creatinini i la taxa de filtració glomerular, permet informar als pacients d'una forma més acurada del seu control metabòlic.

Posteriorment, el document de consens per a l'estandardització de resultats d'hemoglobina A<sub>1c</sub>, recomanaria la introducció de l'estimació de la concentració mitjana de glucosa juntament amb els resultats d'hemoglobina glicada en els informes de laboratori que s'emetessin. Tot i això, el document espanyol de consens d'estandardització, no recomana, pel moment, la utilització d'aquests resultats degut a la manca d'evidència científica disponible<sup>(132)</sup>.

En aquest sentit, ens trobem davant la situació que per a l'avaluació del control del pacient diabètic existeixen diferents magnituds per al seu estudi. És per això, que resulta essencial l'estudi de les relacions que poden existir entre aquestes magnituds, ja que no

és infreqüent trobar-nos en situacions en que, si bé l'hemoglobina glicada indica un bon control metabòlic del pacient, la concentració de glucosa basal en el pacient estigui molt per sobre del límit superior de l'interval de referència, informant-se d'aquesta manera dues magnituds amb un significat clínic que podria ser contradictori.

### **1.12 UTILITAT DE LA MESURA DE LES CONCENTRACIONS BASALS DE GLUCOSA**

El principal motiu pel qual es va decidir estudiar la utilitat de la mesura de les concentracions basals de glucosa en sèrum, va ser que durant la validació clínica de resultats del Laboratori Clínic de l'Hospital Universitari de Bellvitge, corresponents a proves de control de diabetis, s'observava una proporció de malalts que, si bé tenien la proporció d'hemoglobina glicada per sota del punt de tall de bon control metabòlic, les seves concentracions sèriques de glucosa en dejú estaven anormalment elevades.

Des de la introducció de l'hemoglobina glicada com a patró or per a l'avaluació del control de la malaltia, la mesura de les concentracions sèriques basals de glucosa ha passat a un segon pla. Aquesta magnitud, segons les guies clíniques de l'ADA tindria com a principal utilitat el diagnòstic de diabetis si la concentració de glucosa es trobés per sobre de 7 mmol/L en una mesura rutinària d'un pacient no diagnosticat de la malaltia<sup>(6)</sup>.

No obstant, cal tenir en compte que, tot i la importància que té actualment la mesura de la proporció d'hemoglobina glicada tant per al diagnòstic com per al seguiment de la malaltia, la mesura de les concentracions de glucosa en sang o sèrum són encara molt importants. De fet, no cal perdre de vista que la mesura de les concentracions de glucosa, encara ara, serveixen per al diagnòstic i seguiment de la diabetis mellitus. De fet, no només la mesura de les concentracions de glucosa després d'un dejuni de 8 hores, sinó d'altres mesures després de la ingestió d'una determinada quantitat de glucosa.

Per tant, es pretén avaluar l'eficiència diagnòstica i, per tant, la possible utilitat clínica, de la mesura de les concentracions basals de glucosa per a l'avaluació del control metabòlic respecte l'hemoglobina glicada, per avaluar si pot constituir una eina adequada per a l'avaluació de pacients diabètics en casos en que es pot donar la situació contradictòria abans mencionada.

### **1.13 PROBLEMA PRÀCTIC EN LES EQUACIONS DE TRANSFORMACIÓ DE RESULTATS D'HEMOGLOBINA $A_{1c}$**

Les equacions de transformació de resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$  han resultat d'extraordinària importància d'ençà la introducció dels diferents sistemes d'estandardització. Aquest fet venia donat perquè els tres sistemes d'estandardització proporcionaven valors d'hemoglobina  $A_{1c}$  significativament diferents i es requeria adequar els resultats obtinguts directament dels analitzadors als resultats clínicament útils per als professionals sanitaris.

No obstant, existeix un problema important respecte les equacions desenvolupades anteriorment. Aquestes equacions es van obtenir mitjançant un estudi multicèntric però es va emprar un nombre de mostres considerablement baix per al seu desenvolupament, menys de 30 mostres concretament. És per aquest motiu, que convindria obtenir equacions de transformació de resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$  amb un nombre molt major de mostres, per tal de dotar d'una gran robustesa matemàtica a aquestes expressions.

Aquest fet és extraordinàriament important en el laboratori clínic, ja que una de les seves funcions primordials és l'obtenció d'informació d'alta fiabilitat per al diagnòstic, el seguiment o la prevenció de diferents malalties. Per aquest motiu, l'obtenció d'equacions de transformació mitjançant l'ús d'un nombre elevat de mostres dotaria a aquestes expressions matemàtiques d'una robustesa molt major i, per tant, la seva fiabilitat es veuria considerablement augmentada.

## 2. OBJECTIUS

Per al present treball s'han establert els següents objectius:

1. Desenvolupar dues equacions de transformació de valors d'hemoglobina glicada traçables al sistema de referència de la IFCC a valors traçables als sistemes d'estandardització japonès (JDS/JSCC) i nord-americà (NGSP) d'elevada robustesa.
2. Estudiar les possibles diferències que puguin donar-se entre els valors d'hemoglobina glicada obtinguts mitjançant les equacions prèviament publicades i les desenvolupades en el present treball amb els seus valors homòlegs obtinguts directament de l'analitzador.
3. Comprovar l'assoliment dels estàndards d'imprecisió recomanats.
4. Estudiar les implicacions clíniques dels resultats obtinguts:
  - a. Estudiar l'associació entre la concentració de glucosa mitjana estimada i les concentracions de glucosa en sang mesurades després d'un dejú de 8 hores.
  - b. Estudiar l'associació entre la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$  i la concentració de glucosa en sang mesurada després d'un dejú de 8 hores.
  - c. Estudiar les diferències de diagnòstic de bon control metabòlic utilitzant la concentració de glucosa en sang després d'un dejú de 8 hores.

### **3. MATERIAL I MÈTODES**

#### **3.1 OBTENCIÓ DE LES EQUACIONS DE TRANSFORMACIÓ DE RESULTATS**

##### **3.1.1 Disseny de l'estudi**

Aquest estudi es va portar a terme en dues fases. La primera fase, va consistir en l'obtenció de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina  $A_{1c}$  JDS/JSCC a valors IFCC. En una segona fase, previ canvi i re-calibració de les columnes cromatogràfiques dels instruments, es va procedir a l'obtenció de l'equació de transformació de valors NGSP a valors IFCC.

##### **3.1.2 Analitzadors**

Per a la realització d'aquest estudi, es van emprar dos instruments HPLC automatitzats model *HA-8160* (Menarini Diagnósticos, Espanya/Arkay Inc. Japó) equipats amb columnes cromatogràfiques d'intercanvi catiónic en fase reversa (*Column Unit – HSVI – VP*, Arkay Inc. Japó) per a efectuar les mesures d'hemoglobina  $A_{1c}$  (figura 25). El mètode de detecció que utilitzen aquests instruments és el d'espectrometria d'absorció molecular amb UV.

Aquests instruments permeten ésser carregats amb fins a 100 mostres per sèrie. El temps de processament automàtic és de 2,9 minuts per mostra amb una sortida d'aproximadament 20 resultats cada hora. Aquests instruments es van seleccionar ja que permeten separar bé les diferents fraccions d'hemoglobina i no presenten interferències per variants d'hemoglobina, adductes urèmics o hemoglobina acetilada. Els pics d'hemoglobina variants s'exclouen de l'àrea d'integració i, per tant, no s'inclogueren en la determinació final de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}^{(109)}$ .



**Figura 25: Analitzador HPLC per a la mesura de proporcions d'hemoglobina A<sub>1c</sub> que es va utilitzar en el present estudi.**

En ambdós instruments es van emprar els mateixos lots de materials de calibració, de reactius eluents i de materials de control. D'aquesta manera es minimitzava la possible variabilitat analítica entre els dos analitzadors causada per la diferent composició que podria haver-hi en els diferents lots d'aquests materials. Aquesta estratègia garanteix que l'única diferència entre els dos instruments sigui la de la calibració que se'ls va efectuar.

Tant a l'inici de la primera fase de l'estudi, com a l'inici de la segona, es van instal·lar i calibrar columnes cromatogràfiques noves als instruments.

### **3.1.2.1 Calibració dels analitzadors**

Ambdós instruments van ésser calibrats de forma diferent. Un d'ells va ser calibrat amb calibradors amb valors assignats de forma traçable al sistema de referència de la IFCC<sup>(108)</sup>. Els materials de calibració, proporcionats per *Menarini Diagnósticos* (Barcelona, Espanya), tenen certificació internacional que garanteix que l'assignació de valors és traçable als materials de referència primaris desenvolupats per al sistema de referència de la IFCC.

El segon instrument va ésser calibrat de dues formes diferents. En la primera fase de l'estudi va ésser calibrat de forma traçable a l'esquema d'estandardització japonès JDS/JSCC<sup>(119)</sup> que utilitza, en l'assignació de valors als calibradors, el sistema HPLC

amb columnes d'intercanvi catiònic KO500. Per tant, aquesta calibració era traçable al lot 2 dels materials de referència desenvolupats específicament per a aquest esquema d'estandardització<sup>(121)</sup>.

A la segona fase de l'estudi, es va calibrar aquest mateix instrument de nou, però aquest cop de forma traçable al sistema de referència de la NGSP<sup>(123)</sup>.

Els lots de materials de calibració emprats en aquest estudi (amb certificació de traçabilitat als materials de referència de l'esquema d'estandardització JDS/JSCC i el mètode de referència de la IFCC) foren els descrits a continuació en les taules 2 i 3 que es mostren a continuació:

**Taula 2. Valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> JDS/JSCC i IFCC assignats als calibradors emprats a la primera fase de l'estudi.**

|                                                       | Número de lot | ESQUEMA JDS | ESQUEMA IFCC |
|-------------------------------------------------------|---------------|-------------|--------------|
| Valor calibrador 1<br>Hemoglobina A <sub>1c</sub> (%) | 200801        | 5,1         | 3,9          |
| Valor calibrador 2<br>Hemoglobina A <sub>1c</sub> (%) | 200801        | 10,6        | 9,1          |

**Taula 3. Valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> NGSP i IFCC assignats als calibradors emprats a la segona fase de l'estudi.**

|                                                       | Número de lot | ESQUEMA NGSP | ESQUEMA IFCC |
|-------------------------------------------------------|---------------|--------------|--------------|
| Valor calibrador 1<br>Hemoglobina A <sub>1c</sub> (%) | 200802        | 5,9          | 5,3          |
| Valor calibrador 2<br>Hemoglobina A <sub>1c</sub> (%) | 200802        | 10,9         | 9,3          |

### 3.1.3 Control intern de la qualitat

Per al control intern de la qualitat es van utilitzar els següents materials de control. En primer lloc, *Lyphocheck Diabetes Control* (BioRad Laboratories, Hercules, Califòrnia, EUA) y *Glyco Hb Control* (Menarini Diagnostics, Florència, Itàlia). Els materials de control es van preparar i al·liquotar tal i com es descriu a continuació prenent com a base la publicació de Marrón i col·laboradors, en que es constata una millora important en la imprecisió i el considerable estalvi econòmic que comporta<sup>(144)</sup>.

En la preparació de *Glyco Hb Control*, s'afegien 200 µL d'aigua destil·lada a cada vial de material de control liofil·litzat. Un cop addicionada l'aigua, es tapava el vial i es

deixava reposar la solució durant 10 minuts. Un cop transcorreguts 10 minuts, s'agitava suaument el vial procurant evitar la formació d'escuma bo i comprovant que el material liofil·litzat havia quedat completament reconstituït i no s'observava la presència de grumolls. Es transferien 10 µL d'aquesta solució mare a tubs proveïts de tap de rosca que tanquessin hermèticament. Aquestes al·líquotes ja preparades, s'emmagatzemaven a -80 °C fins a la seva utilització. En el moment del seu ús, s'afegia 1 mL de solució hemolitzant H utilitzada per als analitzadors HA-8160, s'agitava suaument evitant la formació d'escuma i eren immediatament processades.

La preparació dels materials de control *Lyphocheck Diabetes Control*, era similar a la descrita per als *Glyco Hb Control*. L'única diferència fou que la reconstitució del vial primari que contenia el material liofil·litzat s'efectuava amb 500 µL d'aigua destil·lada, tal i com indica el fabricant del producte.

Es processaven dues al·líquotes de cada material de control, una de valor baix i una altra de valor alt, de cadascun dels materials de control, a l'inici i al final de cada sèrie de mesures en ambdós analitzadors. D'aquesta forma s'obtenien un total de 16 resultats de control intern de la qualitat per cada sèrie de mesures efectuada.

L'acceptació de la sèrie analítica implicava, necessàriament, que tots els resultats de control estiguessin dins de l'interval de control corresponent. El cas que un dels resultats escapés fora de l'interval de control implicava el rebuig complet de la sèrie.

En el cas de les sèries de mesures efectuades per a l'obtenció de l'equació de transformació de resultats d'hemoglobina A<sub>1c</sub> IFCC a resultats JDS/JSCC, els intervals de control per als materials *Lyphocheck Diabetes Control* emprats en el control intern de la qualitat de l'instrument calibrat de forma traçable a l'esquema d'estandardització JDS/JSCC es van obtenir al nostre laboratori. Aquests intervals es van obtenir de la següent manera:

Es processaren 30 mostres de material de control de valor baix i valor alt en 30 dies consecutius. A partir d'aquests resultats, prèvia eliminació de valors estadísticament aberrants mitjançant la prova no paramètrica de Grubbs, es va calcular la seva mitjana aritmètica i la corresponent desviació estàndard. L'interval de control acceptable es va definir com la mitjana  $\pm 3,5$  desviacions estàndard<sup>(145)</sup>. Aquesta estratègia es va adoptar degut a que el material de control *Lyphocheck Diabetes Control* no estava valorat per a

l'esquema de calibració JDS/JSCC. En tots els altres casos, en les calibracions traçables als sistemes IFCC i NGSP, els intervals de control acceptats foren els proposats pels fabricants. Per una banda, BioRad Laboratories aporta valoració dels materials de control per als esquemes NGSP i IFCC. Per l'altra, els materials de Menarini Diagnostics estan valorats pels tres esquemes d'estandardització NGSP, JDS/JSCC i IFCC.

### 3.1.4 Mostres

Per a la realització d'aquest estudi s'empraren mostres de sang procedents de pacients atesos a l'Hospital Universitari de Bellvitge i del Laboratori Clínic del Centre d'Atenció Primària Just Oliveras de l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Espanya.

Les mostres es recollien en tubs que contenien EDTA dipotàssic o tripotàssic com a agents anticoagulants, essent el procediment d'extracció la punció venosa.

Per a la fase de l'estudi corresponent a l'obtenció de l'equació que relaciona l'esquema JDS/JSCC amb el mètode de referència IFCC es van processar un total de 3002 mostres a les que es va efectuar la mesura de la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub>. 2000 d'aquestes mostres es van emprar per a l'obtenció de l'equació i els restants 1002 resultats es van emprar en la comparació de resultats proporcionats per les diferents equacions.

Per a la fase de l'estudi que implicava l'obtenció de l'equació que relacionava l'esquema NGSP amb el mètode de referència de la IFCC, es van emprar 3001 mostres. De la mateixa manera que en l'equació JDS/JSCC vs IFCC, 2000 d'aquestes mostres s'empraren en l'obtenció de l'equació i 1001 es van utilitzar en la comparació estadística de les diferents equacions.

### 3.1.5 Mètodes estadístics

El tractament estadístic de les dades obtingudes en aquest estudi es va efectuar mitjançant els programes informàtics *Analyze-It*<sup>®</sup> versió 1.50 (Analyze-It Software Ltd, Leeds, Regne Unit) i *SPSS*<sup>®</sup> *Statistics* versió 17.0 (Statistical Package for Social Sciences, IBM, Somers, Nova York, EUA) . El software *Analyze-It*<sup>®</sup> es va emprar per a

efectuar la regressió lineal. Tots els altres càlculs i proves estadístiques es van realitzar amb el programa *SPSS® Statistics*.

Tal i com es descriu al treball de Gestainger i col·laboradors<sup>(146)</sup>, per a l'obtenció d'equacions de transformació de resultats analítics, s'hauria d'utilitzar el mètode de regressió de Deming per tal d'evitar el biaix produït en l'estimació de la pendent i l'ordenada en origen. No obstant, tal i com recomana el National Committee of Clinical Laboratory Standards a la seva guia EP9-A2<sup>(147)</sup>, per a l'estimació de l'equació pot utilitzar-se el mètode de regressió lineal simple en el cas que el coeficient de correlació entre les dues variables estudiades sigui superior a 0,975, com és el cas del present treball i es mostra a la secció de resultats.

Per a estudiar si els resultats de mesura obtinguts es distribuïen segons la Llei de Laplace-Gauss, s'emprà la prova de Kolmogorov-Smirnov amb un interval de confiança del 95%.

Per a la comparació dels resultats obtinguts directament de l'analitzador amb aquells homòlegs obtinguts mitjançant transformació amb les equacions obtingudes en aquest estudi i les anteriorment publicades, s'empraren proves de comparació de mesures de tendència central per a dades aparellades.

### **3.2 ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE GLUCOSA MITJANA ESTIMADA I CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA EN SANG DESPRÉS D'UN DEJÚ DE 8 HORES**

#### **3.2.1 Mostres**

Per a realitzar l'estudi de l'associació entre aquestes dues variables es van utilitzar mostres de 953 pacients atesos a l'Hospital Universitari de Bellvitge.

Els resultats de mesura d'hemoglobina glicada es van obtenir mitjançant mostres de sang obtingudes mitjançant punció venosa recollides en tubs amb EDTA dipotàssic o tripotàssic com additiu.

Les mostres per a la mesura de la concentració de glucosa després d'un dejú de 8 hores es van obtenir també per punció venosa però recollint la sang en un tub amb gel

separador. Posteriorment a la retracció del coàgul sanguini al tub de mostra, es procedí a la centrifugació del tub a temperatura ambient a  $2000 \times g$  durant 12 minuts.

Ambdues mostres foren obtingudes en el mateix moment.

### 3.2.2 Analitzadors

Els resultats de mesura d'hemoglobina glicada es van obtenir mitjançant el mateix analitzador emprat per a l'obtenció dels resultats necessaris per a desenvolupar les equacions de transformació, instruments HPLC automatitzats model *HA-8160* (Menarini Diagnósticos, Espanya/Arkray Inc. Japó) equipats amb columnes cromatogràfiques d'intercanvi catiónic en fase reversa (*Column Unit – HSVI – VP*, Arkray Inc. Japó). L'analitzador fou calibrat d'acord amb el sistema NGSP per fer traçables els resultats als estudis DCCT i UKPDS.

Per a la mesura de la concentració de glucosa es va emprar l'analitzador *Hitachi Modular* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanya) que utilitza com a mètode de mesura l'espectrometria d'absorció molecular amb lectura a 340 i 700 nm de longitud d'ona amb el mètode enzimàtic d'hexocinasa.

### 3.2.3 Càlcul de la concentració de glucosa mitjana estimada (GME)

La concentració de glucosa mitjana estimada fou calculada mitjançant l'equació de Nathan<sup>(143)</sup> que utilitza valors d'hemoglobina glicada traçables al sistema nord-americà NGSP. L'equació pren la forma següent:

$$\text{GME}_{\text{mmol/L}} = 1,59 * \text{HbA}_{1c}(\%) - 2,59$$

### 3.2.4 Anàlisi de dades

L'anàlisi de dades s'efectuà utilitzant el programa informàtic *SPSS® Statistics* versió 17.0 (Statistical Package for Social Sciences, IBM, Somers, Nova York, EUA) .

L'estudi de la relació entre ambdues variables es va realitzar de forma global amb tot el grup de pacients estudiats i també subdividint la població segons les concentracions de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores. D'acord amb això, els pacients es dividiren en 3 grups segons la classificació de control de concentracions de glucosa que figuren a la guia clínica de l'ADA de l'any 2002<sup>(148)</sup>. Aquests grups són:

**Concentració de glucosa inferior a 6,7 mmol/L**

**Concentració de glucosa entre 6,7 i 7,8 mmol/L**

**Concentració de glucosa superior a 7,8 mmol/L**

Les dades s'expressen com a valor de la mitjana  $\pm$  desviació estàndard. Es considera com a estadísticament significatiu un valor de  $p < 0,05$ .

Per a determinar si la distribució dels valors de les variables obeïa a la Llei de Laplace-Gauss, s'efectuà la prova de Kolmogorov-Smirnov. Es compararen les parelles de dades de glucosa mitjana estimada i de concentracions de glucosa en sang després del dejú de 8 hores mitjançant la prova no paramètrica de Wilcoxon. Per a determinar la relació entre les dues variables, s'utilitzà el coeficient de correlació d'Spearman ( $r$ ).

Per altra banda, per a obtenir una equació que relacionés ambdues magnituds, s'emprà el mètode de regressió lineal simple o de Deming depenent de si el coeficient de correlació entre variables era superior o inferior a 0,975 respectivament.

### **3.3 ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE LA MITJANA DE LES CONCENTRACIONS BASALS DE GLUCOSA I LA PROPORCIÓ D'HEMOGLOBINA GLICADA**

Per a l'estudi d'aquesta relació, es van seleccionar de forma aleatòria 195 pacients atesos a l'Hospital Universitari de Bellvitge als quals se'ls hagués sol·licitat la determinació de la proporció d'hemoglobina glicada en sang i, alhora, es disposés de, com a mínim, 4 resultats de mesura de la concentració de glucosa en sèrum després d'un dejú de 8 hores en els tres mesos previs a la mesura d'hemoglobina glicada.

La determinació dels valors d'hemoglobina glicada i de les concentracions de glucosa es van realitzar de la mateixa manera descrita en els apartats anteriors. Degut a que

aquest estudi es va realitzar posteriorment a l'aplicació de les directrius del consens espanyol per a l'estandardització de mesures d'hemoglobina glicada<sup>(132)</sup>, els valors obtinguts de l'analitzador corresponien a valors traçables al sistema de referència de la IFCC. No obstant, aquests valors foren transformats a valors traçables al sistema NGSP mitjançant tan l'equació prèviament publicada<sup>(128)</sup> com la obtinguda en el present estudi. Això fou necessari per a poder comparar les expressions obtingudes segons l'equació emprada a més de poder correlacionar directament el resultat de glucosa en dejú mitjana estimada amb els estudis DCCT i UKPDS, ja que és el resultat d'hemoglobina glicada NGSP el que es relaciona directament amb l'aparició de complicacions cròniques.

Amb aquestes dades, es va efectuar el càlcul de la mitjana de les concentracions sèriques de glucosa en dejú i es va relacionar aquest valor amb el corresponent d'hemoglobina glicada per a cada pacient.

L'anàlisi estadístic realitzat per a l'obtenció de l'expressió matemàtica que relaciona ambdues variables fou el mateix que per a l'obtenció de les equacions de transformació de valors d'hemoglobina glicada. No obstant, de la mateixa manera que amb l'obtenció de l'equació que relaciona la concentració de glucosa mitjana estimada amb la proporció d'hemoglobina glicada, s'emprà el mètode de regressió lineal de Deming per a coeficients de correlació inferiors a 0,975.

### **3.4 ESTUDI DE LA CAPACITAT DIAGNÒSTICA DEL GRAU DE CONTROL METABÒLIC DE LES EQUACIONS DE TRANSFORMACIÓ I DE LA CONCENTRACIÓ BASAL DE GLUCOSA ENFRONT L'HEMOGLOBINA A<sub>1c</sub>**

Aquest estudi es va realitzar sobre una població de 956 pacients atesos a l'Hospital Universitari de Bellvitge. La mesura tant de la proporció d'hemoglobina glicada com de la concentració de glucosa en el sèrum és exactament la mateixa que la descrita en apartats anteriors. Els resultats d'hemoglobina glicada emprats foren els traçables a l'esquema nord-americà NGSP. Aquests valors d'hemoglobina glicada foren obtinguts directament de l'analitzador i per transformació de resultats IFCC mitjançant tant l'equació desenvolupada en el present estudi com amb l'equació prèviament publicada<sup>(128)</sup>.

Es considerava com a bon control metabòlic tot aquell resultat d'hemoglobina glicada inferior al 7% NGSP i mal control qualsevol resultat per sobre d'aquest punt de tall, tal i com es descriu a les guies de l'ADA<sup>(134)</sup>. En quant a la concentració basal de glucosa, no existeix un valor definit per a bon o mal control del pacient. En aquest cas els resultats de concentració basal de glucosa en sèrum superiors o iguals a 7 mmol/L es consideraren com indicadors de mal control de la malaltia. L'elecció d'aquest punt de tall, tot i que no estigui definit en cap guia clínica, es va escollir perquè és aquell que permet el diagnòstic de diabetis mellitus en qualsevol persona que el presenti de forma casual en un control analític. Per tant, és lògic pensar que una persona ja diagnosticada de diabetis, i per tant, sota una forma o altra de tractament (ja sigui per mesures higiènic-dietètiques o farmacològic), que presenti un resultat superior a aquesta xifra estarà mal controlada metabòlicament. Si aquest valor pot diagnosticar-li diabetis, no hauria de presentar-se en una persona sota control mèdic.

La prova de referència fou, evidentment, la mesura de la proporció d'hemoglobina glicada i la prova a avaluar fou la concentració basal de glucosa en el sèrum.

Les característiques diagnòstiques de la prova de la mesura de les concentracions basals de glucosa s'expressen mitjançant sensibilitat (S), especificitat (E), valor predictiu positiu (VPP) i valor predictiu negatiu (VPN).

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1 EQUACIÓ DE TRANSFORMACIÓ DE RESULTATS IFCC A RESULTATS JDS/JSCC

#### 4.1.1 CONTROL INTERN DE LA QUALITAT

Els resultats del control intern de la qualitat obtinguts mitjançant els dos analitzadors emprats en el present treball es mostren en les taules següents. Tal i com és habitual al laboratori clínic, els resultats del control intern es resumeixen mitjançant l'expressió de la mitjana aritmètica dels total de resultats de control obtinguts i la mesura de la dispersió dels resultats de control mitjançant la desviació estàndard i el coeficient de variació.

En aquestes dues primeres taules (taules 4 i 5) es presenten els resultats de control intern de la qualitat a l'inici i al final de cada sèrie analítica que s'obtingueren amb l'instrument calibrat de forma traçable al sistema d'estandardització japonès JDS/JSCC:

**Taula 4: Resultats de control intern de la qualitat a l'inici de la sèrie analítica en l'instrument calibrat segons l'esquema JDS/JSCC.**

|                         | BioRad 1      | BioRad 2      | Menarini 1  | Menarini 2   |
|-------------------------|---------------|---------------|-------------|--------------|
| Mitjana                 | 4,8 %         | 9,0 %         | 5,1 %       | 10,6 %       |
| Interval de control     | [4,62;4,68] % | [8,89;9,19] % | [4,0;6,0] % | [9,7;11,7] % |
| Desviació estàndard     | 0,063         | 0,064         | 0,126       | 0,092        |
| Coeficient variació (%) | 1,33          | 0,71          | 2,45        | 0,87         |

**Taula 5: Resultats de control intern de la qualitat al final de la sèrie analítica en l'instrument calibrat segons l'esquema JDS/JSCC.**

|                         | BioRad 1      | BioRad 2      | Menarini 1  | Menarini 2   |
|-------------------------|---------------|---------------|-------------|--------------|
| Mitjana                 | 4,8 %         | 9,0 %         | 5,1 %       | 10,6 %       |
| Interval de control     | [4,62;4,68] % | [8,89;9,19] % | [4,0;6,0] % | [9,7;11,7] % |
| Desviació estàndard     | 0,054         | 0,065         | 0,116       | 0,103        |
| Coeficient variació (%) | 1,13          | 0,72          | 2,27        | 0,97         |

En les dues taules següents (taules 6 i 7) es mostren els resultats que s'obtingueren en el control intern de la qualitat processats a l'inici i al final de la sèrie analítica amb l'instrument calibrat de forma traçable al sistema de referència de la IFCC:

**Taula 6: Resultats de control intern de la qualitat a l'inici de la sèrie analítica en l'instrument calibrat segons l'esquema IFCC.**

|                          | BioRad 1    | BioRad 2    | Menarini 1  | Menarini 2   |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Mitjana                  | 3,6 %       | 7,7 %       | 3,9 %       | 9,1 %        |
| Interval de control      | [2,9;4,2] % | [6,3;9,4] % | [3,0;5,0] % | [8,0;10,0] % |
| Desviació estàndard      | 0,063       | 0,095       | 0,118       | 0,11         |
| Coefficient variació (%) | 1,76        | 1,24        | 3,02        | 1,21         |

**Taula 7: Resultats de control intern de la qualitat al final de la sèrie analítica en l'instrument calibrat segons l'esquema IFCC.**

|                          | BioRad 1    | BioRad 2    | Menarini 1  | Menarini 2   |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Mitjana                  | 3,5 %       | 7,6 %       | 3,9 %       | 9,1 %        |
| Interval de control      | [2,9;4,2] % | [6,3;9,4] % | [3,0;5,0] % | [8,0;10,0] % |
| Desviació estàndard      | 0,069       | 0,085       | 0,112       | 0,096        |
| Coefficient variació (%) | 1,94        | 1,12        | 2,88        | 1,06         |

Aquests resultats confirmaven una adequada qualitat analítica del mètode HPLC HA-8160 utilitzat en aquest estudi per a la mesura de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$  per a l'obtenció de l'equació que permetia transformar valors IFCC d'hemoglobina  $A_{1c}$  en valors JDS/JSCC. De fet, els instruments emprats per aquest estudi van mostrar un excel·lent comportament metrològic (sobretot des del punt de vista de la imprecisió). Els resultats obtinguts mostraren coeficients de variació molt baixos, que referenden l'estabilitat del sistema de mesura al llarg del temps. Cal mencionar que no es va haver de rebutjar cap sèrie analítica per deficiències en el sistema de mesura, per tant, totes les sèries analítiques processades foren acceptades. A partir d'aquests resultats de control intern de la qualitat també és important recalcar que, si bé el procediment de mesura no era de la qualitat metrològica més elevada al tractar-se d'un procediment adaptat per al treball rutinari en un laboratori clínic, els resultats d'imprecisió obtinguts s'acostaven molt als resultats obtinguts amb el sistema de referència. Per tant, el sistema de mesura complia, de llarg, amb els requisits metrològics necessaris per al laboratori clínic. En aquest sentit, resulta especialment important remarcar la qualitat d'aquests resultats de

control intern ja que, durant el desenvolupament del procediment de referència de la IFCC, es va dur a terme un estudi d'intercomparació de resultats de control entre 11 laboratoris de referència. En aquest estudi, els resultats del coeficient de variació intralaboratorial (imprecisió de resultats dins un mateix laboratori) van oscil·lar entre el 0,47 i el 2,07%, essent la mitjana dels esmentats coeficients de variació del 1,76%, resultats molt similars als obtinguts en el nostre estudi, tot i que en aquest, no es va emprar més que un mètode de rutina. En aquest fet possiblement va tenir una influència cabdal la forma de preparació dels materials de control, explicat a la secció de material i mètodes. Per altra banda és important considerar un fenomen sorprenent tenint en compte els resultats de control que es van obtenir. Aquest fenomen es refereix al coeficient de variació relativament elevat del material de control nivell 1 de Menarini Diagnostics, el qual, respecte els altres materials va mostrar un coeficient de variació força més elevat, tot i que mai es van obtenir resultats fora de l'interval de control corresponent. No s'ha procedit en el present treball a l'estudi de les causes d'aquesta elevació en el coeficient de variació dels resultats de control en aquest material, no obstant, és possible que es tractés d'una anomalia puntual en el lot de material emprat, ja que, com es veurà posteriorment als resultats de control intern de la qualitat obtinguts en el transcurs de l'elaboració de la recta de regressió que relaciona els esquemes d'estandardització NGSP i IFCC, aquesta anomalia no es va observar.

#### **4.1.2 RESULTATS DE LES MOSTRES**

La mitjana aritmètica dels 2000 resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$  emprats per a l'obtenció de l'equació de transformació de resultats fou: 7,8 % JDS/JSCC i 6,3 % IFCC (63 mmol/mol). Els límits inferiors de la distribució de valors foren: 3,2 % JDS/JSCC i 2,0 % IFCC (20 mmol/mol). Per altra banda, els límits superiors de la distribució foren: 17,4 % JDS/JSCC i 15,4 % IFCC (154 mmol/mol). Aquestes xifres denoten l'ampli interval de valors emprat per a l'obtenció de l'equació. Un dels factors més importants a l'hora de realitzar l'equació de transformació de resultats fou que es requeria un interval de valors tan ampli com sigui possible. Per aquest motiu es sol·licitaren mostres al Laboratori Clínic Just Oliveras, ja que a l'Hospital Universitari de Bellvitge no s'aconseguien mostres amb valors prou elevats i en suficient quantitat com per obtenir una equació sòlida a valors alts. Un altre motiu és de caràcter matemàtic. En una recta

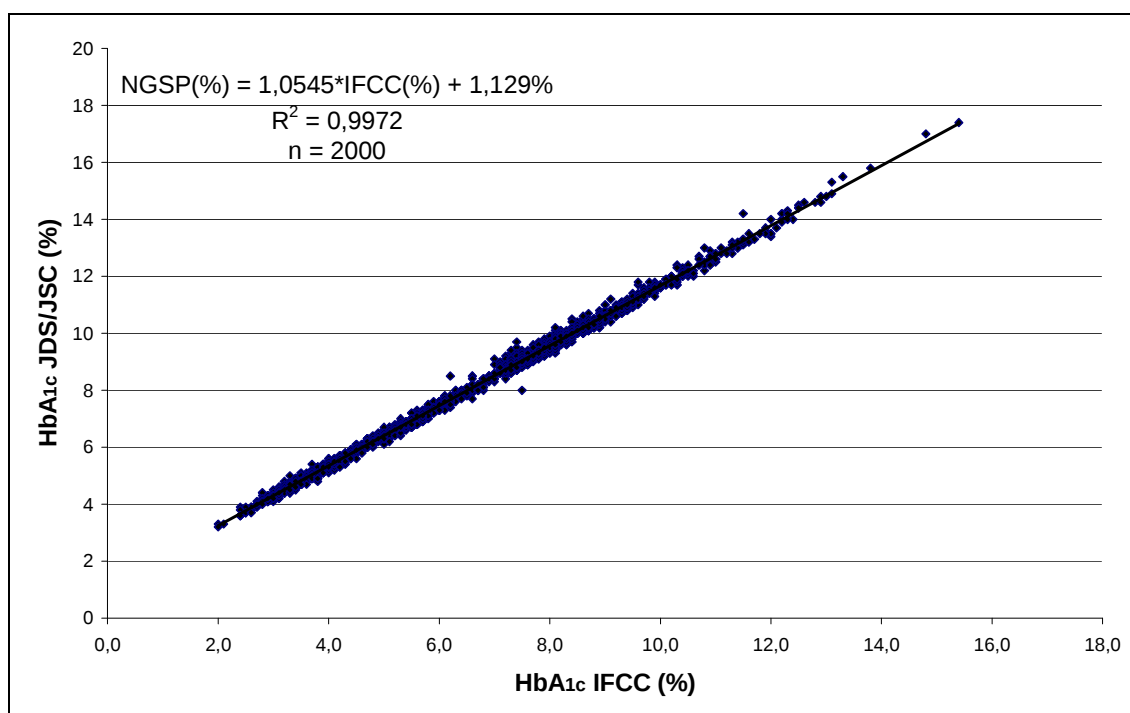
de regressió, les estimacions per a valors que queden per sobre o per sota dels límits superior i inferior de l'interval de valors no s'haurien de realitzar, ja que l'estimació no seria suficientment fiable. Tot i que seria teòricament possible obtenir valors d'hemoglobina glucosilada superiors als màxims trobats en les mostres emprades en aquest estudi, la probabilitat de trobar valors d'aquest tipus és força baixa. Cal tenir en compte, que la troballa de valors tan elevats en les mostres d'aquests pacients no representaria un problema greu en l'estimació dels seus resultats mitjançant les equacions que s'ha pretès desenvolupar en aquest estudi. El motiu és que, són valors tan alts que l'error que es pogués cometre en la seva estimació, mai influenciaria la semiologia del resultat.

#### 4.1.3 REGRESSIÓ LINEAL SIMPLE I EQUACIÓ DE TRANSFORMACIÓ DE RESULTATS

Mitjançant el mètode de regressió lineal simple es va obtenir la següent equació de transformació de resultats d'hemoglobina A<sub>1c</sub>.

$$\text{JDS/JSCC (\%)} = 1,0545 \cdot \text{IFCC (\%)} + 1,129 \quad (R^2 = 0,9972)$$

En el gràfic següent (figura 26) es mostra la recta de regressió obtinguda i l'equació corresponent:



**Figura 26: Recta de regressió i equació de transformació de resultats d'hemoglobina glicada IFCC a resultats JDS/JSCC.**

A la següent taula (taula 8) es resumeixen els estadístics descriptius bàsics dels resultats d'hemoglobina glicada emprats en l'anàlisi de regressió lineal simple per a l'obtenció de l'equació de transformació de valors IFCC a valors JDS/JSCC.

**Taula 8: Descriptius estadístics bàsics dels valors emprats per a l'obtenció de l'equació de resultats IFCC en resultats JDS/JSCC.**

|                               | Mitjana aritmètica | Desviació estàndard | Nombre de dades |
|-------------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| Resultats calibració JDS/JSCC | 7,804 %            | 2,575               | 2000            |
| Resultats calibració IFCC     | 6,33 %             | 2,4386              | 2000            |

Els resultats de l'estudi de correlació de Pearson, que es mostren a la taula següent (taula 9), demostren, tal i com ja s'havia descrit en estudis anteriors, una forta associació lineal entre les dues variables, és a dir, que els resultats provinents d'una calibració alineada amb el sistema d'estandardització japonès JDS/JSCC i els provinents d'una calibració traçable al sistema de referència de la IFCC estaven íntimament associats. Aquesta forta associació es podria traduir, en la pràctica, com a que les estimacions de resultats JDS/JSCC efectuades a partir de resultats IFCC serien fiables.

**Taula 9: Anàlisi de correlació de la recta de transformació de resultats IFCC en resultats JDS/JSCC.**

|                            |          | Resultats JDS/JSCC | Resultats IFCC |
|----------------------------|----------|--------------------|----------------|
| Correlació de Pearson      | JDS/JSCC | 1,000              | 0,997          |
|                            | IFCC     | 0,997              | 1,000          |
| Significació estadística P | JDS/JSCC | -                  | < 0,001        |
|                            | IFCC     | < 0,001            | -              |
| Nombre de dades            | JDS/JSCC | 2001               | 2001           |
|                            | IFCC     | 2001               | 2001           |

El resum dels resultats del model de regressió lineal simple aplicat en aquest estudi es mostra a la taula següent (taula 10). El coeficient de correlació múltiple R resultava ser de 0,999 establint-se una forta relació lineal entre les dues variables. Tal i com era d'esperar, el signe d'aquest coeficient de correlació múltiple era positiu indicant que l'increment en una de les variables implica un increment en l'altra. Aquest resultat resultava plenament coherent amb els estudis previs de Hoelzel i col·laboradors que estudiaven la relació numèrica entre els diferents sistemes d'estandardització<sup>(120)</sup>. Amb aquest coeficient de correlació de Pearson obtingut es podia derivar que la relació entre les dues variables és tan estreta des del punt de vista matemàtic, que era perfectament plausible realitzar l'estimació dels valors d'una variable a partir de valors de l'altra.

**Taula 10: Resum de la regressió lineal efectuada entre els valors d'hemoglobina glicada traçables al sistema de la IFCC i els valors traçables al sistema japonès JDS/JSCC.**

| R     | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup><br>Corregida | Error<br>típic de<br>l'estimació | Estadístics de canvi       |               |      |      |                                 | Durbin-<br>Watson |
|-------|----------------|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|---------------|------|------|---------------------------------|-------------------|
|       |                |                             |                                  | Canvi<br>en R <sup>2</sup> | Canvi<br>en X | GL 1 | GL 2 | Significació<br>del canvi<br>en |                   |
| 0,999 | 0,997          | 0,997                       | 0,1356                           | 0,997                      | 9093,536      | 1    | 1999 | < 0,001                         | 1,21              |

A la taula anterior (taula 10), a la columna en la que es mostra l'error típic de l'estimació, es pot observar que l'error en l'estimació de resultats JDS/JSCC a partir de resultats IFCC era petit.

El resultat de R<sup>2</sup> determinava la bondat de l'ajust lineal en un model com el descrit en aquest estudi. És la proporció de la variació de la variable dependent explicada pel model de regressió. Degut a que el seu valor és elevat (molt proper a 1), significa que el model s'ajustava de forma excel·lent a les dades emprades. Per motius estrictament formals, es mostra el valor de R<sup>2</sup> corregida. De fet, en una població general, les dades no s'ajusten linealment de forma tan bona com ho solen fer en les mostres avaluades, per tant, aquest estadístic intenta donar una idea força més precisa de la bondat d'ajust que s'establiria en la població. El valor igual a la R<sup>2</sup> no corregida implica que les estimacions poblacionals que es realitzarien a partir de l'equació desenvolupada serien correctes. Així mateix, el canvi en R<sup>2</sup> és elevat, per tant, és possible emprar la variable independent per a estimar la dependent de forma robusta.

Per a l'estudi de l'acceptabilitat del model de regressió lineal simple, es va procedir a realitzar-ne un anàlisi de variància (ANOVA), un resum del qual es mostra a la taula següent (taula 11):

**Taula 11: Anàlisi ANOVA de la regressió efectuada per a l'obtenció de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC en valors traçables a l'esquema JDS/JSCC.**

|                  | Suma de quadrats | GL   | Mitjana quadràtica | F        | Significació estadística |
|------------------|------------------|------|--------------------|----------|--------------------------|
| <b>Regressió</b> | 13224,68         | 1    | 13224,68           | 719093,5 | < 0,001                  |
| <b>Residual</b>  | 36,763           | 1999 | 0,018              |          |                          |
| <b>Total</b>     | 13261,443        | 2000 |                    |          |                          |

A partir d'aquest anàlisi de variància es pot analitzar de forma matemàtica la disposició dels punts i la bondat d'ajust de les dades al model. En aquest cas, tal i com es pot observar a la taula 11, el valor del residual és considerablement més petit que el valor de la regressió. Per tant, la quantitat d'error que contenen els resultats d'hemoglobina glicada JDS/JSCC estimats a partir de valors IFCC és també molt petita. Per tant, es pot considerar que les dades s'ajusten correctament al model de regressió lineal.

El detall sobre l'anàlisi estadístic que permet l'obtenció dels coeficients de l'equació de transformació de resultats es presenta a les taules que es mostren a continuació (taules 12 i 13). Aquests són els coeficients (pendent i ordenada en origen) emprats en l'equació de transformació de resultats IFCC a resultats JDS/JSCC.

**Taula 12: Anàlisi dels coeficients de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC a valors JDS/JSCC.**

|                           | Coeficients no estandarditzats |                    | Coeficients estandarditzats | Significació estadística |
|---------------------------|--------------------------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------|
|                           | <b>B</b>                       | <b>Error típic</b> | <b>Beta</b>                 |                          |
| <b>Ordenada en origen</b> | 1,129                          | 0,008              | 0,999                       | < 0,001                  |
| <b>Pendent</b>            | 1,054                          | 0,001              |                             | < 0,001                  |

A part de l'obtenció dels coeficients matemàtics que permeten la construcció de la recta de regressió per a la transformació de resultats, s'obté informació important dels

interval de confiança respecte aquests coeficients, sobretot de cara a realitzar una primera comparació de l'equació obtinguda en el present estudi i la prèviament publicada. Aquest fet dóna certa orientació de cara a comparar-les, ja que si els intervals de confiança dels coeficients de l'equació aquí descrita s'inclouen dins de l'interval de confiança de les equacions prèviament publicades, es podria afirmar que les equacions son comparables o perfectament equivalents entre elles. L'interval de confiança per a l'ordenada en origen en l'equació prèviament publicada és de 1,59 a 1,859 (en la desenvolupada en el present estudi es de 1,112 a 1,1146). Per al pendent, l'interval de confiança en l'equació prèviament publicada es de 0,907 a 0,948 (en la desenvolupada en el present estudi es de 1,052 a 1,057). Com es pot observar l'interval de confiança per als dos paràmetres que defineixen les equacions desenvolupades en el present estudi no s'inclouen en l'interval de confiança que defineix els paràmetres de l'equació prèviament publicada, per tant, les equacions serien lleugerament diferents, tot i que no de forma significativa, ja que les diferències són petites.

**Taula 13: Anàlisi dels intervals de confiança dels paràmetres de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC en valors JDS/JSCC.**

| Interval de confiança per<br>B al 95 % |                | Correlacions |         |             | Estadístics de colinealitat |     |
|----------------------------------------|----------------|--------------|---------|-------------|-----------------------------|-----|
| Límit superior                         | Límit inferior | Ordre zero   | Parcial | Semiparcial | Tolerància                  | FIV |
| 1,112                                  | 1,146          | 0,999        | 0,999   | 0,999       | 1                           | 1   |
| 1,052                                  | 1,057          |              |         |             |                             |     |

Per a valorar que l'estratègia de regressió emprada en aquest estudi és satisfactòria, es presenten els diagnòstics de colinealitat de l'estudi a la taula 14:

**Taula 14: Diagnòstics de colinealitat de l'estudi de regressió lineal.**

| Dimensió | Autovalor             | Índex de condició | Proporcions de la variància |    |         |
|----------|-----------------------|-------------------|-----------------------------|----|---------|
|          |                       |                   | Ordenada en origen          | en | Pendent |
| 1        | 1,933                 | 1,000             | 0,03                        |    | 0,03    |
| 2        | $6,681 \cdot 10^{-2}$ | 5,379             | 0,97                        |    | 0,97    |

A continuació (taula 15) es mostren els estadístics sobre els residuals de l'anàlisi de regressió:

Taula 15: Estadístics sobre els residuals de la regressió lineal aplicada a l'obtenció de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC a valors JDS/JSCC.

|                                | Mínim  | Màxim  | Mitjana aritmètica | Desviació típica | N    |
|--------------------------------|--------|--------|--------------------|------------------|------|
| <b>Valor pronosticat</b>       | 3,283  | 17,368 | 7,804              | 2,5714           | 2001 |
| <b>Residu brut</b>             | -1,038 | 0,945  | 0,000              | 0,1356           | 2001 |
| <b>Valor pronosticat tipus</b> | -1,776 | 3,719  | 0,000              | 1                | 2001 |
| <b>Residu tipus</b>            | -7,651 | 6,966  | 0,000              | 1                | 2001 |

## 4.2 EQUACIÓ DE TRANSFORMACIÓ DE RESULTATS IFCC A RESULTATS NGSP

### 4.2.1 CONTROL INTERN DE LA QUALITAT

Els resultats del control intern de la qualitat obtinguts mitjançant els dos analitzadors emprats en el present treball es mostren en les taules següents. De la mateixa manera com s'ha exposat en l'anterior apartat 4.1.1, es resumeixen els resultats del control intern mitjançant l'expressió de la mitjana aritmètica dels total de resultats de control obtinguts i la mesura de la dispersió dels resultats de control mitjançant la desviació estàndard i el coeficient de variació.

En aquestes dues primeres taules (taules 16 i 17) es presenten els resultats de control intern de la qualitat a l'inici i al final de cada sèrie analítica obtinguts amb l'instrument calibrat de forma traçable al sistema d'estandardització nord-americà NGSP:

Taula 16: Resultats de control intern de la qualitat a l'inici de la sèrie analítica en l'instrument calibrat segons l'esquema NGSP.

|                                | BioRad 1    | BioRad 2     | Menarini 1  | Menarini 2    |
|--------------------------------|-------------|--------------|-------------|---------------|
| <b>Mitjana</b>                 | 5,5 %       | 9,5 %        | 5,7 %       | 10,9 %        |
| <b>Interval de control</b>     | [4,3;6,4] % | [7,4;11,1] % | [5,2;7,2] % | [10,2;12,2] % |
| <b>Desviació estàndard</b>     | 0,037       | 0,1          | 0,06        | 0,09          |
| <b>Coeficient variació (%)</b> | 0,68        | 1,05         | 1,04        | 0,82          |

**Taula 17: Resultats de control intern de la qualitat al final de la sèrie analítica en l'instrument calibrat segons l'esquema NGSP.**

|                                 | BioRad 1    | BioRad 2     | Menarini 1  | Menarini 2    |
|---------------------------------|-------------|--------------|-------------|---------------|
| <b>Mitjana</b>                  | 5,5 %       | 9,5 %        | 5,8 %       | 10,9 %        |
| <b>Interval de control</b>      | [4,3;6,4] % | [7,4;11,1] % | [5,2;7,2] % | [10,2;12,2] % |
| <b>Desviació estàndard</b>      | 0,041       | 0,077        | 0,052       | 0,091         |
| <b>Coefficient variació (%)</b> | 0,76        | 0,81         | 0,9         | 0,83          |

En les dues taules següents (taules 18 i 19) es mostren els resultats obtinguts en el control intern de la qualitat processats a l'inici i al final de la sèrie analítica obtinguts amb l'instrument calibrat de forma traçable al sistema de referència de la IFCC:

**Taula 18: Resultats de control intern de la qualitat a l'inici de la sèrie analítica en l'instrument calibrat de forma traçable al mètode de referència de la IFCC.**

|                                 | BioRad 1    | BioRad 2    | Menarini 1  | Menarini 2   |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>Mitjana</b>                  | 3,7 %       | 8,1 %       | 4,0 %       | 9,6 %        |
| <b>Interval de control</b>      | [2,9;4,2] % | [6,3;9,4] % | [3,4;5,4] % | [8,8;10,8] % |
| <b>Desviació estàndard</b>      | 0,05        | 0,062       | 0,023       | 0,054        |
| <b>Coefficient variació (%)</b> | 1,35        | 0,77        | 0,57        | 0,56         |

**Taula 19: Resultats de control intern de la qualitat al final de la sèrie analítica en l'instrument calibrat de forma traçable al sistema de referència de la IFCC.**

|                                 | BioRad 1    | BioRad 2    | Menarini 1  | Menarini 2   |
|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| <b>Mitjana</b>                  | 3,7 %       | 8,1 %       | 4,0 %       | 9,6 %        |
| <b>Interval de control</b>      | [2,9;4,2] % | [6,3;9,4] % | [3,4;5,4] % | [8,8;10,8] % |
| <b>Desviació estàndard</b>      | 0,069       | 0,085       | 0,000       | 0,024        |
| <b>Coefficient variació (%)</b> | 1,19        | 0,58        | 0           | 1,06         |

Aquests resultats confirmen de nou, tal i com ja s'ha exposat en l'apartat 4.1.1, una adequada qualitat analítica del mètode HPLC HA-8160 utilitzat en aquest estudi per a l'obtenció dels resultats de mesura de la proporció d'hemoglobina A<sub>1c</sub> necessaris per al desenvolupament de l'equació que permet transformar valors IFCC d'hemoglobina A<sub>1c</sub> en valors traçables al sistema d'estandardització NGSP. De fet, els instruments van mostrar novament un excel·lent comportament metrològic (sobretot des del punt de vista de la imprecisió). Els resultats obtinguts mostren coeficients de variació molt baixos, que referenden l'estabilitat del sistema de mesura al llarg del temps. Per tant, es

confirma la robustesa que, en aquest sentit, ja es va poder observar en l'obtenció dels resultats de mesura de hemoglobina  $A_{1c}$  emprats en l'obtenció de l'equació de transformació de resultats traçables al sistema IFCC en resultats traçables al sistema JDS/JSCC. Cal mencionar que, de la mateixa manera que s'exposa en el bloc 4.1, no es va haver de rebutjar cap sèrie analítica per deficiències en el sistema de mesura, per tant, totes les sèries analítiques processades foren acceptades. . En aquest punt, es va constatar novament que, tot i que el procediment de mesura no era de referència, la qualitat metrològica dels resultats era extraordinàriament semblant a la obtinguda amb els sistemes de referència per a la mesura d'hemoglobina  $A_{1c}$ . La imprecisió mostrada pel sistema de mesura en aquest cas tornà a ésser excel·lent, comparable al ja mencionat estudi d'intercomparació dut a terme durant el desenvolupament del mètode de referència de la IFCC. En aquest conjunt de dades, no s'observà el fenomen d'augment de la imprecisió en el cas del material de control de la qualitat proporcionat per part de Menarini Diagnòsticos que s'havia observat en la fase d'obtenció de l'equació de transformació de valors IFCC d'hemoglobina glicada en valors JDS/JSCC.

#### **4.2.2 RESULTATS DE LES MOSTRES**

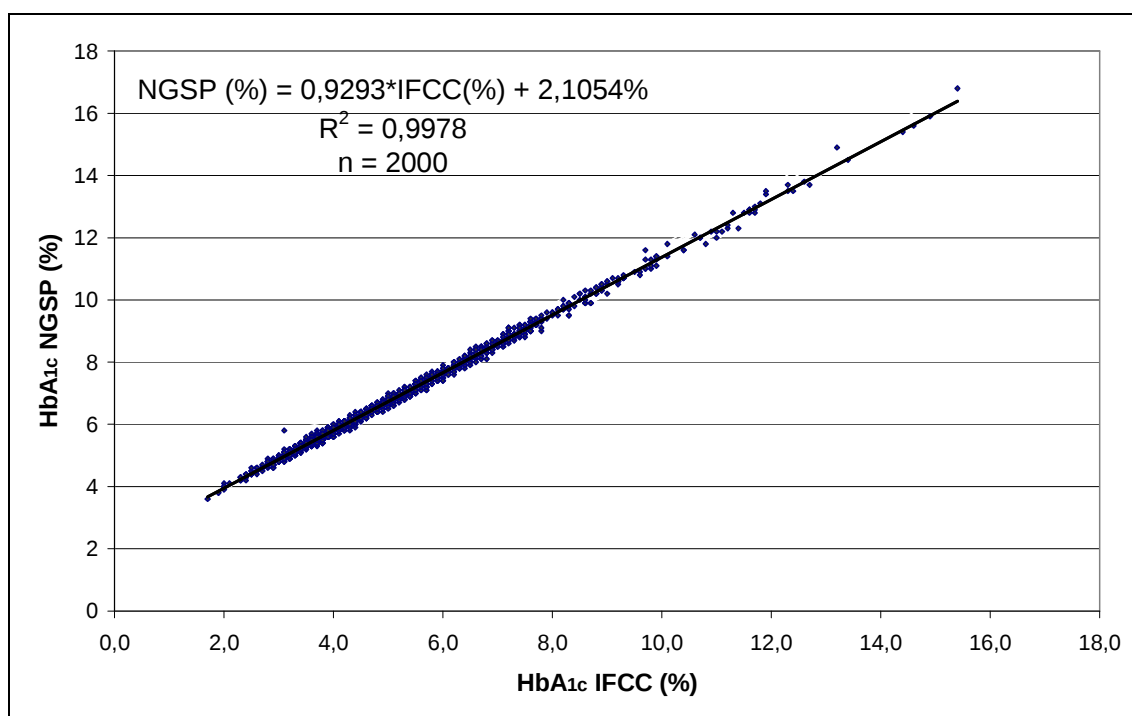
La mitjana aritmètica dels 2000 resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$  emprats per a la obtenció de l'equació de transformació de resultats fou: 7,1 % NGSP i 5,2 % IFCC (52 mmol/mol). Els límits inferiors de la distribució de valors foren: 3,6 % NGSP i 1,6 % IFCC (16 mmol/mol). Per altra banda, els límits superiors de la distribució foren: 19,2 % NGSP i 18,2 % IFCC (182 mmol/mol). Aquestes xifres indiquen l'ampli interval de valors utilitzat per a l'obtenció de l'equació. Per a obtenir un interval de resultats de mesura tan ampli com fos possible, es procedí de la mateixa manera que la descrita a l'apartat 4.1.2, sol·licitant mostres de sang al Laboratori Clínic Just Oliveras, degut a que les mostres obtingudes únicament de l'Hospital Universitari de Bellvitge no eren suficients.

#### **4.2.3 REGRESSIÓ LINEAL SIMPLE I EQUACIÓ DE TRANSFORMACIÓ DE RESULTATS**

Mitjançant el mètode de regressió lineal simple es va obtenir la següent equació de transformació de resultats d'hemoglobina A<sub>1c</sub>.

$$\text{NGSP (\%)} = 0,9293 \cdot \text{IFCC (\%)} + 2,1054 \quad (R^2 = 0,9979)$$

A la figura següent (figura 27) es mostren l'equació que permet la transformació de resultats de mesura d'hemoglobina A<sub>1c</sub> traçables al sistema d'estandardització de la IFCC a valors traçables al sistema nord-americà d'estandardització NGSP i el gràfic obtinguts:



**Figura 27: Recta de regressió i equació de transformació de resultats d'hemoglobina glicada IFCC a resultats NGSP.**

A les següents taules es mostren els detalls de l'anàlisi de les dades obtingudes i la regressió lineal simple.

A la taula 20, es mostra la descripció general de les dades obtingudes:

**Taula 20: Descriptius estadístics bàsics dels valors emprats per a l'obtenció de l'equació de resultats IFCC en resultats NGSP.**

| Sistema de calibració | Mitjana aritmètica (%) | Desviació típica | Nombre de dades |
|-----------------------|------------------------|------------------|-----------------|
| NGSP                  | 7,127                  | 2,3054           | 2001            |

|      |       |        |      |
|------|-------|--------|------|
| IFCC | 5,403 | 2,4783 | 2001 |
|------|-------|--------|------|

Com es pot observar, el valor de la mitjana aritmètica de les dades NGSP és molt proper al 7 %. En el cas concret d'aquesta equació fou interessant obtenir un valor de mitjana proper al 7 % degut a que és el valor clau a l'hora d'avaluar el control metabòlic dels pacients diabètics. Aquest valor del 7% és el punt de tall que defineix, per sobre seu, els pacients amb un control metabòlic deficient de la malaltia i, per sota seu, aquells pacients amb un adequat control de la diabetis.

Els resultats de l'estudi de correlació de Pearson, que es mostren a la taula següent (taula 21), demostren, tal i com ja s'havia descrit en estudis anteriors, una forta associació lineal entre les dues variables, és a dir, entre els resultats provinents d'una calibració alineada amb el sistema d'estandardització nord-americà NGSP i els provinents d'una calibració traçable al sistema de referència de la IFCC. Aquest fet també s'ha observat en l'anterior apartat 4.1.3, en el desenvolupament de l'equació de transformació de valors IFCC a valors JDS/JSCC. Per tant, a partir d'aquesta equació es podrien fer prediccions de quin seria el valor d'hemoglobina A<sub>1c</sub> corresponent al sistema d'estandardització NGSP a partir de valors obtinguts amb sistemes calibrats segons el sistema de referència de la IFCC.

**Taula 21: Anàlisi de correlació de la recta de transformació de resultats IFCC en resultats NGSP.**

|                                       |      | Resultats NGSP | Resultats IFCC |
|---------------------------------------|------|----------------|----------------|
| <b>Correlació de Pearson</b>          | NGSP | 1,000          | 0,999          |
|                                       | IFCC | 0,999          | 1,000          |
| <b>Significació estadística<br/>P</b> | NGSP | —              | < 0,001        |
|                                       | IFCC | < 0,001        | —              |
| <b>Nombre de dades</b>                | NGSP | 2001           | 2001           |
|                                       | IFCC | 2001           | 2001           |

En aquest cas, tal i com també succeïa a l'equació presentada en apartats anteriors per a la transformació de resultats IFCC a JDS/JSCC, el coeficient de correlació de Pearson presenta un valor molt proper a 1. Aquest resultat, esperats per altra banda, demostren una forta associació entre les dues variables, o el que és el mateix, una forta relació entre els dos esquemes d'estandardització de resultats de mesura.

Tal i com era d'esperar, ja que així ha estat observat en els altres estudis efectuats per tal de trobar equacions de transformació de resultats d'hemoglobina glucosilada, el signe del coeficient de correlació és positiu. Aquest fet implica que l'augment en el valor d'una de les dues variables fa que, inevitablement, el seu valor homòleg a l'altra variable també augmentarà.

El resum de les dades del model de regressió lineal simple mitjançant el qual s'ha obtingut l'equació de transformació de resultats d'hemoglobina  $A_{1c}$  traçables al mètode de referència de la IFCC a resultats alineats amb l'esquema d'estandardització nord-americà NGSP es mostra a la taula següent (taula 22):

**Taula 22:** Resum de la regressió lineal efectuada entre els valors d'hemoglobina glicada traçables al sistema de la IFCC i els valors traçables al sistema nord-americà NGSP.

| R     | $R^2$ | $R^2$<br>Corregida | Error<br>típic de<br>l'estimació | Estadístics de canvi |               |         |         |                                   | Durbin-<br>Watson |
|-------|-------|--------------------|----------------------------------|----------------------|---------------|---------|---------|-----------------------------------|-------------------|
|       |       |                    |                                  | Canvi<br>en $R^2$    | Canvi en<br>F | GL<br>1 | GL<br>2 | Significació<br>del canvi<br>en F |                   |
| 0,999 | 0,998 | 0,998              | 0,1062                           | 0,998                | 941281,46     | 1       | 1999    | < 0,001                           | 0,954             |

A la taula anterior, a la columna en la que es mostra l'error típic de l'estimació, es pot observar que l'error en l'estimació de resultats NGSP a partir de resultats IFCC és petit.

El resultat de  $R^2$  determina la bondat de l'ajust lineal en un model com el descrit en aquest estudi. És la proporció de la variació de la variable dependent explicada pel model de regressió. Degut a que el seu valor és elevat (molt proper a 1), significa que el model s'ajusta de forma excel·lent a les dades emprades, tal i com ja s'havia observat en l'obtenció de l'equació descrita en apartats anteriors. Per motius estrictament formals, es mostra el valor de  $R^2$  corregida. Els resultats obtinguts en aquest cas, són similars als obtinguts en el cas de l'equació anterior i, per tant, a partir dels valors de la mostra emprada en aquesta segona fase de l'estudi, s'ha desenvolupat una equació que permet la transformació de valors d'hemoglobina  $A_{1c}$  IFCC als seus valors homòlegs del sistema d'estandardització IFCC.

Igual com es comenta a l'apartat 4.1.3, es realitza l'anàlisi de variància (ANOVA) per a verificar l'acceptabilitat del model de regressió emprat en aquest treball. De la mateixa manera que en el desenvolupament de l'anterior equació de transformació, també es pot

observar com el valor del residual és considerablement petit i, per tant, aquest té un pes despreciable en la predicció del valor d'hemoglobina  $A_{1c}$  NGSP a partir de valors alineats amb el sistema de referència de la IFCC. Els resultats d'aquest ANOVA es mostren a la taula següent (taula 23):

**Taula 23: Anàlisi ANOVA de la regressió efectuada per a l'obtenció de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC en valors traçables a l'esquema NGSP.**

|                  | Suma de quadrats | GL   | Mitjana quadràtica | F          | Significació estadística |
|------------------|------------------|------|--------------------|------------|--------------------------|
| <b>Regressió</b> | 10607,182        | 1    | 10607,182          | 941281,466 | < 0,001                  |
| <b>Residual</b>  | 22,526           | 1999 | 0,011              |            |                          |
| <b>Total</b>     | 10629,709        | 2000 |                    |            |                          |

El detall sobre l'anàlisi estadístic que permet l'obtenció dels coeficients de l'equació de transformació de resultats es mostra a la taula presentada a continuació (taula 24). Aquests són els coeficients (ordenada en origen i pendent) que apareixen a l'equació de transformació de resultats IFCC a resultats traçables al sistema d'estandardització NGSP.

**Taula 24: Anàlisi dels coeficients de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC a valors NGSP.**

|                           | Coeficients no estandarditzats |             | Coeficients estandarditzats | T       | Significació estadística |
|---------------------------|--------------------------------|-------------|-----------------------------|---------|--------------------------|
|                           | B                              | Error típic | Beta                        |         |                          |
| <b>Ordenada en origen</b> | 2,106                          | 0,006       | 0,999                       | 370,023 | < 0,001                  |
| <b>Pendent</b>            | 0,929                          | 0,001       |                             | 970,197 | < 0,001                  |

A part de l'obtenció dels coeficients matemàtics que permeten la construcció de la recta de regressió per a la transformació de resultats, s'obté informació important dels intervals de confiança (taula 25) respecte aquests coeficients, sobretot de cara a realitzar una primera comparació de l'equació obtinguda en el present estudi i la prèviament publicada. L'interval de confiança per a l'ordenada en origen en l'equació prèviament publicada és de 1,59 a 1,859 (en la desenvolupada en el present estudi es de 2,095 a 2,118). Per al pendent, l'interval de confiança en l'equació prèviament publicada es de

0,899 a 0,93 (en la desenvolupada en el present estudi es de 0,927 a 0,931). Com es pot observar l'interval de confiança per als dos paràmetres que defineixen les equacions desenvolupades en el present estudi no s'inclouen en l'interval de confiança que defineix els paràmetres de l'equació prèviament publicada, per tant, les equacions, encara que no de forma significativa, sí que serien lleugerament diferents.

A diferència dels resultats sobre els intervals de confiança que s'han generat en el desenvolupament de l'equació IFCC vs. JDS/JSCC, en la que els intervals entre l'equació publicada anteriorment i la desenvolupada en el present estudi no eren coincidents, en aquest cas sí que trobem un lleugera coincidència entre els intervals de confiança del pendent d'ambdues equacions, la publicada anteriorment i la que es presenta en aquest estudi.

**Taula 25: Anàlisi dels intervals de confiança dels paràmetres de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC en valors NGSP.**

| Interval de confiança per<br>B al 95 % |                | Correlacions |         |             | Estadístics colinealitat |     |
|----------------------------------------|----------------|--------------|---------|-------------|--------------------------|-----|
| Límit superior                         | Límit inferior | Ordre zero   | Parcial | Semiparcial | Tolerància               | FIV |
| 2,118                                  | 2,095          | 0,999        | 0,999   | 0,999       | 1                        | 1   |
| 0,931                                  | 0,927          |              |         |             |                          |     |

Per a valorar que l'estratègia de regressió emprada en aquest estudi és satisfactòria, es presenten els diagnòstics de col·linealitat de l'estudi (taula 26):

**Taula 26: Diagnòstics de col·linealitat de l'estudi de regressió.**

| Dimensió | Autovalor             | Índex de condició | Proporcions de la variància |         |
|----------|-----------------------|-------------------|-----------------------------|---------|
|          |                       |                   | Ordenada en origen          | Pendent |
| 1        | 1,909                 | 1,000             | 0,05                        | 0,05    |
| 2        | $9,103 \cdot 10^{-2}$ | 4,579             | 0,95                        | 0,95    |

A continuació es mostren els estadístics sobre els residuals de l'anàlisi de regressió (taula 27):

**Taula 27: Estadístics sobre els residuals de la regressió lineal aplicada a l'obtenció de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC a valors JDS/JSCC**

|                                | Mínim  | Màxim  | Mitjana aritmètica | Desviació típica | N    |
|--------------------------------|--------|--------|--------------------|------------------|------|
| <b>Valor pronosticat</b>       | 3,593  | 19,019 | 7,127              | 2,303            | 2001 |
| <b>Residu brut</b>             | -0,406 | 0,528  | 0,000              | 0,1061           | 2001 |
| <b>Valor pronosticat tipus</b> | -1,534 | 5,164  | 0,000              | 1                | 2001 |
| <b>Residu tipus</b>            | -3,823 | 4,971  | 0,000              | 1                | 2001 |

Mitjançant la utilització de les dues equacions desenvolupades en aquest treball, es pot efectuar la transformació de resultats d'hemoglobina glicada traçables al sistema de referència de la IFCC a resultats traçables als sistemes d'estandardització JDS/JSCC i NGSP. Per altra banda, els laboratoris que calibrin els seus instruments de mesura segons els esquemes japonès o nord-americà també poden utilitzar aquestes equacions en el sentit invers, és a dir, transformar resultats JDS/JSCC o NGSP a resultats IFCC. Per a l'expressió dels resultats en unitats internacionals (mmol/mol), només caldria multiplicar el resultat IFCC obtingut en tant per cent per 10.

Les característiques del disseny d'aquest treball han permès l'obtenció de dues equacions de transformació sòlides degut, principalment, a l'elevat nombre de mostres emprat.

La qualitat de les equacions també es deu a l'estricta manteniment d'unes condicions analítiques constants als dos analitzadors utilitzats per a efectuar les mesures d'hemoglobina glicada. Sembla essencial per al desenvolupament d'equacions de transformació de valors la utilització dels mateixos instruments, les mateixes mostres i els mateixos equips de reactius, calibradors i materials de control per evitar, tant com sigui possible, les fonts de variació analítica, deixant de lloc la incertesa associada a l'assignació de valors als calibradors, incertesa que es transfereix, inevitablement, als resultats finals.

### 4.3 COMPARACIÓ DE RESULTATS OBTINGUTS AMB LES DIFERENTS EQUACIONS

En aquests propers apartats, es mostraran les dades relatives a la comparació estadística entre els resultats d'hemoglobina A<sub>1c</sub> obtinguts amb les diferents equacions.

En primer lloc es mostraran els resultats de la comparació dels resultats obtinguts mitjançant les equacions obtingudes en el present estudi amb els valors reals homòlegs obtinguts directament de l'analitzador. En segon lloc, es mostrarà la comparació estadística dels resultats obtinguts entre les equacions obtingudes en aquest estudi i els resultats proporcionats per les equacions prèviament publicades.

La comparació estadística de resultats es va efectuar mitjançant la prova no paramètrica de Wilcoxon de comparació de medianes. L'elecció d'aquesta prova venia condicionada per l'absència de distribució de les dades segons la Llei de Laplace-Gauss i que fa, per tant, necessària la utilització de proves no paramètriques per a la comparació de dades aparellades.

#### 4.3.1 COMPARACIÓ DE RESULTATS JDS/JSCC DE L'ANALITZADOR AMB ELS PROPORCIONATS PER EQUACIÓ OBTINGUDA EN EL PRESENT ESTUDI

En aquest apartat es mostren els resultats de l'aplicació de la prova de Wilcoxon per a comparar els resultats JDS/JSCC obtinguts per transformació de valors IFCC mitjançant l'equació desenvolupada en aquest treball respecte els mateixos valors directament obtinguts directament de l'analitzador (taula 28).

**Taula 28:** Resum de la prova de rangs de Wilcoxon aplicada per a la comparació de resultats d'hemoglobina glicada JDS/JSCC provinents de transformació de valors IFCC amb l'equació desenvolupada en el present estudi amb valors JDS/JSCC obtinguts de l'analitzador.

|                       | N    | Rang promig | Suma de rangs |
|-----------------------|------|-------------|---------------|
| <b>Rangs negatius</b> | 542  | 364,83      | 197736        |
| <b>Rangs positius</b> | 154  | 291,04      | 44820         |
| <b>Empats</b>         | 307  |             |               |
| <b>Total</b>          | 1003 |             |               |

Els rangs negatius queden determinats quan el valor d'hemoglobina A<sub>1c</sub> JDS/JSCC obtingut mitjançant l'equació desenvolupada en aquest treball és menor que l'obtingut

directament de l'analitzador. Els rangs positius, per contraposició, queden definits quan el resultat obtingut amb les presents equacions són majors que els obtinguts de l'analitzador. Els empats es defineixen com aquells resultats coincidents entre l'obtingut mitjançant l'equació i el proporcionat per l'analitzador.

Tabla 29: Estadístic de contrast de la prova de Wilcoxon.

| Estadístics de contrast                     | Resultat |
|---------------------------------------------|----------|
| <b>Z</b>                                    | -14,515  |
| <b>Significació assintòtica (bilateral)</b> | < 0,001  |

Com es pot observar a partir de l'estadístic de contrast Z (taula 29), existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats d'hemoglobina glicada obtinguts directament de l'analitzador i aquells resultats homòlegs obtinguts mitjançant la transformació de resultats IFCC mitjançant l'equació desenvolupada en el present estudi.

#### 4.3.2 COMPARACIÓ DE RESULTATS JDS/JSCC DE L'ANALITZADOR AMB ELS PROPORCIONATS PER L'EQUACIÓ PRÈVIAMENT PUBLICADA

En aquest apartat es mostren els resultats de l'aplicació de la prova de Wilcoxon per a comparar els resultats JDS/JSCC obtinguts per transformació de valors IFCC mitjançant l'equació de transformació prèviament publicada(referencia) respecte els mateixos valors directament obtinguts directament de l'analitzador (taula 30).

Taula 30: Resum de la prova de rangs de Wilcoxon aplicada per a la comparació de resultats d'hemoglobina glicada JDS/JSCC provinents de transformació de valors IFCC amb l'equació prèviament publicada amb valors JDS/JSCC obtinguts de l'analitzador.

|                       | N    | Rang promig | Suma de rangs |
|-----------------------|------|-------------|---------------|
| <b>Rangs negatius</b> | 469  | 347,99      | 163206        |
| <b>Rangs positius</b> | 426  | 558,11      | 237754        |
| <b>Empats</b>         | 108  |             |               |
| <b>Total</b>          | 1003 |             |               |

De forma idèntica a la taula 28, en aquesta taula es mostren els rangs promitjos i la suma de rangs dels rangs que resulten positius, negatius i els empats.

Taula 31: Estadístic de contrast de la prova de Wilcoxon.

| Estadístics de contrast               | Resultat |
|---------------------------------------|----------|
| Z                                     | -4,826   |
| Significació assimptòtica (bilateral) | < 0,001  |

Com es pot observar a partir de l'estadístic de contrast Z, també existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats d'hemoglobina glicada obtinguts directament de l'analitzador i aquells resultats homòlegs obtinguts mitjançant la transformació de resultats IFCC mitjançant l'equació prèviament publicada.

#### 4.3.3 COMPARACIÓ DE RESULTATS NGSP DE L'ANALITZADOR AMB ELS PROPORCIONATS PER L'EQUACIÓ OBTINGUDA EN EL PRESENT ESTUDI

En aquest apartat es mostren els resultats de l'aplicació de la prova de Wilcoxon per a comparar els resultats NGSP obtinguts per transformació de valors IFCC mitjançant l'equació desenvolupada en aquest treball respecte els mateixos valors directament obtinguts directament de l'analitzador.

Taula 32: Resum de la prova de rangs de Wilcoxon aplicada per a la comparació de resultats d'hemoglobina glicada NGSP provinents de transformació de valors IFCC amb l'equació desenvolupada en el present estudi amb valors NGSP obtinguts de l'analitzador.

|                       | N   | Rang promig | Suma de rangs |
|-----------------------|-----|-------------|---------------|
| <b>Rangs negatius</b> | 74  | 309,11      | 22874         |
| <b>Rangs positius</b> | 531 | 358,15      | 225991        |
| <b>Empats</b>         | 288 |             |               |
| <b>Total</b>          | 993 |             |               |

A la taula anterior (taula 32), es pot observar un resum de la prova de Wilcoxon aplicada per a efectuar la comparació de resultats d'hemoglobina glicada NGSP obtinguts tan mitjançant l'equació que s'ha desenvolupat en aquest treball com els obtinguts directament de l'analitzador.

A la següent taula (taula 33) es mostren els resultats de l'estadístic de contrast Z i la seva significació de cara a establir si existeixen diferències estadísticament significatives entre ambdues sèries de resultats.

Taula 33: Estadístic de contrast de la prova de Wilcoxon.

| Estadístics de contrast               | Resultat |
|---------------------------------------|----------|
| Z                                     | -19,086  |
| Significació assimptòtica (bilateral) | < 0,001  |

Com es pot observar a partir de l'estadístic de contrast Z, existeixen diferències estadísticament significatives entre els resultats d'hemoglobina glicada obtinguts directament de l'analitzador i aquells resultats homòlegs obtinguts mitjançant la transformació de resultats IFCC mitjançant l'equació desenvolupada en el present estudi.

#### 4.3.4 COMPARACIÓ DE RESULTATS NGSP DE L'ANALITZADOR AMB ELS PROPORCIONATS PER L'EQUACIÓ PRÈVIAMENT PUBLICADA

En aquest apartat es mostren els resultats de l'aplicació de la prova de Wilcoxon per a comparar els resultats NGSP obtinguts per transformació de valors IFCC mitjançant l'equació de transformació prèviament publicada respecte els mateixos valors directament obtinguts directament de l'analitzador.

Els resultats de l'aplicació de la prova de Wilcoxon per a determinar si existeixen diferències estadísticament significatives entre els valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> fruit de la utilització de la prèviament publicada per Hoelzel i col·laboradors<sup>(120)</sup> i els seus resultats homòlegs directament obtinguts de l'analitzador, es resumeixen en les dues taules següents (taules 34 i 35):

Taula 34: Resum de la prova de rangs de Wilcoxon aplicada per a la comparació de resultats d'hemoglobina glicada NGSP provinents de transformació de valors IFCC amb l'equació prèviament publicada amb valors NGSP obtinguts de l'analitzador.

|                | N   | Rang promig | Suma de rangs |
|----------------|-----|-------------|---------------|
| Rangs negatius | 115 | 298,77      | 34359         |
| Rangs positius | 508 | 314,99      | 160017        |
| Empats         | 370 |             |               |
| Total          | 993 |             |               |

Taula 35: Estadístic de contrast de la prova de Wilcoxon.

| Estadístics de contrast | Resultat |
|-------------------------|----------|
|-------------------------|----------|

|                                              |         |
|----------------------------------------------|---------|
| <b>Z</b>                                     | -14,292 |
| <b>Significació assimptòtica (bilateral)</b> | < 0,001 |

L'estadístic de contrast que es mostra a la taula 35, revela que, novament, i tal i com s'ha observat a l'apartat 4.3.3, també existeixen diferències estadísticament significatives entre els valors obtinguts de l'aplicació de l'equació desenvolupada per Hoelzel i col·laboradors<sup>(120)</sup> i els resultats directament obtinguts de l'analitzador.

Degut a les petites diferències numèriques entre els resultats obtinguts a partir de les equacions desenvolupades per Hoelzel i col·laboradors<sup>(120)</sup> i els obtinguts a partir de les equacions aquí desenvolupades, es pot afirmar que aquestes últimes són vàlides per a transformar resultats d'hemoglobina glicada IFCC a resultats traçables als sistemes JDS/JSCC o NGSP.

D'acord amb el document internacional de consens, el laboratori clínic de l'Hospital universitari de Bellvitge ha calibrat els seus instrument de mesura de forma traçable al sistema de referència de la IFCC i informa dels resultats en valors IFCC (mmol/mol) i en valors NGSP (%). Fins aquest moment, els resultats que es proporcionaven als sol·licitants d'aquest centre eren únicament valors JDS/JSCC. Per a evitar la confusió sorgida de l'adopció de les directrius del document internacional de consens causada per les diferències entre els diferents valors informats, es va habilitar un temps de transició en el que coexistien, en un mateix informe de laboratori, resultats IFCC, JDS/JSCC i NGSP. Aquests dos últims valors s'obtenien de la transformació dels valors IFCC obtinguts directament de l'analitzador mitjançant l'ús de les equacions aquí desenvolupades.

#### **4.4 RELACIÓ ENTRE GLUCOSA MITJANA ESTIMADA I CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA EN SANG DESPRÉS D'UN DEJÚ DE 8 HORES**

Tal i com s'ha esmentat a la introducció d'aquest treball, aquesta part de l'estudi pretenia avaluar si podria existir una relació lineal entre els resultats de glucosa mitjana estimada i la concentració de glucosa mesurada posteriorment a un dejú de 8 hores per, d'aquesta manera, poder realitzar estimacions de la glucosa mitjana a partir de concentracions basals de glucosa en sang.

A la taula següent (taula 36) es presenten els estadístics descriptius de la població i les variables estudiades:

**Taula 36: Descriptius estadístics bàsics dels valors emprats per a l'obtenció de l'equació que relaciona concentracions de glucosa mitjanes estimades i concentració de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores.**

|                                              | N   | Mitjana | Desviació estàndard | Mínim | Màxim |
|----------------------------------------------|-----|---------|---------------------|-------|-------|
| <b>Hemoglobina A<sub>1c</sub><br/>(NGSP)</b> | 953 | 6,6     | 1,74                | 3,8   | 15,9  |
| <b>Glucosa en dejú</b>                       | 953 | 7,06    | 3,21                | 1,4   | 29,4  |

Segons la prova de Kolmogorov-Smirnov, els valors de cap de les dues variables estudiades s'ajustaven a una distribució de Laplace-Gauss, per tant, es va fer necessària la utilització de proves no paramètriques per a la comparació de dades aparellades.

La prova de comparació de Wilcoxon dels valors de concentracions mitjanes de glucosa estimades amb els valors de concentració de glucosa en dejú va demostrar que existeixen diferències significatives entre ells (taules 37 i 38).

**Taula 37: Rangs obtingut de la prova de Wilcoxon per comparar els resultats de glucosa mitjana estimada i concentracions basals de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores.**

|                       | N   | Rang promig | Suma de rangs |
|-----------------------|-----|-------------|---------------|
| <b>Rangs negatius</b> | 232 | 402,91      | 93475         |
| <b>Rangs positius</b> | 695 | 484,39      | 336653        |
| <b>Empats</b>         | 56  |             |               |
| <b>Total</b>          | 953 |             |               |

**Taula 38: Valor de l'estadístic de contrast de la prova de Wilcoxon.**

| Estadístics de contrast                     | Resultat |
|---------------------------------------------|----------|
| <b>Z</b>                                    | -14,913  |
| <b>Significació assintòtica (bilateral)</b> | < 0,001  |

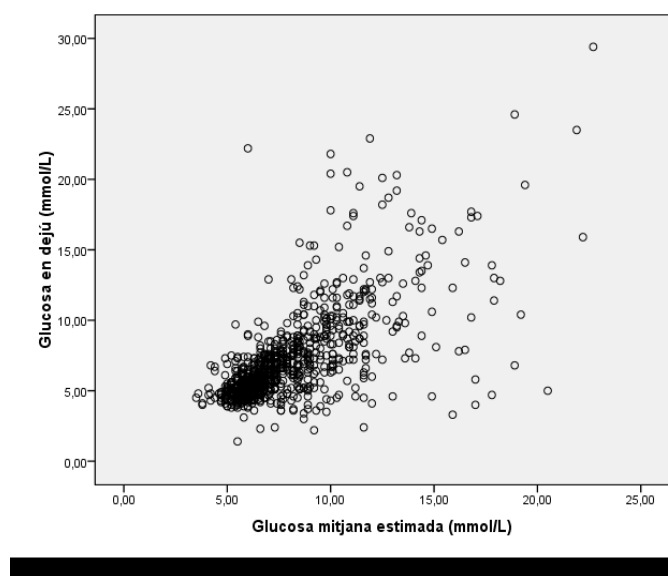
A la següent taula (taula 39) es mostren els resultats de les proves de control glucèmic i els coeficients de correlació per a tots els grups. Aquests grups, tal i com s'esmenta en l'apartat 3.2.4 de Material i mètodes, corresponen, en primer lloc, a pacients amb

concentracions de glucosa en sèrum després d'un dejuni de 8 hores inferiors a 6,7 mmol/L, en segon lloc, a pacients amb concentracions de glucosa entre 6,7 i 7,8 mmol/L i, finalment, a pacients amb concentracions de glucosa en sèrum superiors a 7,8 mmol/L després d'un dejuni de 8 hores. No es menciona a la taula, però la significació estadística de cadascun dels coeficients de correlació de Pearson fou inferior a 0,001.

**Taula 39: Resum descriptius entre diferents grups de pacients amb diferents concentracions de glucosa i anàlisi de correlació en els diferents grups.**

|                                                   | Grup sencer            | Grup glucosa<br>basal < 6,7<br>mmol/L | Grup glucosa<br>basal 6,7 – 7,8<br>mmol/L | Grup Glucosa<br>basal > 7,8<br>mmol/L |
|---------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>N</b>                                          | 953                    | 571                                   | 148                                       | 234                                   |
| <b>Glucosa basal<br/>(mmol/L)</b>                 | 7,06 ± 3,21            | 5,23 ± 0,78                           | 7,23 ± 0,32                               | 11,43 ± 3,62                          |
| <b>GME (mmol/L)</b>                               | 7,91 ± 2,77            | 6,66 ± 1,73                           | 8,11 ± 2,07                               | 10,83 ± 2,99                          |
| <b>Hemoglobina A<sub>1c</sub><br/>(NGSP en %)</b> | 6,6 ± 1,74             | 5,82 ± 1,08                           | 6,73 ± 1,3                                | 8,44 ± 1,88                           |
| <b>Gluc. basal vs GME</b>                         | r <sup>2</sup> = 0,673 | r <sup>2</sup> = 0,06                 | r <sup>2</sup> = 0,143                    | r <sup>2</sup> = 0,532                |

A continuació es mostra el diagrama scatter-plot que relaciona les concentracions de glucosa estimada i les concentracions de glucosa en dejú (figura 28):



**Figura 28:** Diagrama de dispersió de relació entre la concentració de glucosa mitjana estimada i la concentració de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores.

L'anàlisi de regressió lineal simple proporciona la següent equació que relacionava ambdues variables:

$$\text{GME}_{\text{mmol/L}} = 0,5816 * \text{Glucosa dejú} + 3,8033 \quad (R^2 = 0,45)$$

Les dades de la regressió es mostren a la taula següent (taula 40):

**Taula 40:** Anàlisi dels coeficients de l'equació de transformació de valors de glucosa obtinguts després d'un dejuni de 8 hores en concentració de glucosa mitjana estimada.

| Terme                     | Coefficient | Error estàndard | Significació p | Interval de confiança 95 % del coeficient |
|---------------------------|-------------|-----------------|----------------|-------------------------------------------|
| <b>Ordenada en origen</b> | 3,8033      | 0.1606          | < 0,001        | 3,4881-4,1185                             |
| <b>Pendent</b>            | 0,5816      | 0,0207          | < 0,001        | 0,5409-0,6222                             |

Degut al valor del coeficient de correlació, es porta a terme l'anàlisi de regressió lineal pel mètode de Deming amb el qual, l'expressió matemàtica resultant és:

$$\text{GME}_{\text{mmol/L}} = 0,8051 * \text{Glucosa dejú} + 2,2243$$

Els detalls d'aquest anàlisi de regressió de Deming es mostren a la taula següent (taula 41):

**Taula 41: Anàlisi de regressió de Deming aplicat a l'obtenció de l'equació de transformació de concentracions de glucosa obtingudes després d'un dejuni de 8 hores en valors de concentracions mitjanes estimades de glucosa.**

| Terme                     | Coefficient | Error estàndard | Interval de confiança del 95% |
|---------------------------|-------------|-----------------|-------------------------------|
| <b>Ordenada en origen</b> | 2,2243      | 0,2224          | 1,7879-2,6606                 |
| <b>Pendent</b>            | 0,8051      | 0,0287          | 0,7488-0,8613                 |

La simple anàlisi visual de la distribució de les dades al gràfic ja permet deduir que no existeix relació lineal entre ambdues variables, fet que, posteriorment es confirma amb un valor de  $R^2$  de 0,45. Per tant no és possible realitzar l'estimació de les concentracions mitjanes de glucosa a partir de resultats de les concentracions de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores.

Aquests resultats es contradiuen amb un estudi anterior de similars característiques<sup>(149)</sup> en el qual s'obté una correlació positiva entre ambdues variables sensiblement major ( $r = 0,757$ ) que en l'estudi que s'exposa en aquest apartat. Aquesta diferència podria explicar-se, en part, pel major nombre de mesures de concentracions de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores que es va emprar en aquest estudi ( $n = 3891$ ). No obstant, seria necessària la realització d'estudis més profunds per esbrinar quina és la correlació real entre ambdues variables.

Per tant, en quan a l'estudi de la relació entre la concentració de glucosa en sèrum després d'un dejú de 8 hores (basal) i la concentració de glucosa mitjana estimada a partir de l'equació publicada a l'estudi prèviament mencionat<sup>(150)</sup>, tot i que s'ha obtingut una equació que relaciona aquestes dues variables, el coeficient de correlació de Pearson obtingut és inferior a 0,7. Aquest fet, fa inviable la utilització d'aquesta expressió matemàtica a la pràctica clínica, ja que no existeix relació matemàtica prou forta entre les dues variables.

#### **4.5 ESTUDI DE LA RELACIÓ ENTRE LA MITJANA DE LES CONCENTRACIONS BASALS DE GLUCOSA I LA PROPORCIÓ D'HEMOGLOBINA A<sub>1c</sub>**

Aquest apartat del treball va venir motivada per un motiu primordial esmentat a la introducció d'aquest estudi. Actualment, l'hemoglobina glicada, representa la millor

prova per avaluar l'estat de control metabòlic del pacient diabètic. No obstant es va intentar establir si podria existir alguna manera d'estimar, de forma ràpida i senzilla resultats de concentracions basals de glucosa mitjanes. D'aquesta manera, es podria donar una informació al pacient molt més fàcil d'entendre per part seva.

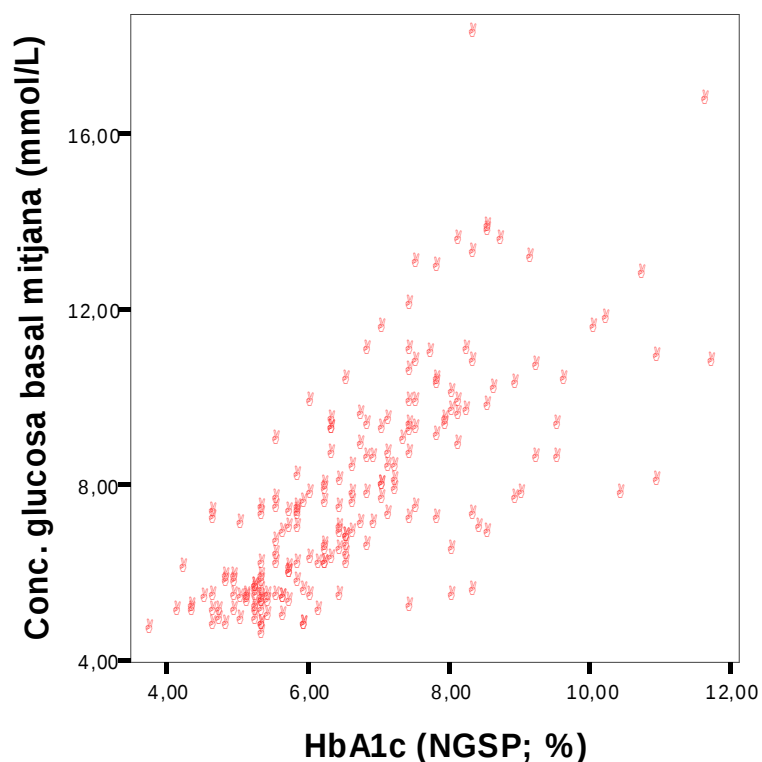
#### 4.5.1 EQUACIÓ DE TRANSFORMACIÓ UTILITZANT VALORS IFCC TRANSFORMATS A NGSP AMB L'EQUACIÓ PRÈVIAMENT PUBLICADA

A la taula següent (taula 42) es mostren els estadístics descriptius de les variables emprades per a aquest estudi:

**Taula 42: Resum descriptiu de les dades de glucosa basal mitjana i valors d'hemoglobina glicada.**

|                                               | N   | Mitjana | Desviació estàndard |
|-----------------------------------------------|-----|---------|---------------------|
| <b>Glucosa basal mitjana</b>                  | 195 | 7,66    | 2,46                |
| <b>Hemoglobina A<sub>1c</sub> (NGSP en %)</b> | 195 | 6,74    | 1,54                |

En el següent gràfic de dispersió (figura 29) es pot observar la distribució dels punts entre les dues variables. Aquest primer examen visual ja dona una idea de que les variables estan pobrament relacionades.



**Figura 28: Diagrama de dispersió de relació entre l'hemoglobina glicada i les concentracions basals mitjanes de glucosa.**

A continuació es mostren les dades de l'estudi de les correlacions (taula 43). En ell es pot observar una correlació positiva entre ambdues variables, no obstant és una correlació positiva dèbil degut al baix valor del coeficient de correlació de Pearson.

**Taula 43: Anàlisi de correlació de la recta de transformació de resultats d'hemoglobina glicada en concentracions basals de glucosa mitjanes estimades.**

|                                       |                                         | Glucosa basal<br>mitjana<br>estimada | HbA <sub>1c</sub><br>(NGSP en %) |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Correlació de Pearson</b>          | Glucosa basal mitjana                   | 1,000                                | 0,72                             |
|                                       | Hemoglobina A <sub>1c</sub> (NGSP en %) | 0,72                                 | 1,000                            |
| <b>Significació estadística<br/>P</b> | Glucosa basal mitjana                   | -                                    | < 0,001                          |
|                                       | Hemoglobina A <sub>1c</sub> (NGSP en %) | < 0,001                              | -                                |
| <b>Nombre de dades</b>                | Glucosa basal mitjana                   | 195                                  | 195                              |
|                                       | Hemoglobina A <sub>1c</sub> (NGSP en %) | 195                                  | 195                              |

El resum del model de regressió lineal emprat es mostra a continuació (taula 44):

**Taula 44:** Resum de la regressió lineal efectuada entre els valors de hemoglobina glicada i les concentracions basals mitjanes estimades de glucosa.

|                  | Suma de quadrats | Gr. Llib. | Mitjana quadràtica | F       | Significació |
|------------------|------------------|-----------|--------------------|---------|--------------|
| <b>Regressió</b> | 610,17           | 1         | 610,17             | 208,027 | <0,001       |
| <b>Residual</b>  | 566,095          | 193       | 2,933              |         |              |
| <b>Total</b>     | 1176,266         | 194       |                    |         |              |

A la taula següent (taula 45) s'exposen els paràmetres de pendent i ordenada en origen necessaris per a conformar l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada en valors de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores:

**Taula 45:** Anàlisi dels coeficients de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC a valors en valors de concentració basal de glucosa mitjana estimada.

|                                             | Coeficients no estandarditzats |                 | Coeficients estandarditzats | t      | Significació |
|---------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------------------|--------|--------------|
|                                             | B (IC 95%)                     | Error estàndard | Beta                        |        |              |
| <b>Ordenada en origen</b>                   | -0,11 (-1,2 a 0,98)            | 0,553           |                             | -0,199 | > 0,842      |
| <b>Pendent (Hemoglobina A<sub>1c</sub>)</b> | 1,153 (0,995 a 1,31)           | 0,08            | 0,72                        | 14,423 | < 0,001      |

L'equació de transformació de resultats d'hemoglobina glicada a concentracions de glucosa en sèrum després d'un dejuni de 8 hores pren la forma següent:

$$GBE_{\text{mmol/L}} = 1,153 * HbA_{1c}(\text{NGSP}) - 0,11$$

En cas d'emprar el mètode de Deming per a realitzar la regressió lineal, el model mostra els següents paràmetres (taula 46):

**Taula 46:** Anàlisi de regressió de Deming aplicat a l'obtenció de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada en concentracions de glucosa basals estimades.

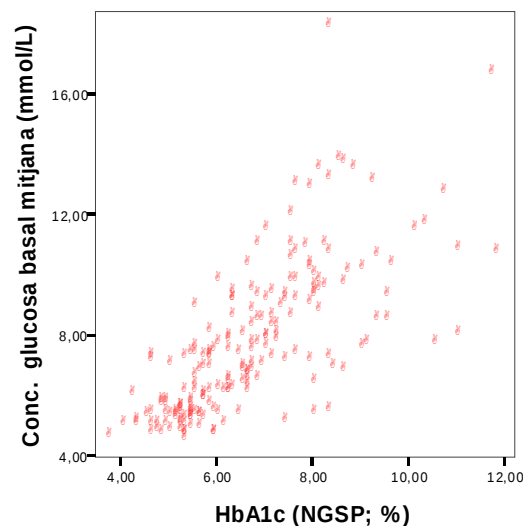
|                           | Coeficient | Error estàndard | Interval confiança 95% |
|---------------------------|------------|-----------------|------------------------|
| <b>Ordenada en origen</b> | -5,0169    | 0,8958          | -6,7838 a -3,25        |
| <b>Pendent</b>            | 1,8807     | 0,1296          | 1,6252 a 2,1362        |

L'equació pren doncs, la forma:

$$GBE_{\text{mmol/L}} = 1,8807 * HbA_{1c}(\text{NGSP}) - 5,0169$$

#### 4.5.2 EQUACIÓ DE TRANSFORMACIÓ UTILITZANT VALORS IFCC TRANSFORMATS A NGSP AMB L'EQUACIÓ DESENVOLUPADA EN EL PRESENT ESTUDI

En aquest sentit és va voler realitzar el mateix estudi però resultats IFCC a resultats NGSP amb l'equació que es descriu i s'obté en aquest treball. En el gràfic de dispersió que es mostra a continuació (figura 30), es pot observar la distribució dels punts entre les dues variables. Un examen visual preliminar de la distribució ja permet establir molt clarament que la correlació entre ambdues variables és de caràcter dèbil.



**Figura 29: Diagrama de dispersió de relació entre la hemoglobina A<sub>1c</sub> i concentracions basals mitjanes de glucosa.**

A la taula següent es mostren els estadístics descriptius de les variables emprades per a aquest estudi (taula 47):

Taula 47: Taula descriptiva de les variables emprades en aquest estudi.

|                                               | N   | Mitjana | Desviació estàndard |
|-----------------------------------------------|-----|---------|---------------------|
| <b>Glucosa basal mitjana</b>                  | 195 | 7,66    | 2,46                |
| <b>Hemoglobina A<sub>1c</sub> (NGSP en %)</b> | 195 | 6,77    | 1,56                |

Tal i com es mostra a la taula següent (taula 48), l'anàlisi de correlació de Pearson confirma el previst segons el primer examen visual de la distribució dels punts. La correlació entre les dues variables no és prou forta com per a poder establir una equació lineal per a realitzar la estimació de la concentració de glucosa en sang mitjana a partir de la proporció d'hemoglobina glicada.

Taula 48: Anàlisi de correlació de la recta de transformació de resultats d'hemoglobina A<sub>1c</sub> en concentracions basals de glucosa mitjanes estimades.

|                                       |                                         | Glucosa basal mitjana<br>estimada | HbA <sub>1c</sub> (NGSP en<br>%) |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| <b>Correlació de Pearson</b>          | Glucosa basal mitjana                   | 1,000                             | 0,721                            |
|                                       | HemoglobinaA <sub>1c</sub> (NGSP en %)  | 0,721                             | 1,000                            |
| <b>Significació estadística<br/>P</b> | Glucosa basal mitjana                   | -                                 | < 0,001                          |
|                                       | HemoglobinaA <sub>1c</sub> (NGSP en %)  | < 0,001                           | -                                |
| <b>Nombre de dades</b>                | Glucosa basal mitjana                   | 195                               | 195                              |
|                                       | Hemoglobina A <sub>1c</sub> (NGSP en %) | 195                               | 195                              |

A la taula següent (taula 49), es mostren els resultats de l'anàlisi de variància de l'estudi de regressió lineal realitzat. A diferència de l'ANOVA referent als models de regressió lineal utilitzats per al desenvolupament de les equacions de transformació de valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub>, en aquest cas es pot observar com l'error (expressat a la taula com a residual) comés en predir els valors de concentració basal de glucosa estimada a partir de valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> és massa. Per tant, les estimacions realitzades a partir de valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> no resultarien fiables.

Taula 49: ANOVA de la regressió per a l'obtenció de la equació de transformació de valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> en valors de concentració basal de glucosa estimada.

|                  | Suma de quadrats | Gr. Llib. | Mitjana quadràtica | F       | Significació |
|------------------|------------------|-----------|--------------------|---------|--------------|
| <b>Regressió</b> | 611,186          | 1         | 611,186            | 208,748 | <0,001       |
| <b>Residual</b>  | 565,079          | 194       | 2,928              |         |              |
| <b>Total</b>     | 1176,266         | 195       |                    |         |              |

A la taula següent (taula 50) es mostren els paràmetres d'ordenada en origen i pendent de l'equació obtinguda que relaciona les concentracions basals mitjanes de glucosa amb els resultats de proporció d'hemoglobina glicada.

Taula 50: Anàlisi dels coeficients de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada IFCC a valors en valors de concentració basal de glucosa mitjana estimada.

|                                             | Coeficients no estandarditzats |                 | Coeficients estandarditzats | t      | Significació |
|---------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------------------|--------|--------------|
|                                             | B (IC 95%)                     | Error estàndard | Beta                        |        |              |
| <b>Ordenada en origen</b>                   | -0.0405 (-1,12 a 1,039)        | 0,547           |                             | -0,074 | 0,941        |
| <b>Pendent (Hemoglobina A<sub>1c</sub>)</b> | 1,138 (0,982 a 1,293)          | 0,079           | 0,721                       | 14,448 | < 0,001      |

A partir dels resultats observats, l'expressió matemàtica per a la transformació de resultats d'hemoglobina glicada a concentracions de glucosa en sèrum després d'un dejuni de 8 hores pren la forma següent:

$$GBME_{\text{mmol/L}} = 1,138 * HbA_{1c}(\text{NGSP}) - 0,04057$$

En el cas que s'empri el mètode de Deming per a obtenir l'equació que relacioni les dues variables, s'observen els següents resultats (taula 51).

**Taula 51: Anàlisi de regressió de Deming aplicat a l'obtenció de l'equació de transformació de valors d'hemoglobina glicada en concentracions de glucosa basals estimades.**

|                           | Coefficient | Error estàndard | Interval confiança 95% |
|---------------------------|-------------|-----------------|------------------------|
| <b>Ordenada en origen</b> | -4,818      | 0,8823          | -6,5581 a -3,0778      |
| <b>Pendent</b>            | 1,8438      | 0,127           | 1,5932 a 2,0943        |

L'equació de transformació de resultats d'hemoglobina glicada a concentracions de glucosa en sèrum després d'un dejuni de 8 hores pren la forma següent:

$$GBME_{\text{mmol/L}} = 1,8438 * HbA_{1c}(\text{NGSP}) - 4,818$$

Ens trobem, per tant, davant d'una relació lineal molt feble en els nostres resultats. No obstant, la mostra emprada en el present treball és considerablement petita, en relació a altres estudis realitzats amb finalitats similars<sup>(143)</sup>, ja que no arriba a 200 parelles de dades. Tenint en compte que en un estudi com l'ADAG<sup>(143)</sup>, conceptualment semblant, i que emprà milers de dades més que en aquest treball, el coeficient de correlació fou aproximadament 0,8, seria desitjable ampliar de forma considerable el nombre de dades. D'aquesta manera es podria verificar l'autèntic grau de correlació entre les dues variables, ja que aquest podria ser superior en un estudi que utilitzés una mostra més gran.

Tot i que no ha estat possible en aquest estudi per la limitació del nombre de pacients emprat, trobar la forma de relacionar ambdós conceptes seria clínicament interessant, ja que, en alguns estudis<sup>(150)</sup> s'ha descrit que només un 16,8% dels pacients diabètics controlen la seva concentració de glucosa de forma correcta als seus domicilis. Aquesta dada és força més baixa fins i tot que la descrita en l'estudi NHANES III<sup>(151)</sup>, realitzat en pacients amb diabetis tipus 2, en el que es descrivia que un 47% dels nord-americans diabètics amb hemoglobines glicades superiors o iguals al 8% i un 32% dels que presentaven valors inferiors al 8% controlaven diàriament les seves concentracions de glucosa en sang.

#### **4.6 ESTUDI DE LA CAPACITAT DIAGNÒSTICA DE LA MESURA DE LA CONCENTRACIÓ BASAL DE GLUCOSA RESPECTE L'HEMOGLOBINA A<sub>1c</sub>**

Aquesta part del treball va venir motivada pel fet que, durant la validació clínica de resultats de laboratori corresponents a proves de control de diabetis, s'observava una

proporció anormalment elevada de malalts que, si bé tenien la proporció d'hemoglobina glicada per sota del punt de tall de bon control metabòlic, les seves concentracions sèriques de glucosa en dejú estaven anormalment elevades.

Des de la introducció de l'hemoglobina glicada com a patró or per a l'avaluació del control de la malaltia, la mesura de les concentracions sèriques basals de glucosa ha passat a un segon pla. Aquesta magnitud, segons les guies clíniques de l'ADA tindria com a principal utilitat el diagnòstic de diabetis si la concentració de glucosa es trobés per sobre de 7 mmol/L en una mesura rutinària d'un pacient no diagnosticat de la malaltia.

Per tant, es pretén avaluar l'eficiència diagnòstica de la mesura de les concentracions basals de glucosa per a l'avaluació del control metabòlic respecte l'hemoglobina glicada.

Tal i com es comenta àmpliament a l'apartat 3.2 de la secció Material i Mètodes, aquest estudi de la capacitat diagnòstica, en forma de sensibilitat, especificitat, valor predictiu positiu i valor predictiu negatiu, de la concentració basal de glucosa en sèrum enfront la hemoglobina  $A_{1c}$ , es va realitzar sobre quasi 1000 pacients. Degut a les discordances analítiques esmentades a l'inici d'aquest apartat, es procedí a realitzar la avaluació diagnòstica indicada per determinar si, en algun cas, podria tenir major valor diagnòstic la concentració de glucosa en sèrum després d'un dejuni de 8 hores que la hemoglobina  $A_{1c}$ .

A les taules de contingència que es presenten en aquest apartat, es mostra la distribució dels pacients segons el grau de control metabòlic que presenten amb cadascuna de les dues proves esmentades i es calculen els paràmetres de sensibilitat, especificitat, valor predictiu negatiu i valor predictiu positiu.

En la taula següent s'exposen els valors de bon i mal control segons les variables tingudes en compte (taula 52):

**Taula 52: Punts de tall de bon i mal control metabòlic de la diabetis mellitus en els pacients estudiats per a la hemoglobina A<sub>1c</sub> i la concentració de glucosa basal en sèrum .**

|                    | Hemoglobina A <sub>1c</sub> (NGSP) | Conc. basal de glucosa en sèrum (mmol/L) |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------------|
| <b>Bon control</b> | < 7%                               | ≤ 6,9                                    |
| <b>Mal control</b> | ≥ 7 %                              | ≥ 7                                      |

La classificació atenent al grau de control metabòlic segons ambdues proves de laboratori es mostra a les següents taules de contingència on, per ordre, s'estudia la prova de la concentració basal de glucosa en sèrum respecte els valors d'hemoglobina glicada obtinguts directament de l'analitzador, obtinguts mitjançant l'equació de transformació de resultats IFCC a NGSP desenvolupada en aquest estudi i, finalment, amb els valors obtinguts utilitzant l'equació prèviament publicada (taules 53 a 55).

Valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> NGSP directament sortits de l'analitzador:

**Taula 53: Classificació diagnòstica dels pacients emprant valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> procedents directament de l'analitzador.**

|                                               |                    | Hemoglobina A <sub>1c</sub> (NGSP) |             |
|-----------------------------------------------|--------------------|------------------------------------|-------------|
|                                               |                    | Mal control                        | Bon control |
| <b>Concentració de glucosa basal en sèrum</b> | <b>Mal control</b> | 222                                | 119         |
|                                               | <b>Bon control</b> | 69                                 | 546         |
|                                               |                    | 291                                | 665         |

Valors NGSP obtinguts per transformació de valors IFCC amb l'equació desenvolupada en aquest estudi:

Taula 54: Classificació diagnòstica dels pacients emprant valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> procedents de transformació de valors IFCC amb l'equació desenvolupada en el present estudi.

|                                        |             | Hemoglobina A <sub>1c</sub> |             |     |
|----------------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-----|
|                                        |             | Mal control                 | Bon control |     |
| Concentració de glucosa basal en sèrum | Mal control | 229                         | 112         | 341 |
|                                        | Bon control | 76                          | 539         | 615 |
|                                        |             | 305                         | 651         |     |

Valors NGSP obtinguts per transformació de valors IFCC amb l'equació prèviament publicada:

Taula 55: Classificació diagnòstica dels pacients emprant valors d'hemoglobina A<sub>1c</sub> procedents de transformació de valors IFCC amb l'equació prèviament publicada.

|                                        |             | Hemoglobina A <sub>1c</sub> |             |     |
|----------------------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-----|
|                                        |             | Mal control                 | Bon control |     |
| Concentració de glucosa basal en sèrum | Mal control | 229                         | 112         | 341 |
|                                        | Bon control | 76                          | 539         | 615 |
|                                        |             | 305                         | 651         |     |

A partir de les dades mostrades a les taules anteriors es mostra a la taula següent la capacitat de la mesura de la concentració de glucosa en sèrum de diagnosticar el grau de control metabòlic d'un pacient diabètic (taula 56).

Tabla 56: Resum de la capacitat diagnòstica de les diferents proves estudiades.

|                                                                                             | Sensibilitat (%) | Especificitat (%) | Valor predictiu positiu (%) | Valor predictiu negatiu (%) |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>Hemoglobina A<sub>1c</sub> NGSP</b>                                                      | 76,3             | 82,1              | 65,1                        | 88,8                        |
| <b>Hemoglobina A<sub>1c</sub> NGSP obtinguda a partir de l'equació d'aquest estudi</b>      | 75,1             | 82,8              | 67,2                        | 87,6                        |
| <b>Hemoglobina A<sub>1c</sub> NGSP obtinguda a partir de l'equació previament publicada</b> | 75,1             | 82,8              | 67,2                        | 87,6                        |

No s'ha trobat cap prova concloent que la concentració de glucosa basal, en el context del control metabòlic del pacient, aportí un valor diagnòstic afegit del bon o mal control metabòlic del pacient superior al que té l'hemoglobina glicada. Els valors de sensibilitat, especificitat, valor predictiu negatiu i valor predictiu positiu són força discrets i no aportarien informació de valor superior al que aporta l'hemoglobina glicada. Tenint en compte aquest fet, juntament amb el fet que la correlació obtinguda en l'estudi ADAG<sup>(135)</sup> entre l'hemoglobina glicada i la glucosa mitjana no és superior a 0,9 fa concloure que, certament, la mesura de la proporció d'hemoglobina glicada és la magnitud que té un valor molt superior a qualsevol altre paràmetre de control metabòlic de la diabetis.

## 5. CONCLUSIONS

1. És possible realitzar la transformació de resultats d'hemoglobina glicada traçables al sistema de referència de la IFCC als esquemes d'estandardització JDS/JSCC i NGSP amb les equacions desenvolupades en el present estudi.
2. L'elevat nombre de mostres emprat per al desenvolupament de les equacions els aporta una robustesa considerable, garantint una bona qualitat dels resultats obtinguts mitjançant la seva utilització.
3. Tot i que existeixen diferències entre els valors d'hemoglobina glicada obtinguts mitjançant la utilització de les equacions desenvolupades en aquest estudi respecte els valors homòlegs obtinguts directament de l'analitzador, aquestes diferències son prou petites com per a que no siguin clínicament rellevants.
4. Els resultats del control intern de la qualitat demostren un excel·lent comportament dels analitzadors emprats en aquest estudi. Les dades d'imprecisió demostren també un grau d'imprecisió molt baix, de forma quasi equiparable a resultats obtinguts per laboratoris de referència.
5. No existeix una relació lineal prou robusta entre la concentració basal de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores i la concentració de glucosa mitjana estimada a partir de la proporció d'hemoglobina glicada. Per tant no es pot definir una equació lineal que permeti l'estimació de l'una respecte de l'altra.
6. No existeix una relació lineal prou robusta entre la mitjana de concentracions de glucosa en sang després d'un dejuni de 8 hores i la proporció d'hemoglobina glicada. Per tant, no es pot definir una equació lineal que permeti l'estimació d'una respecte de l'altra.
7. La mesura de la proporció d'hemoglobina  $A_{1c}$  continua essent el millor examen de laboratori per a l'avaluació del grau de control metabòlic dels pacients diabètics.

## 6. **BIBLIOGRAFIA**

1. Farreras, Rozman C. Medicina Interna. Vol. 2. 15a edició, 2006. Pàgina 1942. Editorial Elsevier.
2. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care. 1998; 21:1414-31.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. Diabetes Care. 2004;27:1047-53
4. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas 2003. 2a edició. International Diabetes Federation. Bruseles. 2003
5. Stovring H, Andersen M, Beck-Nielsen H, Green A, Vach W. Rising prevalence of diabetes: evidence from a Danish pharmaco-epidemiological database. Lancet 2003;362:537-8
6. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2011;34:S62-S69
7. Metzger BE, Coustan DR (Eds.): Proceedings of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1998;21(Suppl. 2): B161–B167.
8. American diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. Diabetes Care 2004;27:S88-S90
9. HAPO Study Cooperative Group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. N Engl J Med 2008;358:1991-2002
10. Jensen DM, Damm P, Sorensen B, Molested-Pedersen L, Westergaard JG, Klebe J, Beck-Nielsen H. Clinical impact of mild carbohydrate intolerance in pregnancy: a study of 2904 non-diabetic Danish women with risk factors for gestational diabetes. Am J Obstet Gynecol 2001;185:413-9.
11. Yangs X, Hsu-Hage B, Zhang H, Zhang C. Women with impaired glucose tolerance during pregnancy have significantly poor pregnancy outcomes. Diabetes Care 2002;25:1619-24.
12. Vambergue A, Nuttens MC, Verier-Mine O, Dognin C, Cappoen JP, Fontaine P. Is mild gestational hyperglycemia associated with maternal and neonatal complications? The Diagest Study. Diabet Med 2000;17:203-8.

13. Langer O, Brustman L, Anyaegbunam A, Mazze R. The significance of one abnormal glucose tolerance test value on adverse outcome in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1987;157:758-63.
14. Sacks DA, Greenspoon JS, Abu-Fadil S, Henry HM, Wolde-Tsadik G, Yao JFF. Toward universal criteria for gestational diabetes: the 75-gram glucose tolerance test in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:607-14
15. Sermer M, Naylor CD, Gare DJ, Kenshole AB, Ritchie JWK, Farine D, Cohen HR, McArthur K, Holzapfel S, Biringier A, Chen E. Impact of increasing carbohydrate intolerance on maternal-fetal outcomes in 3637 women without gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:146-56.
16. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, Kreisberg RA. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. A Consensus Statement from the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2006;29:2739-48
17. Dunger DB, Sperling MA, Acerini CL, Bohn DJ, Daneman D, Danne T, Glaser NS, Hanas R, Hintz RL, Levitsky LL, Savage MO, Tasker RC, Wolford JI. European Society for Paediatric Endocrinology/Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society Consensus Statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. *Pediatrics* 2004;113:e133-e140.
18. Curtis JR, to T, Muirhead S, Cummings E, Daneman D. Recent trends in hospitalization for diabetic ketoacidosis in Ontario children. *Diabetes Care* 2002;25:1591-6.
19. Levitsky L, Ekwo E, Goselink Ca, Solomon IL, Aceto T. Death from diabetes (DM) in hospitalized children (1970-1988) [abstract]. *Pediatr Res* 1991;29:A195.
20. Cummings E, Lawrence S, Daneman D. Cerebral edema in pediatric diabetic ketoacidosis (DKA) in Canada [abstract]. *Diabetes* 2003;52:A400.
21. Edge JA, Ford-Adams ME, Dunger DB. Causes of death in children with insulin dependent diabetes 1990-96. *Arch Dis Child* 1999;81:318-23.
22. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy MB, Barret EJ, Keisberg RA, Malone JI, Wall BM. Management of hyperglycemia crisis in patients with diabetes (Technical Review). *Diabetes Care* 2001;24:131-53
23. DeFronzo RA, Matzuda M, Barret E. Diabetic ketoacidosis: a combined metabolic-nephrologic approach to therapy. *Diabetes Rev.* 1994;2:209-38
24. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Murphy BM. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. *International Textbook of Diabetes Mellitus*. 3a edició. De Fronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet P. Ed. John Willey & Sons, Chichester, Regne Unit. 2004. pp:1101-19

25. Delaney MF, Zisman A, Kettyl WM. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar non-ketotic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2000; 29:683-705
26. McGarry JD, Woltje KF, Kuwajima M, foster DW. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyl-transferase. *Diabetes Metab Rev* 1989;5:271-84
27. Lorber D. Non-ketotic hypertonicity in diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 1995;79:39-52
28. Hillman K. Fluid resuscitation in diabetic emergencies: a reappraisal. *Intensive Care Med* 1987;13:4-8.
29. Kreisberg RA. Diabetic ketoacidosis: an update. *Crit Care Clin* 1987;3:817-34.
30. Umpierrez GE, Kelly SP, Navarrete JE, Casals MM, Kitabchi AE. Hyperglycemic crises in urban blacks. *Arch Intern Med* 1997;157:669-75.
31. Ennis ED, Stahl EJVB, Kreisberg RA. The hyperosmolar glycemic syndrome. *Diabetes Rev* 1994;2:115-26
32. Fishbein HA, Palumbo PJ. Acute metabolic complications in diabetes. A Diabetes in America. National Diabetes Data Group, National Institute of Health, 1995, pp:283-91 (Nº publicació NIH 95-1468)
33. Wachtel TJ, Tctu-Moviadjian LM, Goldman DL, Ellis SA, O'Sullivan PS. Hyperosmolarity and acidosis in diabetes mellitus: a three-year experience in Rhode Island. *J Gen Int Med* 1991;6:495-502.
34. Chen HF, Wang CY, Lee HY, See TT, Chan MH, Jiang JY, Lee MT, Li CY. Short-term case fatality rate and associated factors among in-patients with diabetic ketoacidosis and hyperglycaemic hyperosmolar state: a hospital based analysis over a 15-year period. *Intern Med* 2010;49:729-37.
35. Wachtel TJ. The diabetic hyperosmolar state. *Clin Geriatr Med*. 1990;6:797-806.
36. Shami SK, Chittenden SJ. Microangiopathy in diabetes mellitus II: features, complications and investigation. *Diabetes Res* 1991;17:157-68.
37. Almadal T, Scharling H, Sensen VS, Vestergaard H. The independent effect of type II diabetes in ischemic heart disease, stroke and death: a population-based study of 13,000 men and women with 20 years of follow-up. *Arch Intern Med* 2004;164:1422-6.
38. Mankovsky BN, Ziegler D. Stroke in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev* 2004;20:268-87

39. Fuller JH, Stevens LK, Wang SL. Risk factors for cardiovascular mortality and morbidity: the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001;44:S54-S64
40. Lippera S, Gregorio F, Ceravolo MG, Lagalla G, Provinciali L. Diabetic retinopathy and cerebral hemodynamic impairment in type II diabetes. *Eur J Ophthalmol* 1997;7:156-62
41. Mankovsky BN, Metzger BE, Molitch ME, Biller J. Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus. *J diabetes Complications* 1996;10:228-42.
42. Service FJ, Molnar GD, Taylor FL. Urine glucose analyses during continuous blood glucose monitoring. *JAMA* 1972;222:294-8
43. Sacks DB. Carbohydrates. A Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3a edició. Eds. Burtis C, Ashwood E. Philadelphia, Saunders, 1999, p:750-808
44. Skyler JS. Monitoring diabetes mellitus. A Diabetes Mellitus. 9a edició. Eds. Galloway JA, Potvin JH, Shaman CR. Indianapolis. Lilly Research Laboratories, 1988, p:160-73.
45. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM, Dacks DB. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:1761-73
46. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrot M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2002;25:750-86
47. Unger RFI, Foster DW. Diabetes Mellitus. A Williams' Textbook of Endocrinology. Eds. Wilson DJ, Foster DW, Philadelphia, Saunders, 1992, p:1235-333.
48. American Diabetes Association. Self-monitoring of blood glucose (Consensus Statement) *Diabetes Care* 1987;10:95-9
49. American Diabetes Association. Self-monitoring of blood glucose (Consensus Statement) *Diabetes Care* 1994;17:81-6
50. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 2004; 27 (Suppl.1):S15-S35
51. American Diabetes Association. Urine glucose and ketone determinations (Position Statement). *Diabetes Care* 1992;15 (Suppl. 2):38
52. Singer DE, Coley CM, Samet JH, Nathan DM. Tests of glycemia in diabetes mellitus: their uses in establishing a diagnosis and treatment. *Ann Intern Med* 1989;110:125-37

53. Hayford JT, Weydert DA, Thompson RG. Validity of urine glucose measurements for estimating plasma glucose concentrations. *Diabetes Care* 1983;6:40-4
54. Walford S, Page MM, Allison SP. The influence of renal threshold on the interpretation of urine tests for glucose in diabetic patients. *Diabetes Care* 1980;3:672-4
55. Malone JJ, Rosenbloom AI, Grgic A, Webr FT. The role of urine sugar in diabetic management. *Am J Dis Child* 1976;130:1324-7
56. Morril LR, McGee JA, Kitabchi AE. Correlation between plasma and urine glucose in diabetes. *Ann Intern Med* 1981;94:469-71
57. Moffitt DA. Interpretation of glycosuria in the teenage diabetic patient. *Diabetes Care* 1980;3:112-6
58. Malone JJ, Hellrung JM, Malphus EW, Rosenbloom AL, Grgic A, Weber FT. Good diabetic control: study in mass delusion. *J Pediatr* 1976;88:943-7
59. Ohlsen P, Danowsky TS, Rosenblum DH, Mreiden T, Fisher ER, Suner JH. Discrepancies between glycosuria and home estimates of blood glucose in insulin-treated diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1980;3:178-83
60. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33:S62-S69
61. The International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A<sub>1C</sub> assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1327-34
62. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2002;25:S5-S20
63. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:S5-S20
64. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27:S5-S10
65. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:S37-S42
66. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29:S43-S48
67. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2007;30:S42-S47

68. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2008;31:S55-S60
69. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2009;32:S62-S67
70. Foster DW, McGarry JD. The metabolic derangements and treatment of diabetic ketoacidosis. *N Engl J Med* 1983;309:159-69
71. Sulway MJ, Malins JM. Acetone in diabetic ketoacidosis. *Lancet* 1970;7676:736-40
72. Benjamin RJ, Sacks DB. Glycated protein update: implicatioos of recent studies including the Diabetes Control and Complications Trial. *Clin Chem* 1994;40:683-87.
73. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein: an index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982;127:87-95
74. Baker JR, O'Connor JP, Metcalf PA, Lawson MR, Johnson RN. Clinical usefulness of estimation of serum fructosamine concentration as a screening test for diabetes mellitus. *Br Med J* 1983;287:863-7.
75. Allgrove J, Cockrill BL. Fructosamine or glycated haemoglobin as a measure of diabetic control? *Arch Dis Child* 1988;63:418-22
76. Hindle ET, Rostron GM, Gatt JA. The estimation of serum fructosamine: an alternative measurement to glycated haemoglobin. *Ann Clin Biochem* 1985;22:84-9
77. Armbruster DA. Fructosamine. Structure, analysis and clinical usefulness. *Clin Chem* 1987;33:2153-63
78. Windele J, Kobberling J. The fructosamine assay in diagnosis and control of diabetes mellitus: scientific evidence for its clinical usefulness. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990;28:129-38
79. Tas S, Sein el Din RR. Automated fructosamine assay with improved accuracy used to quantify nonenzymatic glycation of serum protein in diabetes mellitus. *Clin Chem* 1990;36:1825-30
80. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 2004;27(Suppl 1):S91-S93
81. Yoshiuchi K, Matsushida M, Katakami N, Nakatami Y, Sakamoto K, Matsuoka T, Umeyahara Y, Kosugi K, Kaneto H, Yamasaki Y, HoriM. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2008;55:503-7

82. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in the diabetes control in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86
83. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53
84. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984;102:520-6
85. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. Glycosilated haemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy. *JAMA* 1988;260:2864-71
86. Chase HP, Jackson WE, Hoops SL, Cockerham RS, Archer PG, O'Brien D. Glucose control and the renal and retinal complications of insulin-dependent diabetes. *JAMA* 1989;261:1155-60
87. Engerman R, Bloodworth JM Jr, Neelson S. Relationship of microvascular disease in diabetes to metabolic control. *Diabetes* 1977;26:760-9
88. Engerman RL, Kern TS. Progression of incipient diabetic retinopathy during good glycemic control. *Diabetes* 1987;36:808-12
89. Cohen AJ, McGill PD, Rossetti RG, Gubersky DL, Like AA. Glomerulopathy in spontaneously diabetic rat: impact of glycemic control. *Diabetes* 1987;36:44-51
90. Kroc Collaborative Study Group. Blood glucose control and the evolution of diabetic retinopathy and albuminuria: a preliminary multicenter trial. *N Engl J Med* 1984;311:365-72
91. Lauritzen T, Frost-Larsen K, Larsen H-W, Deckert T. Two-year experience with continuous subcutaneous insulin infusion in relation to retinopathy and neuropathy. *Diabetes* 1985;34:Suppl 3:74-9
92. Brinchmann-Hansen O, Dahl-Jorgensenn K, Hansen KF, Sandvik L. The response of diabetic retinopathy to 41 months of multiple insulin injections, insulin pumps and conventional insulin therapy. *Arch Ophthalmol* 1988;106:1242-6
93. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc* 2000;100:621-34

94. Gabbay K. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N Engl J Med* 1973;288:831-6
95. Greene D, Lattimer S, Sima A. Are disturbances of sorbitol, phosphoinositide and Na-K-ATPase regulation involved in pathogenesis of diabetic neuropathy? *Diabetes* 1988;37:688-93
96. Ziyadeh F. Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease. *Miner Electrolyte Metab* 1995;21:292-302
97. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;13:23-30
98. Dahl-Jorgensen K, Brinchmann-Hansen O, Bangstad HJ, Hanssen KF. Blood glucose control and microvascular complications—what do we know. *Diabetologia* 1994;37:1172-7
99. Stevens VJ, Vlassara H, Abati A, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1977;252:2998-3002
100. Maillard LC. Condensation des acides amines sur les sucres; formation de melanoidines par voie m ethodique. *CR Acad Sci Paris* 1912;154:66-8
101. Terr s-Speziale AM. Programa nacional de estandarización de glicohemoglobina. *Rev Mex Patol Clin* 2006;53:157-65
102. Allen DW, Shroeder WA, Balog J. Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal haemoglobin: a study of the effects of cristallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J Am Chem Soc* 1958;80:1628-34
103. Garlick RL, Mazer JS, Higgins PJ, Bunn HF. Characterization of glycated haemoglobin relevance to monitoring of diabetic control and analysis of other proteins. *J Clin Invest* 1983;71:1062-71
104. Reinauer H. Biochemistry of protein glycation in diabetes mellitus. *Klin Lab* 1993;39:984-7
105. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, Little R, England J, Peterson CM. What is haemoglobin A<sub>1c</sub>? An analysis of glycated haemoglobin by electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 1998;44:1951-8
106. Roberts NB, Amara AB, Morris M, Green BN. Long-term evaluation of electrospray ionization mass spectrometric analysis of glycated haemoglobin. *Clin Chem* 2001;47:316-21
107. Nordin G, Dybkaer R. Recommendation for term and measurement unit for “HbA<sub>1c</sub>”. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1081-2

108. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M, Weycamp C. Approved reference method for the measurement of A<sub>1c</sub> in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89
109. John G. Haemoglobin A<sub>1c</sub>: Analysis and standardisation. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1199-1212
110. Trivelli LA, Ranney HM, Lay HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971;284:353-7
111. Baumgart R, France MW, UaConnaill D, Murnagham S, PeriraM, Drurg MI. An assessment of a microcolumn chromatographic method for the measurement of haemoglobin A<sub>1c</sub>. *Ann Clin Biochem* 1980;17:101-4
112. Simon M, Eissler J. Critical factors in the chromatographic measurements of glycohemoglobin (HbA<sub>1</sub>). *Diabetes* 1980;29:467-74
113. Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Naito HK, Goldstein DE. Interlaboratory comparison of glycohemoglobin results: College of American Pathologists survey data. *Clin Chem* 1991;37:1725-9
114. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, Van der Slik W. Glycohemoglobin: comparison of 12 analytical methods, applied to lyophilized haemolysates by 101 laboratories in an external quality assurance programme. *Ann Clin Biochem* 1993;30:169-74
115. Hoshino T, Okahashi M, Arai H. Survey and assessment of the actual state of routine measurement of glycohaemoglobin/GHb by commercial methods: warning to the users and the providers. *J Pharm Biomed Anal* 1997;15:1551-62
116. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Capani F, Pagano G, Plebani M. A re-evaluation of glycohemoglobin standardization: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:243-8
117. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, Van der Slik W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. *Clin Chem* 1994;40:138-44
118. Weykamp CW, Penders TJ, Miedema K, Muskiet FAJ, Van der Slik W. Standardization of glycohemoglobin results and reference values on whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. *Clin Chem* 1995;41:82-6
119. Shima K, Endo J, Oimomi M, Oshima I, Omori Y, Katayama Y, Kanazawa Y, Kawai T, Kawamori R, Kanno T, Kiyose H, Nakashima K, Nagamine Y, Baba S, Hoshino T, Amino N. Inter-laboratory difference in HbA<sub>1c</sub> measurement in Japan. A report of the committee on inter-laboratory standardisation of HbA<sub>1c</sub> determinations, the Japan Diabetes Society. *J Japan Diab Soc* 1994;37:855-64

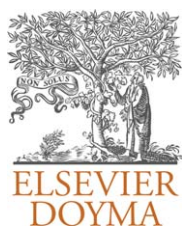
120. Miedema K. Towards worldwide standardisation of HbA<sub>1c</sub> determination. *Diabetologia* 2004;47:1143-8
121. Tominaga M, Makino H, Yoshino G, Kuwa K, Takei I, Aono Y, Hoshino T, Umemoto M, Shimatsu A, Sanke T, Kuwashima M, Taminato T, Ono J. Japanese standard reference material for JDS Lot 2 haemoglobin A<sub>1c</sub>. I: comparison of Japan Diabetes Society-assigned values to those obtained by the Japanese and USA domestic standardization programmes and by the International Federation of Clinical Chemistry reference laboratories. *Ann Clin Biochem* 2005;42:41-6
122. Hoshino T, Nakayama T, Kuwa K, Nakanishi T, Okahashi M, Tominaga M, et al. Reference method for St-GhbA<sub>1c</sub> determination—standard operating procedure, Ver. 1.4. Hamamatsu, Japó: Japanese Society of Clinical Chemistry Working Group on SOP for St-GhbA<sub>1c</sub> determination. 2000.
123. Little R. Glycated hemoglobin standardization-National Glycohemoglobin standardization Program (NGSP) perspective. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1191-8
124. Goldstein DE, Little RR, England JD, Wiedmeyer HM, McKenzie EM. Methods for quantitating glycosylated hemoglobins: high performance liquid chromatography and thiobarbituric acid colorimetry. A: *Methods in diabetes research*, vol 2. Clinical Methods. Editors: Clarke WL, Larner, Pohl S. John Wiley. Nova York, 1986. P 475-504
125. Jeppsson JO, Jerntorp P, Sundkvist G, Englund H, Nylund V. Measurement of haemoglobin A<sub>1c</sub> by a new liquid chromatographic assay: methodology, clinical utility and relation to glucose tolerance evaluated. *Clin Chem* 1986;32:1867-72
126. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardisation of HbA<sub>1c</sub> determinations. *J Int Fed Clin Chem* 1996;9:62-7
127. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA<sub>1c</sub> determinations. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:299-308
128. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, Hoshino T, John W, Kobold U, Little R, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Susanto F, Takei I, Thienpont L, Umemoto M, Wiedmeyer HM. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A<sub>1c</sub> in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan and Sweden: A method-comparison study. *ClinChem* 2004;50:166-74
129. Mosca A, Goodall I, Hoshino T, Jeppsson JO, Garry J, Little RR, Miedema K, Myers GL, Reinauer H, Sacks DB, Weykamp CW. Global standardization of

glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC working group. Clin Chem Lab Med 2007;45:1077-88

130. Consensus Committee of the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and laboratory Medicine and the International Diabetes Federation. Consensus statement on the worldwide standardization of the HbA<sub>1c</sub> measurement. Diabetes Care 2007;30:2399-400
131. Consensus Committee of the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and laboratory Medicine and the International Diabetes Federation. Consensus statement on the worldwide standardization of the HbA<sub>1c</sub> measurement. Diabetologia 2007;50:2042-3
132. Goberna R, Aguilar-Diosdado M, Santos-Rey, Mateo J. Documento de consenso para la armonización de resultados de HbA<sub>1c</sub> en España. Rev Lab Clin 2009;2:56-8
133. Saudek CD, Derr RL, Kalvani RR. Assessing glycaemia in diabetes using self-monitoring blood glucose and haemoglobin A<sub>1c</sub>. JAMA 2006;295:1688-97
134. American Diabetes Association. Standards of medical care. Diabetes care 2010;33:S11-S61
135. Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and haemoglobin A<sub>1c</sub> in diabetes mellitus. N Engl J Med 1976;295:417-20
136. Peterson CM, Jones RL, Dupuis A, Bernstein R, O'Shea M. Feasibility of improved glucose control in patients with insulin dependent diabetes mellitus. Diabetes Care 1979;2:329:35
137. Svendsen PA, Lauritzen T, Soegaard U, Nerup J. Glycosilated haemoglobin and steady-state mean blood glucose concentration in type I diabetes. Diabetologia 1982;23:403-5
138. Nathan DM, Singer DE, Hurxthol K, Goodson JD. The clinical information value of glycosylated haemoglobin assay. N Engl J Med 1984;310:341-6
139. Rohlfing CL Wiedmeyer HM, Little R, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA<sub>1c</sub> in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Care 2002;25:275-8
140. Hempe JM, Gomez R, McCarter RJ, Chalew SA. High and low haemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes: a challenge for interpretation of glycaemic control. J Diabetes Complications 2002;16:313-20

141. Murata GH, Hoffman RM, Duckworth WC, Wendel CS, Shah JH. Contributions of weekly mean blood glucose values to haemoglobin A<sub>1c</sub> in insulin-treated type 2 diabetes: the Diabetes Outcomes in Veterans Study (DOVES). *Am J Med Sci* 2004;327:319:23
142. Nathan DM, Turgeon H, Regan S,. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean blood glucose over time. *Diabetologia* 2007;50:2239-44
143. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RS. Translating the A<sub>1C</sub> assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008;31:1473-8
144. Isidro Marrón P, Rosel Soria P, Alía Ramos P, Navarro Moreno MA. Optimization of imprecision and cost saving on haemoglobin A<sub>1c</sub> through aliquot freezing. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1199
145. <http://www.westgard.com/control-limit-calculator/htm>
146. Geistanger A, Arends S, Berding C, Hoshino T, Jeppsson JO, Little R, Siebelder C, Weykamp C. Statistical methods for monitoring the relationship between the IFCC reference measurement procedure for haemoglobin A<sub>1c</sub> and the designated comparison methods in the United States, Japan and Sweden. *Clin Chem* 2008;54:1379-85
147. NCCLS Document EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. NCCLS. Wayne 2002, 2a edició.
148. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2002;25:213-29
149. Bozkaya G, Ozgu E, Karaca B. The association between estimated average glucose levels and fasting plasma glucose levels. *Clinics* 2010;65:1077-80
150. Youl Rhee S, Seol Kim Y, Oh S, Hwan Choi W, Eun Park J, Jin Jeong W. Diabcare Asia 2001—Korea: Country report on outcome data and analysis. *The Korean Journal of Internal Medicine* 2005;20:48-54.
151. Harris MI. Health care and health status and outcomes for patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2000;23:754-8

## **APÈNDIX 1**



## ORIGINAL

### Ecuaciones de transformación de valores de HbA<sub>1c</sub> obtenidos por un método trazable al método de referencia de la IFCC a valores trazables a los esquemas de estandarización japonés y norteamericano

Eduardo Clot Silla<sup>a,\*</sup>, Pilar Rosel Soria<sup>a</sup>, Emilia Pérez Hernández<sup>b</sup>,  
Jordi Vila Planas<sup>b</sup>, Georgia Simon<sup>a</sup> y Ariadna Padró Miquel<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hospital Universitari de Bellvitge, Departamento de Bioquímica Hormonal y Génica, IDIBELL-Laboratori Clínic, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

<sup>b</sup> Laboratori Clínic Just Oliveras, CAP Just Oliveras, Barcelona, España

Recibido el 15 de diciembre de 2010; aceptado el 18 de enero de 2011

Disponible en Internet el 3 de abril de 2011

#### PALABRAS CLAVE

HbA<sub>1c</sub>;  
Diabetes mellitus;  
Armonización

#### Resumen

**Introducción:** Las mediciones de HbA<sub>1c</sub> se consideran la piedra angular en el control del paciente diabético. Se han publicado ecuaciones para la transformación de valores trazables desde el método de referencia hasta los sistemas de estandarización nacionales, sin embargo, existen diversos inconvenientes relacionados con su obtención como el bajo número de muestras empleado. El objetivo de este estudio ha sido desarrollar dos ecuaciones que permitan la transformación de resultados trazables al sistema de referencia a valores trazables a los sistemas de estandarización japonés y estadounidense y compararlas con las ecuaciones previamente publicadas.

**Material y métodos:** Se midió la HbA<sub>1c</sub> en 6.002 muestras de sangre mediante dos analizadores, uno alineado al sistema de estandarización japonés y posteriormente al sistema de estandarización estadounidense y otro al método de referencia. Se obtuvieron las ecuaciones de transformación mediante regresión lineal simple y se efectuó una comparación estadística de los resultados obtenidos mediante las ecuaciones aquí desarrolladas y las anteriormente publicadas.

**Resultados:** La ecuaciones obtenidas fueron JDS/JSCC (%) = 1,0545\*IFCC (%) + 1,129% (R<sup>2</sup> = 0,9972) y NGSP (%) = 0,9293\*IFCC (%) + 2,1054 (R<sup>2</sup> = 0,9979). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con el uso de las ecuaciones previamente publicadas, las desarrolladas en el presente estudio y los resultados obtenidos directamente del analizador.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [ecлот@bellvitgehospital.cat](mailto:ecлот@bellvitgehospital.cat) (E. Clot Silla).

**KEYWORDS**

HbA<sub>1c</sub>;  
Diabetes mellitus;  
Armonization

**Conclusiones:** Estas nuevas ecuaciones son útiles aunque sólo para ser empleadas en nuestro laboratorio con objeto de transformar resultados alineados con el método de referencia a resultados equivalentes a los del sistema de estandarización japonés y estadounidense y viceversa. Pese a que existen diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores obtenidos directamente del analizador son unas ecuaciones considerablemente robustas debido al elevado número de muestras empleado para obtenerlas. Las pequeñas diferencias observadas no serían clínicamente significativas, ya que la diferencia entre las medianas de los resultados obtenidos directamente del analizador o obtenidos mediante ecuaciones es inferior a 0,1%.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Equation for transforming HbA<sub>1c</sub> values obtained by a method traceable to the IFCC reference method to values traceable to the Japanese and the United States standardization schemes

**Abstract**

**Introduction:** HbA<sub>1c</sub> measurements are the cornerstone in monitoring the diabetic patient. Master equations have been published to transform values from the reference method to values traceable to national standardization systems. There are many disadvantages in these equations, such as the low sample number used and heterogeneity of methods used to develop equations. The aim of this study was to obtain two equations for reference method values transformation to values traceable to the Japanese and United States standardization schemes and compare them with the already published equations.

**Material and methods:** HbA<sub>1c</sub> was measured in 3002 blood samples on two analyzers calibrated with traceability to the Japanese and the United States schemes and to the reference method. The equations for transforming the values were developed by simple linear regression methods and compared with the already published master equation.

**Results:** The equations obtained were JDS/JSCC (%) = 1.0545\*IFCC (%) + 1.129% (R<sup>2</sup> = 0.9972) and NGSP (%) = 0.9293\*IFCC (%) + 2.1054 (R<sup>2</sup> = 0.9979). Statistically significant differences were found between results obtained with the previously published equations and the equations developed in this study and those obtained directly from the analyzers.

**Conclusions:** These new developed master equations are useful tools, although only for use in our laboratory, to transform reference method values to the Japanese and United States schemes values. Despite them show statistically significant differences with real values directly obtained from the analyzer, they are considerably robust due to the high number of samples used to obtain them. The small differences in the values obtained with the equations developed in this study compared to the direct values from the analyzers will not affect clinical management of diabetes as the difference in medians between the values obtained from the analyzer and values obtained using the equations is less than 0.1%.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

Los resultados de los estudios: *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT)<sup>1</sup> y *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS)<sup>2</sup> mostraron que el tratamiento intensivo de la diabetes mellitus y un estricto control metabólico de los pacientes con diabetes previene o retrasa significativamente la aparición de las complicaciones crónicas de la enfermedad.

En estos estudios, la HbA<sub>1c</sub> aparece como el patrón oro para efectuar el control glucémico de los pacientes con diabetes debido a que refleja las concentraciones medias de glucosa en la sangre de los aproximadamente 120 días anteriores a su medición. La estrecha relación entre los resultados de HbA<sub>1c</sub> y el riesgo de aparición de complicaciones ha conllevado a que se utilicen valores de HbA<sub>1c</sub> como objetivos terapéuticos, indicadores de necesidad de intervención terapéutica

e incluso se emplee como criterio diagnóstico de la diabetes<sup>3</sup>.

A pesar de la importancia de la HbA<sub>1c</sub>, existía una importante falta de estandarización de sus resultados; por este motivo, no era posible comparar resultados de HbA<sub>1c</sub> entre laboratorios o trazarlos a un método de referencia. La estandarización de los resultados de HbA<sub>1c</sub> ha sido uno de los principales objetivos en las ciencias de laboratorio en los últimos años<sup>4-16</sup>. La creación de tres sistemas nacionales de estandarización, el *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), el programa de estandarización de la *Japanese Diabetes Society* en asociación con la *Japanese Society of Clinical Chemistry* (JDS/JSCC) y el sistema sueco de estandarización fueron los primeros pasos hacia una estandarización global. Estos tres esquemas estaban basados en métodos de comparación designados conocidos como *Designated Comparison Methods* (DCM) y no eran métodos de referencia de la mayor calidad metrológica. La Federación

Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC) desarrolló posteriormente un método de referencia que permite la medición de HbA<sub>1c</sub> específicamente en sangre humana<sup>17</sup>. Este método de referencia es la base del actual proceso de estandarización de resultados de HbA<sub>1c</sub><sup>18</sup>.

Debido a la elevada especificidad del método de referencia de la IFCC, los resultados obtenidos con él son considerablemente más bajos que los obtenidos utilizando cualquiera de los métodos arbitrarios (DCM) anteriormente mencionados, por este motivo, se podría generar una importante confusión entre los profesionales sanitarios. Era necesario, por lo tanto, estudiar la relación existente entre los resultados obtenidos a partir de una calibración trazable al método de referencia de la IFCC y los resultados obtenidos mediante calibraciones referenciadas a cualquiera de los tres sistemas de estandarización nacionales.

En el año 2004 se desarrollaron tres ecuaciones que permitían relacionar los resultados proporcionados por el método de referencia de la IFCC con los valores obtenidos mediante los sistemas JDS/JSCC, NGSP o sueco<sup>19</sup>. La obtención de estas ecuaciones se llevó a cabo con un bajo número de muestras y diversos métodos analíticos, con lo que debería realizarse un seguimiento de su validez con un elevado número de muestras y evitando específicamente la variabilidad analítica.

El principal objetivo de este trabajo ha sido obtener dos nuevas ecuaciones de transformación de los resultados obtenidos con el método de referencia de la IFCC a resultados obtenidos con los sistemas JDS/JSCC y NGSP mediante un diseño experimental que permita evitar tanto como sea posible la variabilidad analítica. Estas ecuaciones se emplearían para poder informar de los resultados de IFCC junto con los resultados de JDS/JSCC y NGSP después de la adopción del consenso internacional de armonización de resultados de HbA<sub>1c</sub><sup>18</sup>.

El objetivo secundario de este estudio ha sido comprobar si podría haber diferencias entre los resultados obtenidos mediante la utilización de las ecuaciones desarrolladas en este estudio y los resultados obtenidos mediante la utilización de las ecuaciones previamente publicadas.

## Material y métodos

### Muestras

Para la realización de este estudio se emplearon muestras de sangre del Hospital Universitario de Bellvitge y del Laboratorio Clínico Just Oliveras (Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España). Las muestras se obtuvieron mediante punción venosa y se recogieron en tubos con EDTA como aditivo.

Se midieron un total de 6.002 muestras por dos analizadores resultando en un total de 12.004 mediciones. Para la obtención de la ecuación de transformación de resultados trazables al sistema de referencia de la IFCC a resultados trazables al esquema JDS/JSCC se emplearon 2.000 de estas muestras y 1.002 se emplearon para transformar valores IFCC a valores JDS/JSCC mediante la ecuación previamente publicada y la obtenida en el presente estudio. Estos valores JDS/JSCC se compararon estadísticamente con sus valores JDS/JSCC homólogos obtenidos directamente del analizador.

En el caso de la ecuación de transformación de valores trazables al sistema de referencia de la IFCC a valores trazables al esquema NGSP, se emplearon 2.000 muestras para la obtención de la ecuación y 1.000 para efectuar la comparación estadística de los valores NGSP obtenidos mediante la ecuación previamente publicada y los obtenidos mediante la ecuación desarrollada en el presente estudio con los resultados obtenidos directamente del analizador.

### Analizadores

Para la medición de la proporción de HbA<sub>1c</sub> en las muestras, se emplearon dos analizadores HPLC HA-8160 (Menarini Diagnósticos, España).

Los analizadores estaban equipados con columnas cromatográficas provistas de resinas de intercambio catiónico (Column Unit-HSVI-VP. Arkray Inc. Japón). Se escogió este método por no mostrar interferencias con variantes de hemoglobina, aductos urémicos o hemoglobina acetilada.

Para mantener unas condiciones de medida de muestras constantes, los analizadores se equiparon con los mismos lotes de eluyentes, materiales de calibración y materiales de control.

### Calibración

Ambos instrumentos se calibraron de acuerdo a dos esquemas de estandarización diferentes. Uno de ellos fue calibrado con un calibrador trazable al método de referencia de la IFCC y el otro trazable al esquema de estandarización japonés JDS/JSCC. Posteriormente, este mismo instrumento calibrado según el esquema JDS/JSCC fue calibrado de forma trazable al esquema de estandarización NGSP. Los materiales de calibración fueron proporcionados por Menarini Diagnósticos (Barcelona, España) y poseían la certificación internacional de trazabilidad a los materiales de referencia empleados para la calibración de los métodos de referencia de la IFCC y el método designado por el sistema JDS/JSCC.

Las columnas cromatográficas fueron calibradas simultáneamente al inicio del proceso de obtención de cada una de las ecuaciones y sólo debían ser recalibradas en caso de observarse resultados fuera del intervalo establecido o datos de imprecisión anormales.

Los valores asignados a los materiales de calibración empleados para la calibración del método fueron, en el caso de la obtención de la ecuación de transformación de resultados IFCC a JDS/JSCC: 3,9 y 9,1% para la calibración trazable al sistema de referencia IFCC, 5,1 y 10,6% para la calibración del instrumento según el esquema JDS/JSCC. En el caso de la obtención de la ecuación de transformación de resultados IFCC a NGSP, los valores asignados de los calibradores fueron: 4,1 y 9,3% para la calibración trazable al sistema de referencia de la IFCC y de 5,9 y 10,9% para la calibración trazable al esquema de armonización NGSP.

### Control interno de la calidad

La calidad analítica interdiaria se monitorizó mediante procedimientos estándar de control de la calidad.

Los materiales de control empleados en este estudio fueron *Hb Control Level 1 y 2* (Menarini Diagnostics, Florencia, Italia) y *Lyphocheck Diabetes Control Bilevel* (BioRad Laboratories, Hércules, California, EE. UU.) niveles 1 y 2. Los materiales de control se prepararon, se dispensaron en alícuotas y se almacenaron como se ha descrito previamente por Marrón et al<sup>20</sup> debido a la importante mejora de la precisión y al considerable ahorro que supone la utilización de este sencillo método.

Se procesó una alícuota de cada uno de los niveles de cada material de control al inicio y al final de cada serie analítica en ambos analizadores. Si los resultados obtenidos en una de la ocho alícuotas procesadas por analizador se encontraban fuera de su intervalo de control se rechazaba la serie analítica.

En la primera fase del estudio con el objetivo de establecer la ecuación de transformación de valores IFCC a valores JDS/JSCC, tanto para el analizador calibrado según el sistema de estandarización JDS/JSCC como para el calibrado según el sistema de referencia de la IFCC, se utilizaron los intervalos de control propuestos por el fabricante en el caso del material de control *Hb Control Level* de Menarini Diagnósticos. En el caso del material de control *Lyphocheck Diabetes Control*, se utilizaron los intervalos de control propuestos por el fabricante en el caso del analizador calibrado de forma trazable al sistema de referencia de la IFCC. Por el contrario, se disponía en el caso del instrumento calibrado según el sistema japonés JDS/JSCC de un intervalo de control obtenido anteriormente en nuestro laboratorio.

Dicho intervalo se obtuvo mediante 30 determinaciones de HbA<sub>1c</sub> en el material de control de nivel 1 y 30 determinaciones de HbA<sub>1c</sub> en el material de control de nivel 2 en 30 días consecutivos. Se determinó la media de los resultados y, para la obtención de los límites inferior y superior del intervalo de control se restó y sumó al valor medio obtenido 3,5 veces el valor de la desviación estándar de los 30 resultados.

En la segunda fase del estudio, para la obtención de la ecuación de transformación de resultados IFCC a valores NGSP, los materiales de control empleados fueron los mencionados anteriormente. Los intervalos de control empleados en este caso, no obstante, fueron los propuestos por el fabricante de cada material de control.

## Métodos estadísticos

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del programa informático Analyse-It® versión 1.50 (Analyse-It Software Ltd., Reino Unido).

Para la obtención de las ecuaciones de transformación de valores de HbA<sub>1c</sub> se aplicaron métodos de regresión lineal simple los pares de valores obtenidos, previa verificación, por inspección visual de los datos, que el modelo lineal era adecuado.

Tal y como se describe en el trabajo de Gestlinger et al<sup>21</sup>, el método de regresión lineal de Deming podría emplearse para evitar el sesgo producido en la estimación de la pendiente y la ordenada en origen de las ecuaciones. No obstante, tal y como recomienda el *National Committee of Clinical Laboratory Standards* en su guía EP9-A2<sup>22</sup>, la estimación de las ecuaciones puede realizarse por regresión lineal simple siempre que el coeficiente de correlación

sea superior a 0,975 como ocurre en el caso del presente trabajo.

Para la comparación de los resultados derivados del uso de las ecuaciones desarrolladas en este estudio con los derivados del uso de las ecuaciones previamente publicadas, se empleó la prueba no paramétrica de Wilcoxon para datos apareados. Los datos empleados para la comparación fueron 1.002 resultados JDS/JSCC y 1.000 resultados NGSP de HbA<sub>1c</sub> obtenidos de la transformación de resultados IFCC mediante el uso de las ecuaciones desarrolladas en este estudio y las ecuaciones desarrolladas por Hoelzel et al<sup>19</sup> que son: JDS/JSCC (%) = 0,927IFCC(%) + 1,73 (R<sup>2</sup> = 0,9973) y NGSP (%) = 0,915\*IFCC (%) + 2,5% (R<sup>2</sup> = 0,998). Los resultados JDS/JSCC y NGSP obtenidos mediante el uso de las ecuaciones fueron comparados con sus resultados homólogos directamente obtenidos del analizador.

## Resultados

Los resultados del control interno de la calidad se muestran en las [tablas 1 a 4](#). Estos resultados confirman una adecuada calidad analítica del método HPLC empleado en este estudio para la medición de HbA<sub>1c</sub>. No obstante, durante el desarrollo de la ecuación de transformación de IFCC a JDS/JSCC ha resultado sorprendente observar un coeficiente de variación en el nivel 1 del material de control proporcionado por Menarini Diagnósticos respecto a los valores de imprecisión obtenidos con los restantes materiales de control. El nivel 2 del mismo material de control, por otro lado, muestra un buen coeficiente de variación y se comporta en este sentido como los proporcionados por BioRad.

El valor medio de los 2.000 resultados de HbA<sub>1c</sub> empleados para la obtención de la ecuación de transformación a resultados trazables al sistema JDS/JSCC fue de 7,8% JDS/JSCC y 6,3% IFCC (63 mmol/mol). El límite inferior de la distribución fue de 3,2% JDS/JSCC y 2,0% IFCC (20 mmol/mol). Por otro lado, los límites superiores de la distribución fueron 17,4% JDS/JSCC y 15,4% IFCC (154 mmol/mol). Estas cifras denotan los amplios intervalos de valores empleados para la obtención de las ecuaciones.

En el desarrollo de la ecuación de transformación de valores trazables al sistema de referencia IFCC a valores trazables al esquema NGSP, el valor medio de los 2.000 resultados fue de 7,1% NGSP y 5,2% IFCC (52 mmol/mol). El límite inferior de la distribución fue de 3,6% NGSP y 16% IFCC (16 mmol/mol). Por otro lado, los límites superiores de la distribución fueron: 19,2% NGSP y 18,2% IFCC (182 mmol/mol).

Utilizando el método de regresión lineal simple, se obtuvieron las siguientes ecuaciones de transformación:

$$\begin{aligned} \text{JDS/JSCC (\%)} &= 1,0545 \cdot \text{IFCC (\%)} + 1,129\% \quad (R^2 = 0,9972) \\ \text{NGSP (\%)} &= 0,9293 \cdot \text{IFCC (\%)} + 2,1054\% \quad (R^2 = 0,9979) \end{aligned}$$

En las [figuras 1 y 2](#) se muestran las ecuaciones y los gráficos obtenidos mediante regresión lineal simple.

Los detalles de la regresión lineal simple aplicada se muestran en la [tabla 5](#). Se observa una desviación de la pendiente del 1 y de la ordenada en origen del 0 estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) en el caso de ambas ecuaciones.

**Tabla 1** Resultados de control de calidad en el instrumento calibrado según el esquema de estandarización JDS/JSCC, para la obtención de la ecuación IFCC/JDS-JSCC

| Instrumento calibrado trazable al sistema de estandarización JDS/JSCC |                                       |                       |                     |                       |                                      |                       |                     |                       |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|
| Material de control                                                   | Control inicio serie analítica diaria |                       |                     |                       | Control final serie analítica diaria |                       |                     |                       |
|                                                                       | BioRad 1                              | BioRad 2              | Menarini 1          | Menarini 2            | BioRad 1                             | BioRad 2              | Menarini 1          | Menarini 2            |
| Media observada                                                       | 4,8%<br>(4,62; 4,98)%                 | 9,0%<br>(8,89; 9,19)% | 5,1%<br>(4,0; 6,0)% | 10,6%<br>(9,7; 11,7)% | 4,8%<br>(4,62; 4,98)%                | 9,0%<br>(8,89; 9,19)% | 5,1%<br>(4,0; 6,0)% | 10,6%<br>(9,7; 11,7)% |
| Intervalo de control                                                  |                                       |                       |                     |                       |                                      |                       |                     |                       |
| DE                                                                    | 0,063                                 | 0,064                 | 0,126               | 0,092                 | 0,054                                | 0,065                 | 0,116               | 0,103                 |
| CV (%)                                                                | 1,33                                  | 0,71                  | 2,45                | 0,87                  | 1,13                                 | 0,72                  | 2,27                | 0,97                  |

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; JDS/JSCC: *Japanese Diabetes Society/Japanese Society of Clinical Chemistry*.**Tabla 2** Control de calidad en el instrumento calibrado trazable al sistema de referencia de la IFCC para la obtención de la ecuación IFCC/JDS-JSCC

| Instrumento calibrado trazable al sistema de referencia de la IFCC |                                       |                     |                     |                      |                                      |                     |                     |                      |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Material de control                                                | Control inicio serie analítica diaria |                     |                     |                      | Control final serie analítica diaria |                     |                     |                      |
|                                                                    | BioRad 1                              | BioRad 2            | Menarini 1          | Menarini 2           | BioRad 1                             | BioRad 2            | Menarini 1          | Menarini 2           |
| Media observada                                                    | 3,6%<br>(2,9; 4,2)%                   | 7,7%<br>(6,3; 9,4)% | 3,9%<br>(3,0; 5,0)% | 9,1%<br>(8,0; 10,0)% | 3,5%<br>(2,9; 4,2)%                  | 7,6%<br>(6,3; 9,4)% | 3,9%<br>(3,0; 5,0)% | 9,1%<br>(8,0; 10,0)% |
| Intervalo de control                                               |                                       |                     |                     |                      |                                      |                     |                     |                      |
| DE                                                                 | 0,063                                 | 0,095               | 0,118               | 0,11                 | 0,069                                | 0,085               | 0,112               | 0,096                |
| CV (%)                                                             | 1,76                                  | 1,24                | 3,02                | 1,21                 | 1,94                                 | 1,12                | 2,88                | 1,06                 |

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*.**Tabla 3** Resultados de control de calidad en el instrumento calibrado según el esquema de estandarización NGSP, para la obtención de la ecuación IFCC/NGSP

| Instrumento calibrado trazable al sistema de estandarización NGSP |                                       |                      |                     |                        |                                      |                      |                     |                        |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|--------------------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| Material de control                                               | Control inicio serie analítica diaria |                      |                     |                        | Control final serie analítica diaria |                      |                     |                        |
|                                                                   | BioRad 1                              | BioRad 2             | Menarini 1          | Menarini 2             | BioRad 1                             | BioRad 2             | Menarini 1          | Menarini 2             |
| Media observada                                                   | 5,5%<br>(4,3; 6,4)%                   | 9,5%<br>(7,4; 11,1)% | 5,7%<br>(5,2; 7,2)% | 10,9%<br>(10,2; 12,2)% | 5,5%<br>(4,3; 6,4)%                  | 9,5%<br>(7,4; 11,1)% | 5,8%<br>(5,2; 7,2)% | 10,9%<br>(10,2; 12,2)% |
| Intervalo de control                                              |                                       |                      |                     |                        |                                      |                      |                     |                        |
| DE                                                                | 0,037                                 | 0,1                  | 0,06                | 0,09                   | 0,041                                | 0,077                | 0,052               | 0,091                  |
| CV (%)                                                            | 0,68                                  | 1,05                 | 1,04                | 0,82                   | 0,76                                 | 0,81                 | 0,9                 | 0,83                   |

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; NGSP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*.**Tabla 4** Control de calidad en el instrumento calibrado trazable al sistema de referencia de la IFCC para la obtención de la ecuación IFCC/NGSP

| Instrumento calibrado trazable al sistema de referencia de la IFCC |                                       |                     |                     |                      |                                      |                     |                     |                      |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|--------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Material de control                                                | Control inicio serie analítica diaria |                     |                     |                      | Control final serie analítica diaria |                     |                     |                      |
|                                                                    | BioRad 1                              | BioRad 2            | Menarini 1          | Menarini 2           | BioRad 1                             | BioRad 2            | Menarini 1          | Menarini 2           |
| Media observada                                                    | 3,7%<br>(2,9; 4,2)%                   | 8,1%<br>(6,3; 9,4)% | 4,0%<br>(3,4; 5,4)% | 9,6%<br>(8,8; 10,8)% | 3,7%<br>(2,9; 4,2)%                  | 8,1%<br>(6,3; 9,4)% | 3,9%<br>(3,4; 5,4)% | 9,1%<br>(8,8; 10,8)% |
| Intervalo de control                                               |                                       |                     |                     |                      |                                      |                     |                     |                      |
| DE                                                                 | 0,05                                  | 0,062               | 0,023               | 0,054                | 0,044                                | 0,047               | 0,000               | 0,024                |
| CV (%)                                                             | 1,35                                  | 0,77                | 0,57                | 0,56                 | 1,19                                 | 0,58                | 0                   | 0,25                 |

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; NGSP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*.

**Tabla 5** Detalles del análisis de regresión lineal

|                            | Ecuación IFCC/JDS-JSCC |                     | Ecuación IFCC/NGSP   |                    |
|----------------------------|------------------------|---------------------|----------------------|--------------------|
|                            | Ordenada en origen     | Pendiente           | Ordenada en origen   | Pendiente          |
| Muestras (n)               | 2.000                  | 2.000               | 2.000                | 2.000              |
| Valor                      | 1,129% (p < 0,0001)    | 1,0545 (p < 0,0001) | 0,9292% (p < 0,0001) | 2,016 (p < 0,0001) |
| Error estándar, %          | 0,0084                 | 0,0012              | 0,006                | 0,001              |
| Intervalo de confianza 95% | 1,1125%-1,1456%        | 1,052-1,0569        | 0,927%-0,931%        | 2,095-2,118        |

IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; JDS-JSCC: *Japanese Diabetes Society-Japanese Society of Clinical Chemistry*; NGSP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*.

**Tabla 6** Comparación estadística entre resultados JDS/JSCC obtenidos mediante la ecuación desarrollada en este estudio y la previamente publicada y los equivalentes JDS/JSCC obtenidos directamente del analizador

| Diferencia entre parejas | Ecuación desarrollada en el presente estudio |                                                                              |            | Ecuación previamente publicada                                             |             |            |
|--------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|
|                          | N                                            | Rango media                                                                  | Rango suma | N                                                                          | Rango media | Rango suma |
| Negativa <sup>a</sup>    | 796                                          | 543,08                                                                       | 432.290    | 520                                                                        | 413,75      | 215.248    |
| Positiva <sup>b</sup>    | 206                                          | 340,84                                                                       | 70.213     | 482                                                                        | 596.17      | 287.355    |
| Cero <sup>c</sup>        | 0                                            | Diferencia entre medianas: -0,09<br>Intervalo confianza 95%: -0,097 a -0,082 | 0          | Diferencia entre medianas: 0,049<br>Intervalo confianza 95%: 0,025 a 0,073 |             |            |
| Total                    | 1.002                                        | p < 0,0001                                                                   | 1.002      | p < 0,0001                                                                 |             |            |

<sup>a</sup> Valores JDS ecuaciones < valores JDS del analizador.

<sup>b</sup> Valores JDS ecuaciones > valores JDS del analizador.

<sup>c</sup> Valores JDS ecuaciones = valores JDS del analizador; JDS/JSCC: *Japanese Diabetes Society/Japanese Society of Clinical Chemistry*.

La **tabla 6** muestra los resultados detallados de la prueba de Wilcoxon aplicada para comparar los resultados JDS/JSCC y NGSP obtenidos mediante el uso de las diferentes ecuaciones. En caso de utilizar las ecuaciones desarrolladas en el presente estudio para la transformación de resultados IFCC a resultados JDS/JSCC y NGSP, se observan diferencias estadísticamente significativas con los resultados JDS/JSCC y NGSP obtenidos directamente del analizador (p < 0,0001; Intervalo de confianza 95%: -0,097 a -0,082). Cuando la ecuación empleada en la transformación era la anteriormente

publicada, también se observaron diferencias estadísticamente significativas con los resultados obtenidos directamente del analizador (p < 0,0001; intervalo de confianza 95%: 0,025 a 0,073) (**tablas 6 y 7**).

## Discusión

Mediante el uso de las ecuaciones desarrolladas en este estudio, se puede efectuar la transformación de

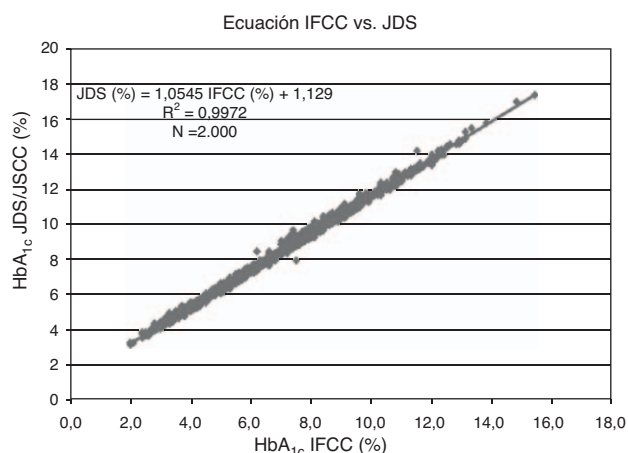
**Tabla 7** Comparación estadística entre resultados NGSP obtenidos mediante la ecuación desarrollada en este estudio y la previamente publicada y los equivalentes NGSP obtenidos directamente del analizador

| Diferencia entre parejas | Ecuación desarrollada en el presente estudio |                                                                               |            | Ecuación previamente publicada                                                |             |            |
|--------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|
|                          | N                                            | Rango media                                                                   | Rango suma | N                                                                             | Rango media | Rango suma |
| Negativa <sup>a</sup>    | 823                                          | 537,92                                                                        | 442.707    | 741                                                                           | 532,84      | 394.836,5  |
| Positiva <sup>b</sup>    | 177                                          | 326,51                                                                        | 57.793     | 259                                                                           | 407,97      | 105.663,5  |
| Cero <sup>c</sup>        | 0                                            | Diferencia entre medianas: -0,073<br>Intervalo confianza 95%: -0,079 a -0,069 | 0          | Diferencia entre medianas: -0,049<br>Intervalo confianza 95%: -0,055 a -0,044 |             |            |
| Total                    | 1.000                                        | p < 0,0001                                                                    | 1.000      | p < 0,0001                                                                    |             |            |

<sup>a</sup> Valores NGSP ecuaciones < valores NGSP del analizador.

<sup>b</sup> Valores NGSP ecuaciones > valores NGSP del analizador.

<sup>c</sup> Valores NGSP ecuaciones = valores NGSP del analizador; NGSP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*.

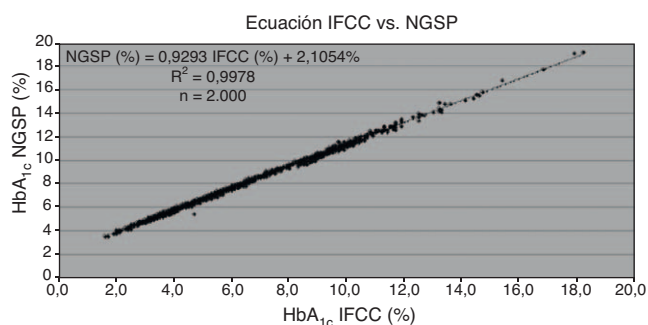


**Figura 1** Ecuación IFCC/JDS-JSCC y distribución de valores. IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; JDS/JSCC: *Japanese Diabetes Society/Japanese Society of Clinical Chemistry*.

resultados IFCC de HbA<sub>1c</sub> a resultados trazables a los sistemas de estandarización JDS/JSCC y NGSP. Por otro lado, los laboratorios que calibren sus instrumentos según JDS/JSCC o NGSP también pueden emplear estas ecuaciones para la transformación en sentido inverso, es decir, de resultados JDS/JSCC o NGSP a resultados IFCC con la expresión  $IFCC (\%) = (JDS [\%] - 1,129\%) / 1,0545$  o  $IFCC (\%) = (NGSP [\%] - 2,5) / 0,915$ . Para expresar el resultado en unidades internacionales (mmol/mol) sólo habría que multiplicar el resultado IFCC obtenido en porcentaje por 10.

Las características del diseño de este estudio han permitido obtener dos ecuaciones de transformación sólidas debido principalmente, al elevado número de muestras empleado.

La calidad de las ecuaciones también se debe al estricto mantenimiento de unas condiciones analíticas constantes en los dos analizadores empleados para efectuar las mediciones de HbA<sub>1c</sub>. Parece esencial en el desarrollo de ecuaciones de transformación de valores el uso de los mismos instrumentos, las mismas muestras y los mismos equipos de reactivos, calibradores y materiales de control para evitar, tanto como sea posible, las fuentes de variabilidad analítica, dejando de lado la incertidumbre asociada a la asignación de valores



**Figura 2** Ecuación IFCC/NGSP y distribución de valores. IFCC: *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*; NGSP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*.

a los calibradores, la cual se transfiere, inevitablemente, a los resultados finales.

Debido a las pequeñas diferencias entre los resultados obtenidos a partir de las ecuaciones previamente publicadas y los obtenidos a partir de las ecuaciones desarrolladas en este estudio, se puede afirmar que éstas últimas son válidas para transformar resultados IFCC de hemoglobina A<sub>1c</sub> a resultados JDS/JSCC o NGSP y viceversa.

Recientemente, de acuerdo con el documento internacional de consenso<sup>18</sup>, nuestro laboratorio ha calibrado sus analizadores de HbA<sub>1c</sub> de forma trazable al sistema de referencia de la IFCC e informa sus resultados en valores IFCC (mmol/mol) y en valores NGSP en porcentaje. Hasta este momento, los resultados de HbA<sub>1c</sub> que se informaban a los solicitantes de nuestro hospital eran únicamente valores JDS/JSCC. Para evitar la confusión que puede surgir en la adopción del documento internacional de consenso debido a las diferencias entre los diferentes valores que se informan y para permitir una correcta familiarización con ellos, se habilitará un tiempo de transición en el que coexistan, en un mismo informe de laboratorio, resultados IFCC, NGSP y JDS/JSCC. Estos dos últimos valores se obtendrán de la transformación de los resultados IFCC obtenidos de los analizadores mediante el uso de las ecuaciones desarrolladas en este estudio. En conclusión, se han desarrollado dos ecuaciones que permite la conversión de resultados de HbA<sub>1c</sub> según distintas estandarizaciones considerablemente robustas debido en primer lugar al elevado número de muestras con las que se han obtenido respecto a las ecuaciones previamente publicadas y en segundo lugar a la aceptable reproducibilidad de los resultados (CV), pese a que es ligeramente inferior a la obtenida por la red de laboratorios de referencia en la que se desarrollaron las ecuaciones previamente publicadas. Hay que tener en cuenta que las ecuaciones obtenidas en el presente estudio sólo serían utilizadas en nuestro laboratorio y no sería recomendable que se utilizaran en otros laboratorios. Pese a que estadísticamente existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados JDS/JSCC y NGSP obtenidos directamente del analizador y sus homólogos obtenidos mediante la transformación de resultados IFCC con las ecuaciones previamente publicadas y las obtenidas en este trabajo, éstas diferencias son numéricamente pequeñas (alrededor de 0,1%) con lo que no serían clínicamente significativas.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

A Antonio Cayuela y Alberto Diego (Menarini Diagnósticos, España).

## Bibliografía

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The Effect of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 1993;14:977–86.

2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in-patient with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998;352:837–53.
3. American Diabetes Association. Standards of medical care-2010. *Diab Care*. 2010;33 Suppl:S11–61.
4. Stott A, Casson F, Higgins GJ. Glycated haemoglobin assays. Approaches to standardisation results. *Diabetic Medicine*. 2001;18:274–9.
5. Mosca A, Goodall I, Hoshino T, Jeppsson JO, Garry John W, Little RR, et al. Global standardisation of glycated haemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:1077–80.
6. Nordin G, Dybkær. Recommendation for term and measurement unit for "HbA<sub>1c</sub>". *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:1081–1082.
7. Miedema K. Towards world-wide standardisation of HbA<sub>1c</sub> determination. *Diabetologia*. 2004;47:1143–8.
8. Little RR. Glycated haemoglobin standardisation – National Glycohaemoglobin Standardisation Program (NGSP) perspective. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1191–8.
9. Terrés-Speziale AM. Programa nacional de estandarización de glicohemoglobina. *Rev Mex Patol Clin*. 2006;53:157–65.
10. Miedema K. Standardisation of HbA<sub>1c</sub> and optimal range of monitoring. *Scand J Clin Lab Invest*. 2005;65 Suppl:S61–72.
11. Garry John W. Haemoglobin A<sub>1c</sub>: Analysis and standardisation. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1199–212.
12. Home P, Mbanya JC, Horton E. Standardisation of glycated haemoglobin. *BMJ*. 2004;329:1196–7.
13. Sacks DB. Global harmonisation of haemoglobin A<sub>1c</sub>. *Clin Chem*. 2005;4:681–3.
14. Molinaro RJ. Targeting HbA<sub>1c</sub>: standardisation and clinical laboratory measurement. *Medical Laboratory Observer*. 2008;40:10–9.
15. Rifai N. Implementation of standardisation of haemoglobin A<sub>1c</sub> measurement. Condensed summary of the meeting with manufacturers held in Milan, Italy, December 12, 2007. *Clin Chem*. 2008;54:1098.
16. Goberna R, Aguilar-Diosdado M, Santos Rey K, Mateo J. Armonización de resultados de HbA<sub>1c</sub> en España. *Rev Lab Clin*. 2009;2:56–8.
17. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA<sub>1c</sub> in human blood. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40:78–89.
18. Consensus Committee. The American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and the International Diabetes Federation. Consensus statement on the worldwide standardisation of the haemoglobin A<sub>1c</sub> measurement. *Diabetes Care*. 2007;30:2399–400.
19. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, et al. IFCC reference system for measurement of haemoglobin A<sub>1c</sub> in human blood and the national standardisation schemes in the United States, Japan and Sweden: A method-comparison study. *Clin Chem*. 2004;50:166–74.
20. Marron PI, Soria PR, Ramos PA, Moreno MA. Optimization of imprecision and cost saving on hemoglobin A<sub>1c</sub> controls through aliquot freezing. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:1199.
21. Geistanger A, Arends S, Berding C, Hoshino T, Jeppsson JO, Little R, et al. Statistical methods for monitoring the relationship between IFCC reference measurement procedure and the designated comparison methods in the United States, Japan and Sweden. *Clin Chem*. 2008;54:1379–85.
22. NCCLS Document EP9-A2. Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline. 2.<sup>a</sup> ed. Wayne, PA: NCCLS; 2002.