

LAS HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS CUANTITATIVOS PARA SU ESTUDIO

German F. Sáenz Renauld, Luis F. Rojas Solano****, Mario Chaves Villalobos*,
Eugenia Quintana Guzmán*, Javier Jiménez Araya*, Alberto G. Montero Porras**

Key Word Index: Hemoglobin A, glycosylated analysis

RESUMEN

Se discuten algunos aspectos relacionados con la heterogeneidad química de la molécula de hemoglobina, especialmente los relacionados con las hemoglobinas glicosiladas. Se llevó a cabo una comparación de tres métodos analíticos que se han diseñado para su cuantificación, para determinar así cuál es el más útil como método de rutina en nuestros laboratorios clínicos. El estudio se basó en dos procedimientos microanalíticos, cuyo fundamento es la cromatografía de intercambio iónico, los cuales fueron comparados entre sí y con un procedimiento colorimétrico.

Se presentan los resultados obtenidos en ese estudio, así como también la recomendación sobre la escogencia del método que podría ser usado en la rutina analítica, para la cuantificación de las hemoglobinas glicosiladas. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1986; 7(1):29- 40].

INTRODUCCIÓN

La heterogeneidad molecular de la hemoglobina (Hb) humana es un hecho plenamente reconocido. Kunkel y Wallenius (10) en 1955, fueron los primeros en observar las fracciones menores de la Hb, en electroforesis en bloque de almidón; describieron un componente pequeño y lento (HbA₂) y una fracción rápida (HbA₃), perfectamente diferenciables del componente mayor (HbA₀), o Hb A del adulto. Allen *et al.* (1), fueron los primeros en separar las Hbs A_{1a}, A_{1b} y A_{1c} (Hb A₁) de las Hbs A₀ y A₂, por cromatografía en columna con una resma de intercambio catiónico. Esas fracciones menores resultaron ser idénticas a la Hb A₃, observable por electrofore-

sis convencional como una fracción difusa y anódica (por su mayor carga negativa) respecto de la A₀. Por muchos años estas fracciones rápidas de la Hb permanecieron solamente como una curiosidad, hasta que, en 1967, Rahbar (18) demostró que su concentración se halla incrementada en los pacientes diabéticos descompensados, por lo cual las reportó bajo la designación de "componente hemoglobínico del diabético".

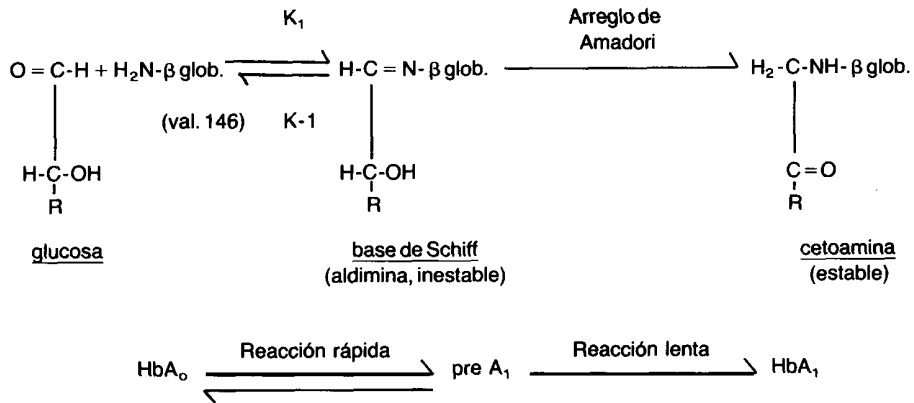
Trabajos posteriores confirmaron la perfecta identidad entre la "Hb diabética" y la HbA_{1c} (20, 21). Posteriormente, McDonald *et al.* (12) comprobaron las diferentes afinidades de las diversas fracciones de la Hb A₁ por el oxígeno. Se encontró que existe mayor afinidad de las Hbs glicosiladas, situación fisiológica que podría tener implicaciones en el paciente diabético (19). Bunn *et al.* (2), corroboraron finalmente, la existencia de esos cuatro componentes menores glicosilados de la HbA₀, y llevaron a cabo su cuantificación. La Hb A_{1c} ha sido la más extensamente estudiada por ser la más abundante de todas. En un trabajo preliminar (22) se hizo hincapié en la importancia de la medición de la HbA₁ como parámetro del estado metabólico del paciente diabético y de los aspectos bioquímicos de estas hemoglobinas glicosiladas. Estas fracciones son derivados formados por una reacción de glicosilación que sufre la Hb con la glucosa o con algunos de sus metabolitos, en especial con la 1-amino-1-desoxifruktosa, como se ilustra en la Figura 1. La reacción de glicosilación es lenta pues no es catalizada por enzimas; es irreversible y depende exclusivamente de la concentración de la glucosa intraeritrocitaria (5). Como la entrada de la glucosa al eritrocito se efectúa sin la participación de la insulina, la concentración de ese monosacárido en el interior de esa célula es un reflejo de su concentración en el plasma. Esto explica por qué la reacción de glicosilación es más rápida en la sangre con elevada concentración de glucosa, condición que ocurre en el paciente diabético no compensado (22).

* Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA): Cátedra de Hematología, Universidad de Costa Rica. Hospital San Juan de Dios. San José, Costa Rica.

** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

FIGURA 1

REACCIÓN DE GLICOSILACIÓN DE LAS CADENAS β DE LA HEMOGLOBINA



Métodos analíticos para cuantificar Hbs glicosiladas

Luego de la separación cromatográfica de las Hbs glicosiladas por Allen *et al.* (1), Trivelli (29), modificó el método haciéndolo más práctico y rápido. En 1978, Jones *et al.* (9) diseñaron un procedimiento microcromatográfico para la cuantificación de las fracciones hemoglobínicas A_{1a+b} y HbA_{1c}. El método era menos elaborado que otros, pero siempre lento, ya que se tenía que determinar visualmente la elución de cada una de las fracciones (A_{1a+b}, A_{1c} y A₀ + A₂). Luego de una serie de versiones microcromatográficas, Friedman y Humbert (5) describieron un sencillo método para la medición cuantitativa de la HbA₁, con separación de sus componentes (A_{1a}+A_{1b} y A_{1c}) de las Hbs A₀ + A₂, con la ventaja de prescindir de una observación visual constante de la microcolumna. Posteriormente, Chou *et al.* (3) y Kynoch y Lehmann (11), introdujeron a esta metodología ligeras modificaciones, que hicieron del procedimiento microcromatográfico un método rápido y de fácil aplicación en los laboratorios clínico de rutina. Este procedimiento es el que, con ligeras modificaciones, preconizan al menos dos casas comerciales: Isolab (Akron, Ohio) y Helena (Beaumont, Texas). Según éstas, todas las fracciones hemoglobínicas y glicosiladas se eluyen juntas como un solo componente, el cual para los efectos prácticos de designa como HbA₁total.

La utilización de la cromatografía líquida de alta

presión, permite también la separación nítida de las fracciones de la HbA₁, pero se requiere equipo especializado y su costo es relativamente alto (25). La electroforesis también puede utilizarse para estos fines, siendo la mejor aquella que se realiza sobre geles de agar ácido (13). Recientemente, se han desarrollado procedimientos de radioinmunoanálisis (RIA) para determinar HbA_{1c} (8), pero no existe antisuero disponible comercialmente. De igual manera se han preconizado métodos de isoelectroenfoque (26, 27), los cuales han dado buena correlación con los de cromatografía en columna. Desde el punto de vista espectrofotométrico, la casa Abbott Laboratories (North Chicago, IL) ha desarrollado uno basado en los cambios del espectro de absorción de la HbA cuando se une el ácido fólico. Como la HbA_{1c} no se une a este ácido, una muestra con incremento de la HbA₁ mostrará un pequeño cambio en la absorbancia luego de la adición de ácido fólico. La casa Kyoto (Kyoto Diagnostic, Inc., Elkhart, Indiana) recomienda un método que utiliza resma no empacada en microcolumna, y lectura de la HbA₁ obtenida en el sobrenadante en un fotómetro computarizado. Dentro de los métodos colorimétricos se halla el de Fluckiger y Winterhalter (4), el cual mide todas las hexosas unidas a la HbA, sea A₀, S, C, D, E, etc. En el Cuadro 1 se indica un resumen de los métodos más usados para HbA₁, con sus defectos y virtudes.

CUADRO 1

MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS [DE (7), MODIFICADO]

MÉTODO	TIPOS DE Hbs GLICOSILADOS MEDIDOS	COMENTARIOS
-Cromatografía líquida de alta presión	A_{1a+1b} y Hb_{1c}	Requiere equipo especializado; la HbF interfiere; no se mide la glicosilación de las Hbs S y C.
-Microcromatografía	A_1 (*)	La HbF interfiere; no se mide la glicosilación de las Hbs S y C; asequible comercialmente; abundante experiencia en los laboratorios clínicos; hay interferencia con variantes rápidas de la HbA.
-Electroforesis	A_1	La HbF interfiere; puede cuantificarse la glicosilación de las Hbs S y C; existe comercialmente; poca experiencia en los laboratorios clínicos. Los métodos recomendados son los de gel de agar ácido y el isoelectroenfoque.
-Espectrofotométricos	A_1	Poca experiencia en los laboratorios clínicos.
-Colorimétrico	Hemoglobina glicosilada total (A_1)	No interfiere la HbF; son medidas todas las Hbs glicosiladas, incluyendo la S y la C; exige una cuidadosa estandarización que asegure confianza analítica; moderada experiencia en los laboratorios clínicos.

(*) En algunos métodos se puede separar la HbA_{1a+1b} de la HbA_{1c} .

En la presente comunicación indicamos los resultados obtenidos al comparar tres métodos para cuantificar HbA_1 , dos microcromatográficos y uno colorimétrico, con el afán de estimular la realización de esta prueba en los laboratorios clínicos del país.

ESTUDIO EXPERIMENTAL

Material y Métodos

Se obtuvo sangre de 80 individuos aparentemente normales, de uno y otro sexo, con edades comprendidas entre los 18 y 40 años. Con esta muestra se hizo un estudio de los niveles de HbA_1 con tres métodos. La selección de los Individuos se hizo sobre la base de una condición de glucemia normal y una historia clínica negativa de diabetes tanto particular como familiar. Así mismo, se exigió un hemograma normal y una electroforesis de la Hb normal. Como mues-

tra comparativa se incluyeron 20 pacientes diabéticos, 15 no compensados y 5 compensados. También fueron incluidas cinco personas poseedoras del rasgo de F-talasemia con el fin de demostrar el papel interferente de la HbF en los procedimientos a investigarse.

Métodos

Para la selección de las muestras normales se siguieron los criterios ampliamente difundidos en la literatura, los de química-clínica y los hematológicos. La cuantificación de la HbA_1 se llevó a cabo por tres procedimientos:

I. Método microcromatográfico de la casa Helena Laboratories:

(Beaumont, Texas), denominado "Glyco Hb Quik Column Procedure". Los fabricantes proveen un juego de reactivos que incluye columnas que contienen una resma de intercambio

catiónico, preparada en una solución tampón de fosfato de sodio 0,04 M, con KCN al 0,065 por ciento, y azida de sodio al 0,01 por ciento como preservativo. El separador cromatográfico de la HbA₁ lo es un tampón de fosfatos, KCN y azida de sodio en las concentraciones arriba señaladas. La preparación del hemolizado que se va a someter a cromatografía, se lleva a cabo con el uso de sangre total y un reactivo hemolizante a base de saponina, KCN y azida de sodio. Este hemolizado se utiliza también para preparar el patrón (100%) que permite la lectura del eluido problema. Deben tomarse en cuenta una serie de detalles técnicos con el fin de lograr óptimos resultados. Con el juego de reactivos se incluye una tabla de conversión de temperatura, la cual se debe usar también en el método que se describe a continuación.

II. Método microcromatográfico basado en el método de Kynoch y Lehmann (11) modificado en el CIHATA:

Y siguiendo también las recomendaciones de Ruíz-Arguelles, del Instituto Nacional de la Nutrición, México (Comunicación personal). Fundamento: Al igual que el de la casa Helena, éste es un método microcromatográfico de intercambio catiónico, en el cual la resina cargada negativamente presenta una afinidad selectiva por moléculas proteicas cargadas positivamente. A una fuerza iónica y un pH crítico, las Hbs glicosiladas se hallan cargadas menos positivamente que las otras, por lo que la HbA₁ puede ser eluída con un tampón adecuado, comparándose su absorbancia con la de un patrón (100%) preparado a partir del mismo hemolizado.

Reactivos:

- Resina BioRex 70(100-200 mesh), forma sódica (BioRad Laboratories).
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 6,79 ± 0,01 para la fracción rápida (HbA₁) y la estabilización de la resina: se pesan 4,59 g de fosfato monosódico monohidratado (ó 5,18 del dihidratado); 1,18 g de fosfato disódico y 0,65 g de KCN, aforando a un litro con agua destilada-desionizada. Se ajusta el pH con HCL concentrado, o en su caso, con NaOH 2,5 M.

Preparación de la resma (modificación del CIHATA)

Hidratación:

1. Se pesan 50 g de la resina BioRex 70 y se colocan en un frasco grande con una capacidad aproximada de 1 litro. Se mezclan con 150 ml de agua destilada.
2. Se deja sedimentar la resina y se elimina el exceso de agua.

Conversión:

Se añaden 200 ml de NaOH 0,5 M al beaker que contiene la resina libre de sobrenadante. Se mezcla bien y se deja en reposo por 30 minutos. Se elimina el sobrenadante. Se repite dos veces el mismo procedimiento. Se lee el pH del último sobrenadante. Si no es mayor de 9, se sigue resuspendiendo la resina con el NaOH hasta obtener dicho pH. Se elimina el sobrenadante.

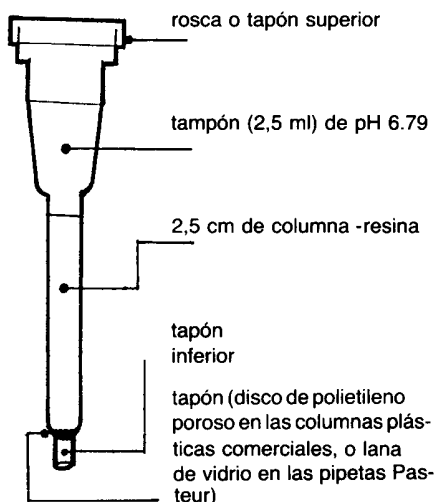
Equilibrio:

1. Se prepara un sistema de filtración por succión formado por un embudo, de papel de filtro apropiado y un frasco adaptable a una trompa de vacío.
2. Se pasa la resina al embudo y se reparte bien en la porción inferior del mismo. Se lava con abundante agua destilada (varios galones) hasta que se obtenga en el filtrado un pH menor de 9. Si esto no se lograra en el día, se resuspende la resina en 200 ml de agua y se deja en refrigeración toda la noche. Al día siguiente, se repite lo anterior cuanto sea necesario hasta obtener un pH menor de 9. Si no se posee el sistema de lavado por filtración, lo anterior puede ejecutarse lavando la resina en un beaker con agua, eliminando los sobrenadantes, y así repetidamente hasta lograr el pH indicado.
3. A la resina libre de sobrenadante, se le añaden 100 ml de ácido acético 0,05 M. Se mezcla bien por 30 minutos en un agitador mecánico y posteriormente se lee el pH.
4. Se coloca la resina otra vez en el sistema filtración-succión y se lava cuantas veces sea necesario con agua destilada hasta obtener un pH aproximadamente de 5. Se elimina el sobrenadante (filtrado) cuando se llegue a ello.
5. En un beaker, se equilibra la "papilla" de resina con el uso del tampón de fosfatos de pH. En cada adición de 200 ml del tampón se resuspende bien la resma y dejarla sedimentar. Se decanta o aspira el sobrenadante en cada turno. Deberá obtenerse, al final del equilibrio deseado, el pH de 6,79 tanto en el sobrenadante como en la suspensión de la resma. Así logrados estos propósitos, la re-

sina se guardará bajo refrigeración con el tampón de pH 6,79 en una relación de volúmenes 1:1.

Preparación de las columnas:

Con pipetas Pasteur (a las cuales se les ha colocado un pequeño tapón de lana de vidrio en la parte inferior de su diámetro mayor) se prepara, con la suspensión de la resina, una columna de 2,5 cm para la microcromatografía, con la precaución de que unos pocos mililitros del tampón de pH 6,79 sobrenaden sobre la columna empacada. De inmediato se obtura el extremo inferior de la pipeta con una pequeña cantidad de plasticina y el superior con "parafilm". Si se desea, pueden utilizarse columnas desechables de los que se utilizan en RIA para T₃ y T₄ (7-9 cm de alto por 0.8-1.3 de ancho en la espiga), tal y como se indica en el esquema siguiente:



Preparación del hemolizado (modificación del CIHATA)

1. Se colocan 0,4 ml del reactivo hemolizante.
2. Se adiciona 0,020 ml de sangre total obtenida con EDTA.
3. Se mezcla bien por rotación o en un vortex y se deja en reposo por 10 minutos antes de usarse.

Método

1. Se coloca la columna para microcromatografía (pipeta Pasteur, columnas desechables de RIA, etc.) en una gradilla.

2. Es necesario tener a mano un tubo pequeño y uno grande para cada muestra: el primero debe tener una marca a los 3 ml y el segundo una a los 15 ml.
3. Se remueve el "parafilm" de la pipeta Pasteur o la tapa superior de la columna descartable y se resuspende muy bien el contenido de la columna usando una pipeta Pasteur y bulbo de hule. Se remueve el tapón inferior inmediatamente y se deja drenar el tampón en el tubo grande (16 x 100 mm). A los pocos minutos el sobrenadante se habrá eluido completamente y se desecha.
4. Se almea la columna sobre el tubo pequeño (12 x 75 mm) marcado a 3 ml.
5. Se coloca cuidadosamente 0,1 ml del hemolizado en el extremo superior de la columna de resina, evitándose su resuspensión.
6. Después de que se entrapa la muestra en la resina (pocos segundos), se aplican 2,5 ml de tampón de pH 6.79.
7. Después de que se completa la elución de la fracción rápida (HbA₁) (tiempo aproximado de 25-30 minutos), se lleva el tubo a un volumen final de 3 ml con agua destilada.
8. Se prepara un patrón de 100 por ciento de Hb de la siguiente manera: se coloca 0,1 ml del hemolizado en un tubo aforado de 15 ml y se afora con agua destilada-desionizada. Se mezcla bien por inversión. Se lee el contenido de ambos tubos (HbA₁ y patrón) a 415 nm contra un blanco de agua destilada.

Cálculos:

$$\% \text{ de HbA}_1 = \frac{\text{D.O. HbA}_1}{5 (\text{D.O. del patrón})} \times 100$$

Es importante que cada laboratorio obtenga sus propios valores normales o de referencia. Debido a que la temperatura es crucial, se debe tomar la misma en las condiciones de la prueba (termómetro introducido en el tampón que se utiliza para eluir la HbA₁ o en el agua para preparar el patrón de 100%). Se adjunta a este trabajo las Tablas de Conversión de Temperatura, para calcular valores reales de HbA₁.

Consideraciones analíticas en torno a los procedimientos microcromatográficos para HbA_{1c} (HbA₁)

- a. Las muestras de sangre pueden recogerse con cualquier anticoagulante, salvo heparina, la cual produce valores falsamente elevados.

- b. Se recomienda el uso de sangre fresca; de otra forma, se obtienen resultados satisfactorios si la misma se deja (como sangre total-EDTA) hasta por cinco días en refrigeración (2-6°C). Luego de 24 horas a temperatura ambiente, la sangre en estudio mostrará valores falsamente elevados. Lo contrario ocurre si se deja la sangre más allá de 5 días en refrigeración.
- c. Para óptimos resultados, las muestras y todos los reactivos deben equilibrarse a 22° C antes de realizar la cromatografía. Sin embargo, el procedimiento puede efectuarse entre 18 y 30° C, siempre y cuando el valor encontrado se corrija a fin de obtenerse el valor real. La corrección que se haga permitirá demostrar que los valores se elevan falsamente al aumentar la temperatura y que disminuyen por el efecto contrario.
- ch. Es esencial la lisis total de los eritrocitos. Si es incompleta se producirán valores falsamente elevados.
- d. Como La HbF no se une a la resina (al menos a las de intercambio catiónico), será coeluida con la HbA₁, por lo que se obtendrá valores falsamente elevados. Un conocimiento exacto de los niveles de HbF (por el método de Betke, inmunodifusión o RIA) podrá permitir interpretar en buena forma los resultados de la HbA₁ en un paciente determinado.
- e. Las Hbs S y C se unen más fuertemente a la resina de lo que lo hace la HbA₀. Por lo tanto, si aquellas se hallan glicosiladas, el resultado de la HbA₁ será menor de lo real. La presencia de las infrecuentes hemoglobinas rápidas tipo N, I, J, H y Bart producirán, por lo contrario, valores falsamente elevados (se coeluyen con la HbA₁).
- f. En pacientes con anemia hemolítica, el porcentaje de la HbA₁ será menor de lo esperado (tanto en diabéticos como no diabéticos), pues interfiere el parámetro derivado de la sobrevivencia disminuida de los eritrocitos en cuestión. Esta lamentable interferencia se ha pretendido usar para el seguimiento del paciente con anemia hemolítica (14).
- g. Es deseable contar siempre con un hemolizado control (normal, alto) para HbA₁. En el comercio pueden obtenerse algunos de ellos. Nosotros hemos logrado una buena estabilidad (8 días a 4°C) preparando un hemolizado de sangre fresca (9-12 g/dl) con el uso de los mismos reactivos que se utilizan en la prueba (saponina, KCN y azida).
- h. Pacientes con falla renal crónica, con o sin tratamiento con hemodiálisis, exhiben niveles incrementados de HbA_{1c} (HbA₁) por cromatografía, por lo que se ha llamado la atención sobre el seguimiento del control de la glicemia en pacientes diabéticos con una marcada reducción de la función renal (7). Otros autores (6) han sugerido que los valores de la HbA₁ se reporten en g/dl en vez de porcentaje, con lo cual, entre otras consideraciones, los valores de Hb glicosilada no mostrarían los niveles incrementados que se reportan en la enfermedad renal crónica.
- i. Para obviar la codeterminación de la forma inestable de la HbA₁ (la aldimina o base Schiff), la cual aumenta durante fluctuaciones agudas de la glicemia, se ha sugerido incubar previamente los eritrocitos con solución salina isotónica, para así luego obtener valores exactos y reales de la HbA₁ (17).

III. Método colorimétrico modificado de Fluckiger y Winterhalter (4)

Este procedimiento mide todas las hexosas unidas a la Hb. El desarrollo del método incluye la hidrólisis parcial de las hexosas unidas a la Hb con ácido oxálico con la formación de 5-hidroxi-metilfurfural (5-HMF), el cual luego se hace reaccionar con ácido tiobarbitúrico para formar un producto coloreado con un pico de absorbancia característico a 443 nm. El método que aquí se preconiza no utiliza curva de calibración, siendo por lo tanto una modificación del original (4) y de otros semejantes (15, 16, 24).

Reactivos

- Ácido oxálico (AO) 0,5 M, preparado en agua desionizada: se disuelven 6,3 g de AO en agua y se diluye a 100 ml.
- Ácido tiobarbitúrico (ATB = a A2-TB) 0,05 M: se disuelven 0,810 g de ATB en 100 ml de agua desionizada. La disolución se realiza a una temperatura aproximada a los 40°C con agitación magnética. Se ajusta el pH a 6,0 ±0,1 con NaOH 5 M. Se deja enfriar y se mantiene al menos 12 horas a 4°C antes de utilizarlos. Se emplea el sobrenadante. El reactivo es estable a 4°C durante 15 días. La aparición de un color amarillo indicará su alteración.
- Ácido tricloroacético (ATC) 40%: se disuelven 40 g de ATC hasta 100 ml con agua desionizada.

Método

1. Con el uso de tubos con tapa de rosca 15 x 125 mm, se añade 1 ml de ácido oxálico al 0,5 M a 2 ml de hemolizado de prueba al 10 por ciento (10 g/dl). Se calienta a reflujo durante 1 hora a 100°C (agua hirviendo), dejándose tapados los tubos. Se enfría posteriormente a temperatura ambiente.
2. Se toma 2 ml del sobrenadante anterior y se mezclan con 0,5 ml de ATB. Se incuba a 40°C por espacio de 40 minutos.
3. Se efectúa la lectura de la A de prueba contra agua a 443 nm, utilizándose cubetas cuadradas de 1 cm de sección.

Cálculos:

$$\% \text{ de HbA}_1 = \frac{\text{A prueba}}{0,029}$$

Comentarios sobre el método:

- a. Es imperativa la concentración del hemolizado de prueba (10 g/dl).
- b. La preparación del hemolizado se hará de acuerdo con la técnica convencional de eliminación previa del plasma, lavado de los eritrocitos tres veces con salina, hemólisis en agua destilada y posterior adición de CCL₄.
- c. La especificidad de la reacción entre el 5 - HMFy el ácido tiobarbitúrico no está bien definida.
- ch. En vista de que ninguna reacción de la marcha analítica es estequiométrica, las condiciones del análisis deben ser cuidadosamente estandarizadas. Por este motivo, se ha sugerido el uso de un estándar interno en la metodología. La fructuosa (1 mmol/l; Baker Chemical Cp., Phillips Surg, N.I.) parece ser un adecuado estándar interno para ambas fases del análisis (15). El 5-HMF (100 umol/l, Sigma, St. Louis) sirve también como estándar interno para la reacción con el ATB (15).
- d. Los hemolizados se pueden guardar varias semanas a 0°C sin que la determinación de HbA₁ con este procedimiento pierda valor analítico.
- e. Este método mide solamente hexosas ligadas como cetoaminas, no así las ligadas como base de Schiff (forma lábil intermedia de la HbA₁). Así, la HbA₁ por este método no es sensible a cambios en la cantidad de

aldimina (base de Schiff) debido a fluctuaciones de la glucosa plasmática, en contraste con los métodos cromatográficos y electroforéticos (7). Por esta razón, el ensayo colorimétrico puede ser un mejor indicador del control glucémico de largo plazo (16 a 10 semanas), respecto de lo que miden aquellos procedimientos cuando existen grandes y recientes fluctuaciones de los niveles de glucosa sanguínea.

- f. Como ocurre con el RIA y el isoelectroenfoque - pero no con los cromatográficos-, en el método colorimétrico no hay interferencia por valores elevados de HbF. Por otra parte, el método colorimétrico detecta a las Hbs glicosiladas S y C, como también otras anormales que se hallen glicosiladas.
- g. Algunos autores (15) recomiendan en cada ensayo el análisis de un blanco de hemolizado, en el cual el ATB es omitido. Ellos han encontrado que la cantidad de color generado en el blanco es independiente del hemolizado cuando su concentración se ajusta estrictamente y se respetan los tiempos de la hidrólisis inicial. Estas últimas consideraciones analíticas son especialmente válidas para el procedimiento colorimétrico que utiliza autoclave a 124 ± 1°C y una presión de 124 ± 3 KPa (15).
- h. En los procedimientos que utilizan fructosa o 5-HMF, para la curva de calibración, los valores se reportan en nmol o en ug de RMF formado en la reacción final.

RESULTADOS

En el Cuadro 2 se aprecian los valores obtenidos por HbA₁ con los tres métodos objeto de comparación. Es observable la buena correlación entre ellos, en especial entre los dos microcromatográficos (Cuadro 3). En los cuadros 4 y 5 se indican los valores de HbA₁ en diabéticos sin y bajo control, respectivamente, destacándose la buena correlación de los tres procedimientos. De los resultados que se indican en el Cuadro 6 se destaca la interferencia positiva que ocasionan los valores elevados de la Hb F en los métodos microcromatográficos, no así con el colorimétrico.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La medición de las hemoglobinas glicosiladas es muy útil en el manejo de la diabetes mellitus, al constituirse en un índice objetivo de los niveles de la glucemia durante las 6 a 10 semanas

CUADRO 2

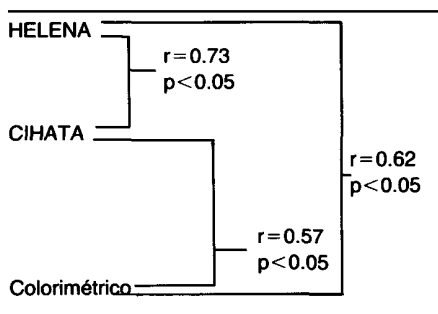
VALORES DE HbA₁ (%) EN 80 INDIVIDUOS APARENTEMENTE NORMALES

MÉTODO	(\bar{X})	D.S.	AMPLITUD
HELENA*	6.57	0.89	4,79-8,35
CIHATA*	6.51	0.85	4,81-8,21
Colorimétrico	6.67	0.79	5,09-8,25

* Microcromatografía

CUADRO 3

CORRELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS MÉTODOS (HbA₁)



previas a su determinación, toda vez que su síntesis ocurre lenta pero continuamente en el eritrocito a través de sus 120 días de sobrevivida. La formación de las hemoglobinas glicosiladas ha permitido documentar de manera más precisa, un modelo de reacción no enzimático, post-sintético de modificación estructural de las proteínas que en ciertas condiciones han explicado algunas de las secuelas de la diabetes. Se ha encontrado que la afinidad por el oxígeno de la sangre de pacientes diabéticos es anormal debido a la glicosilación de la Hb, a la existencia de niveles anormalmente elevados de 2,3 DPG y a la disminución de los niveles de fósforos inorgánico (23). En el caso de otras proteínas (fibrinógeno, albúmina, cristalino, plaquetas, etc.) la glicosilación no enzimática es un fenómeno cada vez más conocido, capaz de modificar en algunos casos, la función de las mismas (28). Se ha desarrollado una importante variedad de métodos para su cuantificación (sea como HbA_{1c}, o como Hb glicosilada total - HbA₁).

CUADRO 4

VALORES DE HbA₁ (%) EN 14 DIABÉTICOS SIN CONTROL

MÉTODO	\bar{X}	D.S.
HELENA	13,12	1.30
CIHATA	12,56	1.83
Colorimétrico	11,80	1.58

CUADRO 5

VALORES DE HbA₁ (%) EN 5 DIABÉTICOS BAJO CONTROL

MÉTODO	\bar{X}	D.S.
HELENA	7.76	1.16
CIHATA	7.82	0.86
Colorimétrico	7.46	0.86

CUADRO 6

VALORES DE HbA₁ (%) EN 5 PACIENTES CON δ β -TAL (F-TALASEMIA)(HbF ENTRE 5 y 11%)

MÉTODO	\bar{X}	D.S.
HELENA	12.6	2.92
CIHATA	11.82	2.71
Colorimétrico	6.72	0.71

Varios de esos métodos son adecuados para su uso en el laboratorio clínico y cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas sobre los otros. Los más conocidos son los microcromatográficos, y existen en el mercado juegos de reactivos para tal fin. En esta comunicación se han comparado tres procedimientos; dos cromatográficos y uno colorimétrico. Uno de los cromatográficos es el recomendado por Helena Labo-

ratories y el otro el desarrollado en el CIHATA, basado en el uso de pipetas Pasteur, resma BioRex 70 y un separador cromatográfico para la HbA_{1c}. El coeficiente de correlación entre ambos procedimientos fue 0.73, en tanto que el de esos métodos con el colorimétrico fue 0.62 y 0.57, respectivamente.

Sin embargo, la prueba de t de Student demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los métodos ($p < 0.05$), por lo que los procedimientos pueden ser intercambiables para los efectos de valorar, en un determinado paciente, su control glucémico. Consideramos que los métodos que preconizamos aquí pueden perfectamente establecerse de rutina en nuestros laboratorios. La no existencia de diferencias entre la microcromatografía y el método colorimétrico, nos permite también recomendar este último para uso rutinario. Con cualesquiera de los métodos consignados es indispensable una cuidadosa estandarización de las condiciones en que se realizan las determinaciones y es esencial el empleo de procedimientos de control de calidad. Para los métodos cromatográficos es indispensable conocer el fenotipo hemoglobínico del paciente, dadas las interferencias positivas y negativas que se originan por la presencia de la HbF y de Hbs rápidas, y de Hbs lentas (S,C), respectivamente.

ABSTRACT

This paper brings up a discussion on different aspects of the chemical heterogeneity of the hemoglobin molecule, specially those related to the glycosylated hemoglobins. The importance of these derivatives in the study of the diabetic patient, led the authors to carry out a comparative study of three procedures which have been devised to quantify them, in order to determine, in such a way, which is the best as a routine procedure. The study was based upon two analytical methods of ion exchange chromatography: that recommended by Helena Laboratories, from Texas, USA and other in which the ion exchanger was prepared in our laboratories. These methods were compared with each other and with a colorimetric procedure based on the production of 5-hydroxymethylfurfural from the glycosylated derivative of hemoglobin and its reaction with thiobarbituric acid to give a derivative of certain spectrophotometric characteristics.

The authors present the results of these studies, along with their final recommendation about the choice of the method which according with their

knowledge, could be the best as a routine procedure to quantify the glycosylated hemoglobins.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a HELENA LABORATORIES, Texas la ayuda para la realización de esta investigación, por el obsequio de los juegos de reactivos Glyco Hb-Quik Column™ kit.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allen, D.W., Schroeder, W.A., Balog, J. Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: A study of the effects of crystallization and fetal human hemoglobin A study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *IBID.* 1958; 80 1628-1634.
2. Bunn, H.E., Gabbay, K.H., Gallop, P.M. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus *Science*, 1978; 200:21-27.
3. Chou, J., Robinson, C.A. Jr., Siegel, A.L. Simple method for estimating glycosylated hemoglobins, and its application to evaluation of diabetic patients. *Clin. Chem.* 1978; 24:1708-1710.
4. Fluckiger, R., Winterhalter, K.H. *In vitro* synthesis of hemoglobin A_{1c}. *FEBS Letters*, 1976; 72:356-360.
5. Friedman, Sh., Humbert, J.R. A simple microchromatographic column for determination of hemoglobins A_{1a+b} and A_{1c}. *Hemoglobin*, 1979; 3:411-428.
6. Gimferrer, E. and Barget, M. La hemoglobina glicosada (HbA_{1c}): ¿debería expresarse en g/dl? *Biol. Clin. Hemat.*, 1981; 3:193-195.
7. Hammons, G.T. Glycosylated hemoglobin and diabetes mellitus. *Lab. Med.* 1981;12:213-218.
8. Javid, J. Immunologic characterization and quantitation of hemoglobin A_{1c}. *Brit. J. Haematol.*, 1978; 38:329-337.
9. Jones, M B, Koler, R D Jones, R T. Micro-column method for the determination of hemoglobin minor fractions Ala + b and Alc, *Hemoglobin*, 1978; 253-57.
10. Kunkel, H.G., Wallenius, G. New hemoglobins in normal adult blood. *Science*, 1955; 122:288-290.
11. Kynoch, P.A.M., Lehmann, H. Rapid estimation (21/2 hours) of glycosylated hemoglobin for routine purpose *Lancet* 1977; ii, 16.
12. McDonald, J.M., Davis, J.E. Glycosylated hemoglobin and diabetes mellitus. *Human Pathology*, 1979. 10:279-283.
13. Menard, L. Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A, by agar gel electrophoresis. *Clin. Chem.*, 1980; 26:1598-1602.
14. Panzer, S, Kronik, G, Lechner, K, Bettelheim, P, New-mann, E., Dudczak, R. Glycosylated Hemoglobins (GHb): An Index of Red Cell Survival *Blood*. 1982;59.1348-1350.

15. Parker, K.M., England, J. D., Da Costa, J., Hess, R.L, Goldstein, D.E. Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. *Clin. Chem.* 1981; 27:669-672.
16. Pecorado, R. E, Grat, R. J Halter, J. B. Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. *Diabetes*, 1979; 28:1120-1125.
17. Puukka, R., Leppilampi, M. Electrophoretically determined haemoglobin A_{1c} concentrations during short-term changes in glucose concentration. *Ann. Clin. Biochem* 1982; 1 9:350-353.
18. Rahbar, S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetes. *Clin Chim. Acta* 1968, 22:296-298
19. Rahbar, S. Glycosylated hemoglobins. Section VII. Glycosylated hemoglobin. In: *Human Hemoglobins and Hemoglobinopathies* a review to 1981 (Schneider, R.G., et al. Edit.) Texas Reports on Biology and Medicine (Vol. 40). The University of Texas Medical Branch at Galveston. 1981; 373-393.
20. Rahbar. S., Blumenfeld, O. Ranney. H.M. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969; 36:838-843.
21. Rahbar, S., Paulsen, E. Ranney, H.M. Studies of hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* (suppl. 1), 1969; 18:352-355.
22. Rojas, L.F., Sáenz, G.F., Chaves, M. & Esquivel, J.M. Las hemoglobinas glicosiladas como parámetros del status metabólico del paciente diabético. *Acta Méd. Cost.*. 1984; 27 :45-50.
23. Ruis, G.J., Calles, J., Padros, M.R., Lanzetti, C., Lozano, O. & Córdova, M.S. Hemostasia y glicosilación protéica. *Sangre*. 1983; 28:164-172.
24. Saibene, V., Breibrilla, L. Bertoletti. A. Chromatographic and colorimetric detection of glycosylated hemoglobins: A comparative analysis of two different methods. *Clin Chim Acta*; 1979; 93:199-205.
25. Schifreen, R.S, Hickirigbotham, J M., Bowers, G.N. Jr. Accuracy, precision, and stability of hemoglobin A_c by "high performance" cation exchange chromatography *Clin Chem.* 1980; 26:466-472.
26. Schoos, R., Schoos-Barbette, S. & Lambotte, C. Dosage of hemoglobin A_{1c} by isoelectric focusing. *Clin. Chim. Acta*, 1978; 86:61-65.
27. Spicer, K.M., Allen, R.C., Buse, M.G. A simplified assay of hemoglobin A_{1c} in diabetic patients by use of isoelectric focusing and quantitative microdensitometry. *Diabetes*, 1978; 27:384-388.
28. Stevens, V.J., Monnier, V.M., Cerami, A. Hemoglobin glycosylation as a model for modification of other proteins. Section VII: Glycosylated Hemoglobin. In: *Human Hemoglobins and Hemoglobinopathies*: a review to 1981 (Schneider, R.G., et al Edit). Texas Reports on Biology and Medicine (Vol. 40). The University of Texas Medical Branch at Galveston. 1981; 387-396.
29. Trivelli, L.A., Ranney, H.M., Lai, H.T. Hemoglobin components a patients with diabetes mellitus. *IBID* 1971; 284:353-357

**ESQUEMA DE CONVERSION DE TEMPERATURA PARA
HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS**

Observed G-Hb%	Assay Temperature (C°)												
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
4.0	5.6	5.2	4.9	4.6	4.3	4.0	3.7	3.5	3.3	3.1	2.8	2.7	2.5
4.1	5.7	5.3	5.0	4.7	4.4	4.1	3.8	3.6	3.4	3.1	2.9	2.7	2.6
4.2	5.8	5.5	5.1	4.8	4.5	4.2	3.9	3.7	3.5	3.2	3.0	2.8	2.6
4.3	6.0	5.6	5.2	4.9	4.6	4.3	4.0	3.8	3.5	3.3	3.1	2.9	2.7
4.4	6.1	5.7	5.3	5.0	4.7	4.4	4.1	3.9	3.6	3.4	3.2	3.0	2.8
4.5	6.2	5.8	5.4	5.1	4.8	4.5	4.2	4.0	3.7	3.5	3.3	3.1	2.9
4.6	6.3	5.9	5.6	5.2	4.9	4.6	4.3	4.1	3.8	3.6	3.4	3.2	3.0
4.7	6.4	6.0	5.7	5.3	5.0	4.7	4.4	4.2	3.9	3.7	3.5	3.2	3.0
4.8	6.6	6.2	5.8	5.4	5.1	4.8	4.5	4.3	4.0	3.8	3.5	3.3	3.1
4.9	6.7	6.3	5.9	5.5	5.2	4.9	4.6	4.3	4.1	3.9	3.6	3.4	3.2
5.0	6.8	6.4	6.0	5.6	5.3	5.0	4.7	4.4	4.2	3.9	3.7	3.5	3.3
5.1	6.9	6.5	6.1	5.8	5.4	5.1	4.8	4.5	4.3	4.0	3.8	3.6	3.4
5.2	7.0	6.6	6.2	5.9	5.5	5.2	4.9	4.6	4.4	4.1	3.9	3.7	3.5
5.3	7.1	6.7	6.3	6.0	5.6	5.3	5.0	4.7	4.5	4.2	4.0	3.7	3.5
5.4	7.3	6.8	6.4	6.1	5.7	5.4	5.1	4.8	4.5	4.3	4.1	3.8	3.6
5.5	7.4	7.0	6.6	6.2	5.8	5.5	5.2	4.9	4.6	4.4	4.1	3.9	3.7
5.6	7.5	7.1	6.7	6.3	5.9	5.6	5.3	5.0	4.7	4.5	4.2	4.0	3.8
5.7	7.6	7.2	6.8	6.4	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8	4.6	4.3	4.1	3.9
5.8	7.7	7.3	6.9	6.5	6.1	5.8	5.5	5.2	4.9	4.7	4.4	4.2	3.9
5.9	7.9	7.4	7.0	6.6	6.2	5.9	5.6	5.3	5.0	4.7	4.5	4.2	4.0
6.0	8.0	7.5	7.1	6.7	6.3	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8	4.6	4.3	4.1
6.1	8.1	7.6	7.2	6.8	6.5	6.1	5.8	5.5	5.2	4.9	4.7	4.4	4.2
6.2	8.2	7.8	7.3	6.9	6.6	6.2	5.9	5.6	5.3	5.0	4.7	4.5	4.3
6.3	8.3	7.9	7.4	7.0	6.7	6.3	6.0	5.7	5.4	5.1	4.8	4.6	4.4
6.4	8.5	8.0	7.5	7.1	6.8	6.4	6.1	5.8	5.5	5.2	4.9	4.7	4.4
6.5	8.6	8.1	7.7	7.2	6.9	6.5	6.2	5.9	5.6	5.3	5.0	4.8	4.5
6.6	8.7	8.2	7.8	7.4	7.0	6.6	6.3	5.9	5.6	5.4	5.1	4.8	4.6
6.7	8.8	8.3	7.9	7.5	7.1	6.7	6.4	6.0	5.7	5.4	5.2	4.9	4.7
6.8	8.9	8.4	8.0	7.6	7.2	6.8	6.5	6.1	5.8	5.5	5.3	5.0	4.8
6.9	9.1	8.6	8.1	7.7	7.3	6.9	6.6	6.2	5.9	5.6	5.3	5.1	4.8
7.0	9.2	8.7	8.2	7.8	7.4	7.0	6.7	6.3	6.0	5.7	5.4	5.2	4.9
7.1	9.3	8.8	8.3	7.9	7.5	7.1	6.7	6.4	6.1	5.8	5.5	5.3	5.0
7.2	9.4	8.9	8.4	8.0	7.6	7.2	6.8	6.5	6.2	5.9	5.6	5.3	5.1
7.3	9.5	9.0	8.5	8.1	7.7	7.3	6.9	6.6	6.3	6.0	5.7	5.4	5.2
7.4	9.6	9.1	8.7	8.2	7.8	7.4	7.0	6.7	6.4	6.1	5.8	5.5	5.3
7.5	9.8	9.2	8.8	8.3	7.9	7.5	7.1	6.8	6.5	6.2	5.9	5.6	5.3
7.6	9.9	9.4	8.9	8.4	8.0	7.6	7.2	6.9	6.6	6.2	6.0	5.7	5.4
7.7	10.0	9.5	9.0	8.5	8.1	7.7	7.3	7.0	6.6	6.3	6.0	5.8	5.5
7.8	10.1	9.6	9.1	8.6	8.2	7.8	7.4	7.1	6.7	6.4	6.1	5.8	5.6
7.9	10.2	9.7	9.2	8.7	8.3	7.9	7.5	7.2	6.8	6.5	6.2	5.9	5.7
8.0	10.4	9.8	9.3	8.9	8.4	8.0	7.6	7.3	6.9	6.6	6.3	6.0	5.7
8.1	10.5	9.9	9.4	9.0	8.5	8.1	7.7	7.4	7.0	6.7	6.4	6.1	5.8
8.2	10.6	10.0	9.5	9.1	8.6	8.2	7.8	7.4	7.1	6.8	6.5	6.2	5.9
8.3	10.7	10.2	9.7	9.2	8.7	8.3	7.9	7.5	7.2	6.9	6.6	6.3	6.0
8.4	10.8	10.3	9.8	9.3	8.8	8.4	8.0	7.6	7.3	7.0	6.6	6.3	6.1
8.5	11.0	10.4	9.9	9.4	8.9	8.5	8.1	7.7	7.4	7.0	6.7	6.4	6.1
8.6	11.1	10.5	10.0	9.5	9.0	8.6	8.2	7.8	7.5	7.1	6.8	6.5	6.2
8.7	11.2	10.6	10.1	9.6	9.1	8.7	8.3	7.9	7.6	7.2	6.9	6.6	6.3
8.8	11.3	10.7	10.2	9.7	9.2	8.8	8.4	8.0	7.7	7.3	7.0	6.7	6.4
8.9	11.4	10.9	10.3	9.8	9.3	8.9	8.5	8.1	7.7	7.4	7.1	6.8	6.5
9.0	11.6	11.0	10.4	9.9	9.4	9.0	8.6	8.2	7.8	7.5	7.2	6.9	6.6
9.1	11.7	11.1	10.5	10.0	9.6	9.1	8.7	8.3	7.9	7.6	7.2	6.9	6.6
9.2	11.8	11.2	10.6	10.1	9.7	9.2	8.8	8.4	8.0	7.7	7.3	7.0	6.7
9.3	11.9	11.3	10.8	10.2	9.8	9.3	8.9	8.5	8.1	7.8	7.4	7.1	6.8
9.4	12.0	11.4	10.9	10.3	9.9	9.4	9.0	8.6	8.2	7.8	7.5	7.2	6.9
9.5	12.1	11.5	11.0	10.5	10.0	9.5	9.1	8.7	8.3	7.9	7.6	7.3	7.0
9.6	12.3	11.7	11.1	10.6	10.1	9.6	9.2	8.8	8.4	8.0	7.7	7.4	7.0
9.7	12.4	11.8	11.2	10.7	10.2	9.7	9.3	8.9	8.5	8.1	7.8	7.4	7.1
9.8	12.5	11.9	11.3	10.8	10.3	9.8	9.4	9.0	8.6	8.2	7.8	7.5	7.2
9.9	12.6	12.0	11.4	10.9	10.4	9.9	9.5	9.0	8.7	8.3	7.9	7.6	7.3
10.0	12.7	12.1	11.5	11.0	10.5	10.0	9.6	9.1	8.7	8.4	8.0	7.7	7.4
10.1	12.9	12.2	11.6	11.1	10.6	10.1	9.7	9.2	8.8	8.5	8.1	7.8	7.5
10.2	13.0	12.3	11.8	11.2	10.7	10.2	9.8	9.3	8.9	8.6	8.2	7.9	7.5
10.3	13.1	12.5	11.9	11.3	10.8	10.3	9.8	9.4	9.0	8.6	8.3	7.9	7.6
10.4	13.2	12.6	12.0	11.4	10.9	10.4	9.9	9.5	9.1	8.7	8.4	8.0	7.7
10.5	13.3	12.7	12.1	11.5	11.0	10.5	10.0	9.6	9.2	8.8	8.5	8.1	7.8
10.6	13.5	12.8	12.2	11.6	11.1	10.6	10.1	9.7	9.3	8.9	8.5	8.2	7.9
10.7	13.6	12.9	12.3	11.7	11.2	10.7	10.2	9.8	9.4	9.0	8.6	8.3	7.9
10.8	13.7	13.0	12.4	11.8	11.3	10.8	10.3	9.9	9.5	9.1	8.7	8.4	8.0
10.9	13.8	13.1	12.5	11.9	11.4	10.9	10.4	10.0	9.6	9.2	8.8	8.4	8.1
11.0	13.9	13.3	12.6	12.1	11.5	11.0	10.5	10.1	9.7	9.3	8.9	8.5	8.2
11.1	14.1	13.4	12.7	12.2	11.6	11.1	10.6	10.2	9.7	9.3	9.0	8.6	8.3
11.2	14.2	13.5	12.9	12.3	11.7	11.2	10.7	10.3	9.8	9.4	9.1	8.7	8.4
11.3	14.3	13.6	13.0	12.4	11.8	11.3	10.8	10.4	9.9	9.5	9.1	8.8	8.4
11.4	14.4	13.7	13.1	12.5	11.9	11.4	10.9	10.5	10.0	9.6	9.2	8.9	8.5
11.5	14.5	13.8	13.2	12.6	12.0	11.5	11.0	10.6	10.1	9.7	9.3	8.9	8.6
11.6	14.6	13.9	13.3	12.7	12.1	11.6	11.1	10.6	10.2	9.8	9.4	9.0	8.7
11.7	14.8	14.1	13.4	12.8	12.2	11.7	11.2	10.7	10.3	9.9	9.5	9.1	8.8
11.8	14.9	14.2	13.5	12.9	12.3	11.8	11.3	10.8	10.4	10.0	9.6	9.2	8.8
11.9	15.0	14.3	13.6	13.0	12.4	11.9	11.4	10.9	10.5	10.1	9.7	9.3	8.9
12.0	15.1	14.4	13.7	13.1	12.5	12.0	11.5	11.0	10.6	10.1	9.7	9.4	9.0
12.1	15.2	14.5	13.9	13.2	12.6	12.1	11.6	11.1	10.7	10.2	9.8	9.5	9.1
12.2	15.4	14.6	14.0	13.3	12.8	12.2	11.7	11.2	10.8	10.3	9.9	9.5	9.2

Observed G-Hb%	Assay Temperature (C°)												
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
12.3	15.5	14.8	14.1	13.4	12.9	12.3	11.8	11.3	10.8	10.4	10.0	9.6	9.3
12.4	15.6	14.9	14.2	13.6	13.0	12.4	11.9	11.4	10.9	10.5	10.1	9.7	9.3
12.5	15.7	15.0	14.3	13.7	13.1	12.5	11.9	11.5	11.0	10.6	10.2	9.8	9.4
12.6	15.8	15.1	14.4	13.8	13.2	12.6	12.1	11.6	11.1	10.7	10.3	9.9	9.5
12.7	16.0	15.2	14.5	13.9	13.3	12.7	12.2	11.7	11.2	10.8	10.3	10.0	9.6
12.8	16.1	15.3	14.6	14.0	13.4	12.8	12.3	11.8	11.3	10.9	10.4	10.0	9.7
12.9	16.2	15.4	14.7	14.1	13.5	12.9	12.4	11.9	11.4	10.9	10.5	10.1	9.7
13.0	16.3	15.6	14.9	14.2	13.6	13.0	12.5	12.0	11.5	11.0	10.6	10.2	9.8
13.1	16.4	15.7	15.0	14.3	13.7	13.1	12.6	12.1	11.6	11.1	10.7	10.3	9.9
13.2	16.6	15.8	15.1	14.4	13.8	13.2	12.7	12.1	11.7	11.2	10.8	10.4	10.0
13.3	16.7	16.0	15.2	14.5	13.9	13.3	12.8	12.2	11.8	11.3	10.9	10.5	10.1
13.4	16.8	16.0	15.3	14.6	14.0	13.4	12.9	12.3	11.8	11.4	11.0	10.5	10.2
13.5	16.9	16.1	15.4	14.7	14.1	13.5	13.0	12.4	11.9	11.5	11.0	10.6	10.2
13.6	17.0	16.2	15.5	14.8	14.2	13.6	13.0	12.5	12.0	11.6	11.1	10.7	10.3
13.7	17.1	16.4	15.6	14.9	14.3	13.7	13.1	12.6	12.1	11.7	11.2	10.8	10.4
13.8	17.3	16.5	15.7	15.0	14.4	13.8	13.2	12.7	12.2	11.7	11.3	10.9	10.5
13.9	17.4	16.6	15.8	15.2	14.5	13.9	13.3	12.8	12.3	11.8	11.4	11.0	10.6
14.0	17.5	16.7	16.0	15.3	14.6	14.0	13.4	12.9	12.4	11.9	11.5	11.0	10.6
14.1	17.6	16.8	16.1	15.4	14.7	14.1	13.5	13.0	12.5	12.0	11.6	11.1	10.7
14.2	17.7	16.9	16.2	15.5	14.8	14.2	13.6	13.1	12.6	12.1	11.6	11.2	10.8
14.3	17.9	17.0	16.3	15.6	15.0	14.3	13.7	13.2	12.7	12.2	11.7	11.3	10.9
14.4	18.0	17.2	16.4	15.7	15.0	14.4	13.8	13.3	12.8	12.3	11.8	11.4	11.0
14.5	18.1	17.3	16.5	15.8	15.1	14.5	13.9	13.4	12.9	12.4	11.9	11.5	11.1
14.6	18.2	17.4	16.6	15.9	15.2	14.6	14.0	13.5	12.9	12.5	12.0	11.5	11.1
14.7	18.3	17.5	16.7	16.0	15.3	14.7	14.1	13.6	13.0	12.5	12.1	11.6	11.2
14.8	18.5	17.6	16.8	16.1	15.4	14.8	14.2	13.7	13.1	12.6	12.2	11.7	11.3
14.9	18.6	17.7	17.0	16.2	15.5	14.9	14.3	13.7	13.2	12.7	12.2	11.8	11.4
15.0	18.7	17.8	17.1	16.3	15.6	15.0	14.4	13.8	13.3	12.8	12.3	11.9	11.5
15.1	18.8	18.0	17.2	16.4	15.7	15.1	14.5	13.9	13.4	12.9	12.4	12.0	11.5
15.2	18.9	18.1	17.3	16.5	15.9	15.2	14.6	14.0	13.5	13.0	12.5	12.1	11.6
15.3	19.1	18.2	17.4	16.7	16.0	15.3	14.7	14.1	13.6	13.1	12.6	12.1	11.7
15.4	19.2	18.3	17.5	16.8	16.1	15.4	14.8	14.2	13.7	13.2	12.7	12.2	11.8
15.5	19.3	18.4	17.6	16.9	16.2	15.5	14.9	14.3	13.8	13.2	12.8	12.3	11.9
15.6	19.4	18.5	17.7	17.0	16.3	15.6	15.0	14.4	13.9	13.3	12.8	12.4	11.9
15.7	19.5	18.7	17.8	17.1	16.4	15.7	15.1	14.5	13.9	13.4	12.9	12.5	12.0
15.8	19.6	18.8	17.9	17.2	16.5	15.8	15.2	14.6	14.0	13.5	13.0	12.6	12.1
15.9	19.8	18.9	18.1	17.3	16.6	15.9	15.3	14.7	14.1	13.6	13.1	12.6	12.2
16.0	19.9	19.0	18.2	17.4	16.7	16.0	15.4	14.8	14.2	13.7	13.2	12.7	12.3
16.1	20.0	19.1	18.3	17.5	16.8	16.1	15.5	14.9	14.3	13.8	13.3	12.8	12.4
16.2	20.1	19.2	18.4	17.6	16.9	16.2	15.6	15.0	14.4	13.9	13.4	12.9	12.4
16.3	20.2	19.3	18.5	17.7	17.0	16.3	15.7	15.1	14.5	14.0	13.5	13.0	12.5
16.4	20.4	19.5	18.6	17.8	17.1	16.4	15.8	15.2	14.6	14.0	13.5	13.1	12.6
16.5	20.5	19.6	18.7	17.9	17.2	16.5	15.9	15.2	14.7	14.1	13.6	13.1	12.7
16.6	20.6	19.7	18.8	18.0	17.3	16.6	16.0	15.3	14.8	14.2	13.7	13.2	12.8
16.7	20.7	19.8	18.9	18.1	17.4	16.7	16.1	15.4	14.9	14.3	13.8	13.3	12.8
16.8	20.8	19.9	19.1	18.3	17.5	16.8	16.1	15.5	15.0	14.4	13.9	13.4	12.9
16.9	20.9	20.0	19.2	18.4	17.6	16.9	16.2	15.6	15.0	14.5	14.0	13.5	13.0
17.0	21.1	20.1	19.3	18.5	17.7	17.0	16.3	15.7	15.1	14.6	14.1	13.6	13.1
17.1	21.2	20.3	19.4	18.6	17.8	17.1	16.4	15.8	15.2	14.7	14.1	13.6	13.2
17.2	21.3	20.4	19.5	18.7	17.9	17.2	16.5	15.9	15.3	14.8	14.2	13.7	13.3
17.3	21.4	20.5	19.6	18.8	18.0	17.3	16.6	16.0	15.4	14.8	14.3	13.8	13.3
17.4	21.6	20.6	19.7	18.9	18.1	17.4	16.7	16.1	15.5	14.9	14.4	13.9	13.4
17.5	21.7	20.7	19.8	19.0	18.2	17.5	16.8	16.2	15.6	15.0	14.5	14.0	13.5
17.6	21.8	20.8	19.9	19.1	18.3	17.6	16.9	16.3	15.7	15.1	14.6	14.1	13.6
17.7	21.9	20.9	20.0	19.2	18.4	17.7	17.0	16.4	15.8	15.2	14.7	14.1	13.7
17.8	22.0	21.1	20.2	19.3	18.5	17.8	17.1	16.5	15.9	15.3	14.7	14.2	13.7
17.9	22.1	21.2	20.3	19.4	18.6	17.9	17.2	16.6	16.0	15.4	14.8	14.3	13.8
18.0	22.3	21.3	20.4	19.5	18.7	18.0	17.3	16.7	16.0	15.5	14.9	14.4	13.9
18.1	22.4	21.4	20.5	19.6	18.8	18.1	17.4	16.8	16.1	15.6	15.0	14.5	14.0
18.2	22.5	21.5	20.6	19.7	19.0	18.2	17.5	16.8	16.2	15.6	15.1	14.6	14.1
18.3	22.6	21.6	20.7	19.9	19.1	18.3	17.6	16.9	16.3	15.7	15.2	14.7	14.2
18.4	22.7	21.7	20.8	20.0	19.2	18.4	17.7	17.0	16.4	15.8	15.3	14.7	14.2
18.5	22.9	21.9	20.9	20.1	19.3	18.5	17.8	17.1	16.5	15.9	15.3	14.8	14.3
18.6	23.0	22.0	21.0	20.2	19.4	18.6	17.9	17.2	16.6	16.0	15.4	14.9	14.4
18.7	23.1	22.1	21.2	20.3	19.5	18.7	18.0	17.3	16.7	16.1	15.5	15.0	14.5
18.8	23.2	22.2	21.3	20.4	19.6	18.8	18.1	17.4	16.8	16.2	15.6	15.1	14.6
18.9	23.3	22.3	21.4	20.5	19.7	18.9	18.2	17.5	16.9	16.3	15.7	15.2	14.6
19.0	23.5	22.4	21.5	20.6	19.8	19.0	18.3	17.6	17.0	16.4	15.8	15.2	14.7
19.1	23.6	22.6	21.6	20.7	19.9	19.1	18.4	17.7	17.0	16.4	15.9	15.3	14.8
19.2	23.7	22.7	21.7	20.8	20.0	19.2	18.5	17.8	17.1	16.5	16.0	15.4	14.9
19.3	23.8	22.8	21.8	20.9	20.1	19.3	18.6	17.9	17.2	16.6	16.0	15.5	15.0
19.4	23.9	22.9	21.9	21.0	20.2	19.4	18.7	18.0	17.3	16.7	16.1	15.6	15.1
19.5	24.1	23.0	22.0	21.1	20.3	19.5	18.8	18.1	17.4	16.8	16.2	15.7	15.1
19.6	24.2	23.1	22.2	21.2	20.4	19.6	18.9	18.2	17.5	16.9	16.3	15.7	15.2
19.7	24.3	23.2	22.3	21.3	20.5	19.7	19.0	18.3	17.6	17.0	16.4	15.8	15.3
19.8	24.4	23.4	22.4	21.5	20.6	19.8	19.1	18.4	17.7	17.1	16.5	15.9	15.4
19.9	24.5	23.5	22.5	21.6	20.7	19.9	19.2	18.4	17.8	17.2	16.6	16.0	15.5
20.0	24.6	23.6	22.6	21.7	20.8	20.0	19.2	18.5	17.9	17.2	16.6	16.1	15.5