

Medición de la hemoglobina glucosilada capilar como tamizaje en diabetes mellitus tipo 2

Edith Alicia Vargas-Contreras¹
José Heriberto Gómez-Moreno¹
José Manuel Conde-Mercado²

¹ Médico Internista.

² Director médico, profesor titular del Curso Universitario de Especialización en Medicina Interna. Hospital Juárez de México.

RESUMEN

Antecedentes: en 2010 la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y el Comité de Expertos en Diabetes incluyeron como prueba diagnóstica adicional la medición de la hemoglobina glucosilada. Su uso se extendió de vigilancia a diagnóstico y tamizaje, se indica como alternativa diagnóstica, sin anteponerse a la glucosa plasmática.

Objetivo: determinar la sensibilidad de la medición de la hemoglobina glucosilada con un dispositivo capilar en el tamizaje de diabetes mellitus tipo 2.

Material y método: estudio prospectivo, transversal, descriptivo y observacional en el que se evaluaron pacientes de 20 a 30 años de edad, con puntuación entre 12 y 14 puntos del cuestionario FINDRISK, a quienes se determinó la hemoglobina glucosilada capilar y venosa.

Resultados: se incluyeron 20 sujetos, 7 hombres (35%) y 13 mujeres (65%), la medición de la hemoglobina glucosilada capilar obtuvo una media de $5.2 \pm 0.1654\%$, concordancia específica con la determinación venosa de 25%, intervalo de confianza de 95% (IC 95%): -0.210-0.130, χ^2 de Pearson de 0.628, valor de $p < 0.492$.

Conclusiones: la medición capilar de la hemoglobina glucosilada tiene igual sensibilidad y especificidad mayor que la determinación venosa, por lo que es una opción para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes a bajo costo, accesible, rápida y cómoda. El uso conjunto de la HbA1c y la prueba Findrisk permite optimizar el diagnóstico de estados tempranos de la enfermedad.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 2, hemoglobina glucosilada capilar, hemoglobina glucosilada venosa, prueba Findrisk.

Capillary glycosylated hemoglobin measurement as screening in diabetes mellitus type 2

Recibido: 23 de mayo 2014

Aceptado: 29 de julio 2014

Correspondencia: Dr. José Manuel Conde Mercado
Hospital Juárez de México
Av. Instituto Politécnico Nacional 5160
07760 México, DF
direccionmedica_hjm@yahoo.com.mx

ABSTRACT

Background: In 2010 American Diabetes Association (ADA) and the Expert Committee on Diabetes included glycated hemoglobin diagnostic test as an additional measurement. Its use widespread from monitoring to diagnostic and screening, stating as a diagnostic alternative, without replacing plasma glucose.

Este artículo debe citarse como

Vargas-Contreras EA, Gómez-Moreno JH, Conde-Mercado JM. Medición de la hemoglobina glucosilada capilar como tamizaje en diabetes mellitus tipo 2. Med Int Méx 2014;30:538-545.

Objective: To determine the sensitivity of glycated hemoglobin measurement through a capillary device in screening of diabetes mellitus type 2.

Material and method: A prospective, descriptive and observational study included 20-30-year-old patients, with a Findrisk questionnaire score of 12-14 points, who were submitted to capillary and venous glycosylated hemoglobin determination.

Results: Twenty subjects were included, 7 men (35%) and 13 women (65%), measurement of capillary glycosylated hemoglobin had an average of $5.2 \pm 0.1654\%$, consistent with venous specific determination of 25%. Confidence interval at 95% (95% CI) between -0.210 to 0.130, χ^2 0.628, $p < 0.492$.

Conclusions: Capillary measuring of glycated hemoglobin had a higher specificity and equal sensitivity than those of venous determination; thus, it is an option for the diagnosis and monitoring of patients at low cost, affordable, quick and comfortable. The combination of HbA1c and Findrisk test optimizes the early diagnosis of disease states.

Key words: diabetes mellitus type 2, capillary glycosylated hemoglobin, venous glycosylated hemoglobin, Findrisk test.

ANTECEDENTES

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica que se distingue por hiperglucemia con alteración en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, debida a múltiples causas.¹⁻³

La diabetes mellitus tipo 2 es un grupo heterogéneo de trastornos que se distinguen por resistencia a la insulina en grados variables, defecto en la secreción de esa hormona y mayor producción de glucosa. Representa 90% de los casos.^{4,5}

En 2012 el Instituto Nacional de Salud Pública presentó los resultados obtenidos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT). En ese informe se identificó que 9.2% de los adultos en México habían recibido un diagnóstico de diabetes.⁶ En México existen alrededor de

3,500,000 sujetos no diagnosticados y el incremento anual esperado es de 323,000 pacientes.²

Para el año 2030 se pronostica un aumento en la incidencia global, aproximadamente 39.9 millones de casos,² con ascenso en la posición de mortalidad, que posiblemente la ubicará como séptima causa mundial de muerte.³

Han transcurrido 56 años desde que Huisman y Meyering (en 1958) identificaron a la hemoglobina glucosilada a través de un método cromatográfico; sin embargo, su relación con la diabetes mellitus la describieron en 1969 Samuel Rahbar y colaboradores, quienes asociaron la elevación de la glucoproteína con la enfermedad.

En la actualidad sabemos que existen tres tipos de hemoglobina glucosilada (A1a, A1b y A1c) y dos subtipos (A1a1, A1a2), mismos que se dife-

rencian por electroforesis. Estas hemoglobinas son fracciones menores de la hemoglobina A, que constituye 97% en los humanos.^{7,8}

La hemoglobina A1c representa 3 a 6% de la hemoglobina total en los individuos sanos,⁸ es la más abundante, estable y directamente proporcional a la concentración de glucosa plasmática en los eritrocitos a lo largo de 120 días. Su formación se debe a una reacción no enzimática e irreversible entre la glucosa y una valina del grupo amino terminal en la cadena beta de la hemoglobina, por lo que también es conocida como β N-1-deoxyfructosil-hemoglobina.⁹ De manera fisiológica aumenta 0.1% por década a partir de los 30 años de edad.⁷

Durante dos décadas la medición de la glucosa plasmática (curva de tolerancia, ayuno, azar) se utilizó como criterio diagnóstico de diabetes. En 2010 la Asociación Americana de Diabetes (ADA) y el Comité de Expertos en Diabetes incluyeron como prueba diagnóstica adicional la medición de la hemoglobina glucosilada (HbA1c),¹⁰ debido a los hallazgos obtenidos en los estudios Control y Complicaciones de la Diabetes (DCCT) y Prospectivo de Diabetes del Reino Unido (UKPDS), que demostraron la alta sensibilidad de la hemoglobina glucosilada como marcador de control glucémico,^{7,10} con reducción estadísticamente significativa de las complicaciones microvasculares cuando se alcanzan concentraciones $\leq 7\%$.^{11,12} La Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE) validó esta decisión en 2011,¹³ por lo que en la actualidad se cuenta con cuatro criterios para establecer el diagnóstico de diabetes mellitus:

- Glucosa plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L), o
- Glucosa plasmática ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) dos horas posteriores a la administración de 75 g de glucosa anhidra o

- Síntomas clásicos (poliuria, polidipsia, polifagia o pérdida inexplicable de peso) de hiperglucemia o crisis hiperglucémica, más glucosa plasmática casual (al azar) ≥ 200 mg/dL o
- HbA1C $\geq 6.5\%$ determinada con una metodología estandarizada y trazable.^{10,13,14}

Durante años, una de las principales preocupaciones en torno a la utilización de la HbA1c fue su escasa estandarización, lo que ocasionó gran confusión acerca de su uso para fines diagnósticos. Por ello, una consideración importante es que la determinación de la hemoglobina glucosilada debe realizarse con un método certificado por el Programa Nacional de Estandarización de Hemoglobina Glucosilada de Estados Unidos y estandarizado de acuerdo con el Estudio Control y Complicaciones de la Diabetes, lo que permite reducir las variaciones entre laboratorios.¹⁴

La cuantificación de la hemoglobina glucosilada se ha extendido de monitoreo a diagnóstico y tamizaje; se indica como alternativa diagnóstica sin anteponerse a la glucosa plasmática. Al respecto, se han establecido ventajas indudables para su realización, que podrían influir en la evaluación de sujetos cuando se pretende un contexto global.

Su medición se ha equiparado con la de glucosa en ayunas y picos posprandiales, con la ventaja de poder realizarse en un único momento, lo que la diferencia como herramienta en estados de cronicidad.

Las concentraciones de HbA1c tienen más capacidad de análisis que la glucosa plasmática, por lo que no se ven alteradas con la ausencia de ayuno, fase posabsortiva, periodos de estrés, ejercicio, ingesta calórica y trastornos agudos.^{15,16} Un inconveniente del uso de hemoglobina glucosilada es el costo de la prueba.¹⁷

La variabilidad biológica influye con la susceptibilidad individual a la glicación, considerada por algunos autores un beneficio adicional que proporciona la evaluación de la HbA1c, con fluctuación analítica de 2% contra 5 a 10% de la glucosa en ayunas. Este hallazgo confirma por qué un índice de glucosilación elevado se encuentra con mayor frecuencia en pacientes con riesgo de retinopatía y nefropatía a pesar de contar con adecuado control glucémico en ayuno.¹⁸

Posee mínima variabilidad intraindividual (< 2%) con respecto a la glucosa plasmática (5%) o curva de tolerancia a la glucosa que puede alcanzar 17%.¹⁷

Algunas escalas, como la finlandesa Findrisk, han sido de gran utilidad al momento de realizar la detección de diabetes en población previamente sana, al incluir factores de riesgo en los ocho puntos que la conforman, lo que permite identificar tempranamente a las personas con riesgo elevado.¹⁹ La combinación de la escala y la medición de la hemoglobina glucosilada aumenta la sensibilidad en el diagnóstico de diabetes mellitus.

La introducción de dispositivos portátiles para la medición de la hemoglobina glucosilada en 1990 fue una innovación que ha facilitado el control glucémico en los pacientes y permitido la toma de decisiones por parte del clínico de manera inmediata. La primera generación de estos dispositivos ofrecía resultados después de 10 minutos de la punción venosa o capilar, pero resultaba sumamente costosa y con poca disponibilidad.²⁰ En 2005, A1cNow® fue aprobado por la Dirección de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) después de demostrar amplia precisión poscomercialización, con rendimiento general comparable con el de los laboratorios de referencia. Más tarde obtuvo la certificación del Programa Nacional de Estandarización de Hemoglobina Glucosilada de Estados Unidos.^{21,22}

El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad de la medición de la hemoglobina glucosilada a través de un dispositivo capilar en el tamizaje de diabetes mellitus tipo 2.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo, transversal, descriptivo y observacional, realizado en la consulta externa del servicio de Medicina Interna del Hospital Juárez de México, del 1 de noviembre de 2012 al 28 de febrero de 2013. Se aplicó el cuestionario Findrisk a pacientes de 20 a 30 años de edad. Se seleccionaron los pacientes con puntuación entre 12 y 14 puntos; la evaluación se complementó con estudios paraclínicos para descartar enfermedad metabólica (perfil de lípidos, biometría hemática, química sanguínea y electrolitos séricos). La toma de la hemoglobina glucosilada se hizo en un mismo acto con las siguientes características para las mediciones venosa y capilar:

Venosa: con antisepsia se realiza una punción en la región anterior del antebrazo derecho, se obtienen 5 mL de sangre venosa (recolección en un tubo al vacío tapón morado, con EDTA-K₂), se procesa por método de cromatografía de líquidos de alta resolución, en un laboratorio externo estandarizado por el Programa Nacional de Estandarización de Hemoglobina Glucosilada de Estados Unidos.

Capilar: se punciona el pulpejo anular izquierdo, previa antisepsia; se obtiene una muestra de 5 µL de sangre, que se analiza en un dispositivo A1C Now+ Bayer® por el método HPLC Tosoh 2.2 (TosohBioscience) durante cinco minutos, el resultado se registra en la cédula de investigación. Ambos resultados se expresan en porcentajes.

Pasos de la medición capilar:

Paso 1: obtención de la muestra capilar: punción del pulpejo anular izquierdo por medio de una lanceta (previa antisepsia con alcohol metílico 96°). Recolección de la muestra con un recolector de sangre (5 mL).

Paso 2: procesamiento de la muestra: se introduce el colector en el cuerpo del muestreador (contiene 0.37 mL de solución detergente amortiguada con ferricianuro), se agita ocho veces y se coloca sobre una superficie plana de manera vertical durante dos minutos. Se coloca el cartucho de prueba (anticuerpos contra HbA1c, antígeno conjugado ligado a anticuerpo y membranas) en el monitor hasta escuchar “click”, se corrobora que los códigos del monitor y del cartucho coincidan, aparecerá el encabezado WAIT. Se remueve la base del muestreador y se introduce en el cartucho (cuando aparezca la leyenda SSMPL), se presiona con firmeza y se retira rápidamente en sentido de las manecillas del reloj.

Paso 3: obtención de resultados: al retirar el muestreador aparecerá la palabra “RUN”, esto indica el comienzo del análisis. Inmediatamente se iniciará la cuenta regresiva de 5:00 minutos. Aparecerá “QCOK”, lo que indica que la prueba ha finalizado. Se mostrará el resultado expresado en porcentaje durante 60 minutos o hasta que se inserte el siguiente cartucho de prueba.

Análisis estadístico

La información recopilada se plasmó en una hoja diseñada específicamente para este estudio y los datos obtenidos se evaluaron por medio del paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 23.0 para Mac.

RESULTADOS

Se aplicó la escala Findrisk a pacientes no diabéticos que acudieron a la consulta externa

del servicio de Medicina Interna. Se realizaron 120 encuestas, 52% de los entrevistados eran hombres. Los resultados obtenidos de la escala fueron: 64.1% tenía 50% de probabilidad de padecer diabetes mellitus tipo 2 a 10 años, 16.6% podría padecerla en 17% y únicamente 3.3% tenía 1% de riesgo de padecerla (Figura 1).

Esta muestra corresponde a los pacientes que obtuvieron una puntuación de 12 a 14 en la encuesta Findrisk. Se incluyeron 20 sujetos, 7 hombres (35%) y 13 mujeres (65%), de 20 a 30 años de edad, con media de 27 ± 1.6 años y moda de 25. Todos los pacientes evaluados ($n=20$) refirieron tener un familiar de primera línea con diagnóstico previo de diabetes mellitus, 16 personas (80%) mencionaron no realizar ningún tipo de actividad física; 19 sujetos (95%) llevaban una dieta poco equilibrada. Los parámetros con mayor variabilidad fueron la circunferencia de la cintura y el índice de masa corporal.

La media de la circunferencia de la cintura en los hombres fue de 99 centímetros (límites: 96 y 104) y la media del índice de masa corporal fue de 25.9 (límites: 25.2 y 27.6). En las mujeres

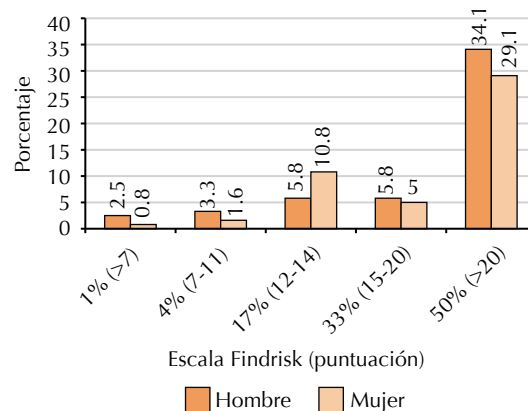


Figura 1. Riesgo de diabetes mellitus tipo 2 a 10 años.

la media de la circunferencia de la cintura fue de 82 centímetros (límites: 81 y 94). La media del índice de masa corporal fue de 26.1 (límites: 25.4 y 26.9).

La media de la medición de la hemoglobina glucosilada capilar fue de $5.2 \pm 0.1654\%$, moda 5.1%, límites: 5 y 5.7%, intervalo 0.7. La determinación venosa de la hemoglobina glucosilada obtuvo los siguientes resultados: media $5.1 \pm 0.3747\%$, moda 5.4%, límites: 4 y 5.8%, intervalo 1.7.

La concordancia específica entre ambas determinaciones (capilar y venosa) fue de 25%, intervalo de confianza de 95% (IC 95%) entre -0.210 y 0.130, χ^2 de Pearson de 0.628, valor $p < 0.492$ (Figura 2).

Se estableció el diagnóstico de prediabetes en 10% ($n=2$) de la población estudiada, con correlación absoluta de 50% entre las distintas mediciones.

La sensibilidad de la hemoglobina glucosilada capilar fue de 50% con especificidad de 95%, mientras que la medición venosa obtuvo

sensibilidad y especificidad de 50 y 90%, respectivamente.

El costo de cada prueba venosa fue de 249.00 pesos, mientras que la detección capilar generó un importe individual de 160.00 pesos, lo que representa 35.7% menos (89 pesos).

DISCUSIÓN

Los factores de riesgo evaluados por la escala concuerdan con la existencia consistente y no modificable de los factores genéticos; expresan como detonante de diabetes, el sobrepeso y el aumento en la circunferencia de la cintura.^{1,2,18}

Encontramos mayor variabilidad en el índice de masa corporal en los hombres (mínimo de 25.2 y máximo de 27.6); sin embargo, las mujeres tuvieron una media superior (26.9 centímetros). Los límites obtenidos de la circunferencia abdominal en hombres fueron más limitados y con una media (99 centímetros) superior a la de las mujeres (82 cm), lo que coincide con la distribución de grasa visceral en la población de uno y otro sexo y la creciente tendencia al sobrepeso u obesidad como principal factor modificable de diabetes mellitus.^{6,23}

La combinación del cuestionario finlandés con la medición de la hemoglobina glucosilada es una estrategia de cribado que potencializa el diagnóstico de diabetes en población sana, lo que optimiza la sensibilidad en su detección. Martín y colaboradores lo demostraron al realizar determinaciones de HbA1c y curva de tolerancia a la glucosa a pacientes cuya aplicación de la escala los situaba en riesgo; los resultados mostraron estados metabólicos precursores, como la prediabetes.²⁴ Resultados semejantes se encontraron en nuestro estudio, en el que se diagnosticó a 10% ($n=10$) de los sujetos en estado de prediabetes (HbA1c 5.7%), con concordancia global superior a la específica entre pruebas (50%).

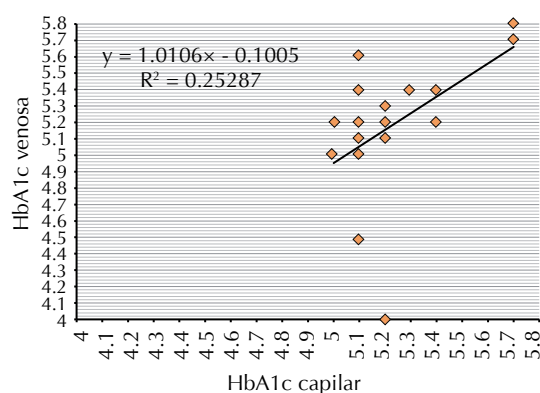


Figura 2. Correlación entre las determinaciones de hemoglobina glucosilada.

La diferencia en costo fue significativa, porque la determinación venosa genera un gasto 35.7% mayor que la capilar.

La concordancia específica entre hemoglobina glucosilada capilar y venosa en el diagnóstico de diabetes mellitus es de 25% ($p < 0.492$), este hallazgo subestima el diagnóstico 5% con respecto a la bibliografía internacional.²⁵

La determinación de la hemoglobina glucosilada capilar posee la misma sensibilidad que la determinación venosa y tiene especificidad superior en 5%. Los estudios clínicos internacionales aprueban la elevada especificidad y mediana sensibilidad de la medición de la HbA1c, esto con la finalidad de evitar resultados falsos positivos.¹⁷

La combinación de la HbA1c y la escala Findrisk permite optimizar el diagnóstico de estados tempranos de la enfermedad, lo que favorece la detección temprana de prediabetes en sujetos asintomáticos en riesgo moderado y modifica su evolución y pronóstico.

El problema sanitario que representa la diabetes mellitus tipo 2 obliga al personal de salud a buscar activamente nuevos casos de manera anticipada a las complicaciones microvasculares.

Poder medir un fenómeno biológico, como la glicación de hemoglobina, y traducirlo por medio de un parámetro bioquímico a la repercusión clínica proporciona al personal de salud información valiosa para la toma de decisiones.

En todo el mundo 45% de los pacientes con diabetes ignoran su padecimiento.² El tamizaje en población expuesta favorece la detección de diabetes mellitus y permite establecer medidas preventivas para retardar la aparición de complicaciones.

Los valores obtenidos en cuanto a sensibilidad y especificidad nos limitan para considerar a la prueba patrón de referencia. No se descarta la posibilidad de desarrollar una única herramienta con alta sensibilidad y bajo costo para el tratamiento global de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2014;37:S14-S80.
2. Asociación Latinoamericana de Diabetes. Guías ALAD sobre el Diagnóstico, Control y Tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2 con Medicina Basada en Evidencia. *Revista de la ALAD* 2013;1-142.
3. Organización Mundial de la Salud (OMS). Diabetes. Nota descriptiva núm. 312, Septiembre 2012.
4. Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, et al. Harrison: Principios de Medicina Interna. 18ª ed. México: McGraw-Hill, 2012;2968-2970.
5. Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014;37:S81-S90.
6. Hernández M, Gutiérrez JP. Diabetes mellitus: la urgencia de reforzar la respuesta en políticas públicas para su prevención y control. Instituto de Nacional Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2012.
7. Álvarez SE, González CT, Cabrera RE, Conesa GA y col. Algunos aspectos de actualidad sobre la hemoglobina glucosilada y sus aplicaciones. *Revista Cubana de Endocrinología* 2009;20:141-151.
8. Pérez PI, Rodríguez WFL, Díaz GEJ, Cabrera JR. Mitos y realidad de la hemoglobina glucosilada. *Med Int Méx* 2009;25:202-209.
9. Braga F, Dolci A, Mosca A, Panteghini M. Biological variability of glycated hemoglobin. *Clinica Chimica Acta* 2010;411:1606-1610.
10. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes - 2010. *Diabetes Care* 2010;33:S11-S61.
11. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): Results of Feasibility Study. *Diabetes Care* 1987;10:1-19.
12. UK Prospective Diabetes Study 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;352:837-853.
13. Yehuda Handelsman Y, Mechanick JI, Blonde L, et al. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for Developing a Diabetes Mellitus Comprehensive Care Plan. *Endocr Pract* 2011;17:1-53.
14. Zamudio VJ. Diagnóstico de diabetes con hemoglobina glicosilada. *Rev Evid Invest Clin* 2010;3:58-60.

15. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2011;34:e61-e99.
16. Nordin G, Dybkaer R. Recommendation for term and measurement unit for "HbA1c". *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1081-1082.
17. Bonora E, Tuomilehto J. The pros and cons of diagnosing diabetes with A1C. *Diabetes Care* 2011;34:S184-S190.
18. Braga F, Dolci A, Montagnana M, Pagani F, et al. Revaluation of biological variation of glycated hemoglobin (HbA1c) using an accurately designed protocol and an assay traceable to the IFCC reference system. *Clin Chim Acta* 2011;412:1412-1416.
19. Programme for the Prevention of Type 2 Diabetes in Finland 2003-2010. Finnish Diabetes Association.
20. Mattewal A, Aldasouqi S, Solomon D, Gossain V, Koller A. A1cNow® InView™: A new simple method for office-based glycohemoglobin measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2007;1:880-884.
21. Carter AW. An analysis of the assessment of glycated hemoglobin using A1cNow+™ point-of-care device compared to central laboratory testing—an important addition to pharmacist-managed diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2008;2:828-830.
22. Bode BW, Irvin BE, Pierce JA, Allen M, Clark A. Advances in hemoglobin A1c point of care technology. *J Diabetes Sci Technol* 2007;1:405-411.
23. Christensen DL, Witte DR, Kaduka L, Jorgensen ME, et al. Moving to an A1C-based diagnosis of diabetes has a different impact on prevalence in different ethnic groups. *Diabetes Care* 2010;33:580-582.
24. Martin E, Ruf E, Landgraf R, Hauner H, et al. FINDRISK questionnaire combined with HbA1c testing as a potential screening strategy for undiagnosed diabetes in a healthy population. *Horm Metab Res* 2011;43:782-787.
25. Kumar PR, Bhansali A, Ravikiran M, Bhansali S, et al. Utility of glycated hemoglobin in diagnosing type 2 diabetes mellitus: a community-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1-4.