



HbA1c

Cromatogrammi

Corso teorico-pratico

Emoglobina glicata: stato dell'arte

Dott.ssa T. De Michele – Dott.ssa D. Scribano

Laboratorio Analisi 1

UCSC-Roma 25/05/2010

EMOGLOBINA GLICATA (HbA1c)

raccomandazioni analitiche del gruppo di lavoro IFCC

Scelta accurata della metodica

Risultato della analisi

Calibrazione

CQI

VEQ

Aggiornamento permanente

IFCC units

Table 1 Suggested units and target values for HbA1c when measured with methods traceable to the IFCC reference system. A comparison with the current figures is also given.

	Current (NGSP-ADA)	IFCC traceable method
Reference interval (healthy)	4 - 6 %	20 - 42 mmol/mol
Target for treatment	< 7 %	< 53 mmol/mol
Change of therapy	> 8 %	> 64 mmol/mol

Raccomandazioni linee guida ADA

- La calibrazione deve essere eseguita per tutte le metodiche, anche per quelle in HPLC, con calibratori con titolo assegnato DCCT.
- Controllo interno di qualità su due livelli
- I laboratori devono rianalizzare tutti i campioni che presentano un risultato più basso del limite inferiore dell'intervallo di riferimento
- se riconfermato sospettare la presenza di una emoglobinopatia o una causa di emolisi.
- Ispezionare attentamente il cromatogramma per eventuale presenza di emoglobine varianti.
- Esprimere i risultati delle analisi come HBA1c in mmol/mol
- L'adesione al programma di controllo esterno di qualità è il modo migliore per valutare la performance nel tempo della metodica

Calcolo in mmol/mol HbA1c

$$\text{IFCC-HbA1c (mmol/mol)} =$$
$$[\text{DCCT-HbA1c (\%)} - 2.15] \times 10.929$$

EMOGLOBINA GLICATA

linee guida ADA

Emoglobina glicata	Controllo glicemico
< 6,3%	ottimo
tra 6,3% e 7,1%	buono
tra 7,1% e 9%	mediocre
>9%	cattivo

EMOGLOBINA GLICATA (HbA1c)

traguardi analitici

$$CV_{b\ intra} = 1.9\%$$

$$CV_{b\ inter} = 4.0\%$$

Precisione < 2.5%

Accuratezza = 1.6%

- biochimica clinica, 2009 vol.33

EMOGLOBINA GLICATA (HbA1c)

aspetti pre - analitici

*Prelievo venoso a digiuno in provetta contenente
EDTA*

*I campioni su sangue intero sono generalmente
stabili per una settimana a 4 °C*

*Da evitare conservazione impropria dei campioni a
temperature elevate*

EMOGLOBINA GLICATA (HbA1c)

Interferenze nella misura

***OGNI CONDIZIONE CHE PROVOCA UN
ACCORCIAMENTO DELLA SOPRAVVIVENZA
ERITROCITARIA PROVOCA UN FALSO
ABBASSAMENTO
DEI VALORI DI EMOGLOBINA GLICATA
INDIPENDENTEMENTE DAI METODI DI MISURA***

EMOGLOBINA GLICATA (HbA1c)

Interferenze nella misura metodo specifiche

a) valori falsamente negativi.

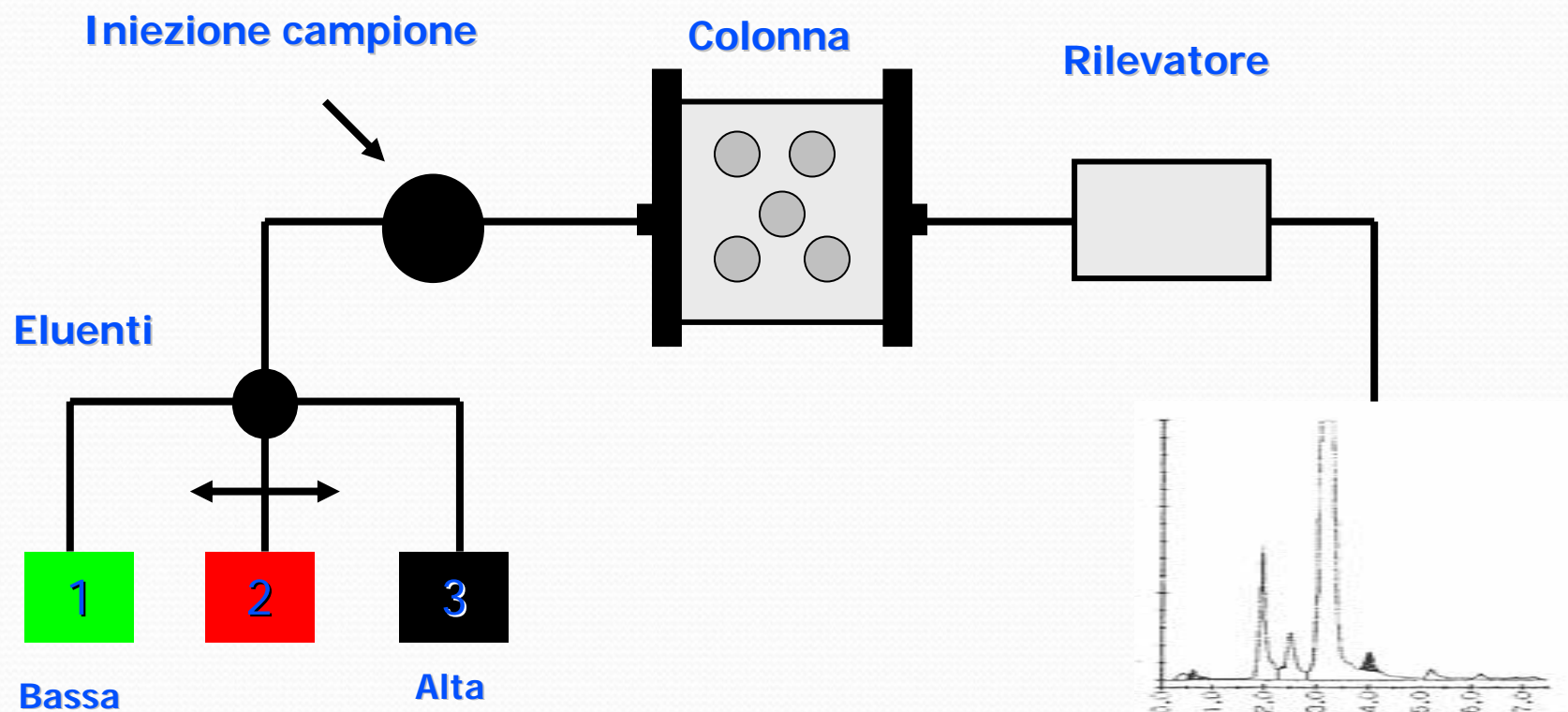
- Vit. E, Vit. C.
- Emoglobinopatie (*a seconda dei metodi*).

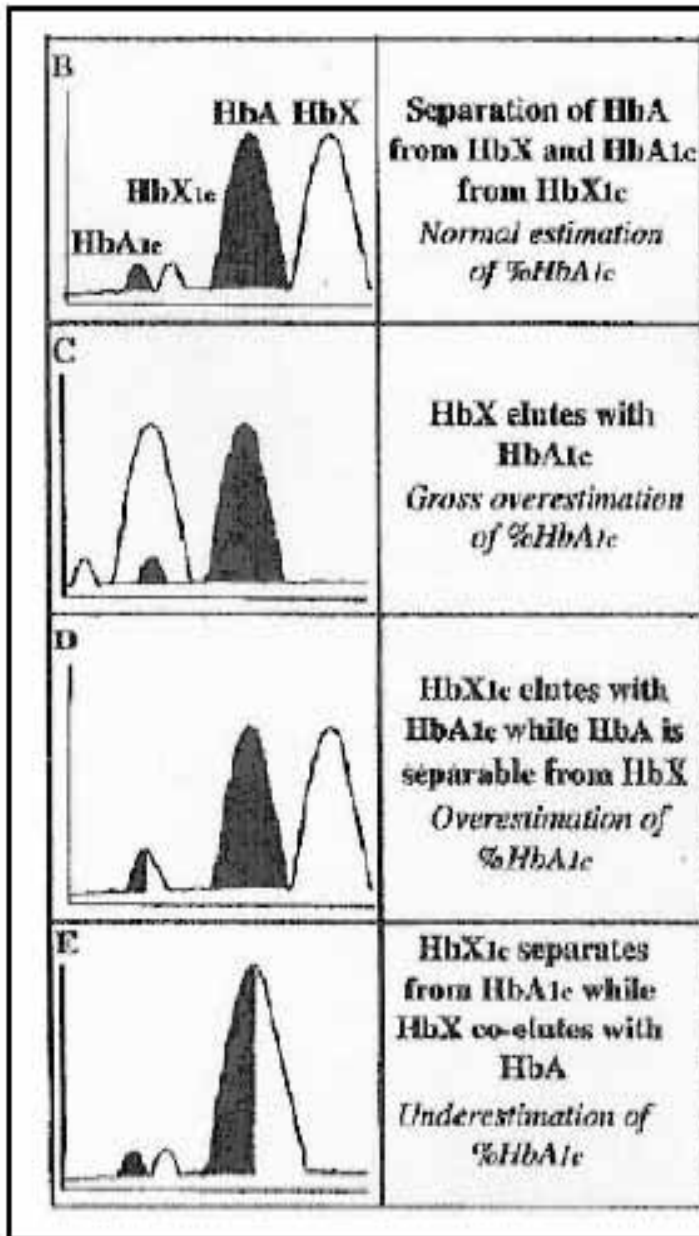
b) valori falsamente positivi

- Emoglobinopatie, (*a seconda dei metodi*).
- Ipertrigliceridemia, (metodi immunoturbidimetrici)
- Iperbilirubinemia,
- Insufficienza renale (aumento urea)(metodi HPLC)
- Alcolismo cronico,
- Invecchiamento del campione

HPLC: PRINCIPIO

- Le Emoglobine a carica positiva sono separate da una fase stazionaria a carica negativa nella colonna
- I cationi nella fase mobile (tamponi con incremento della forza ionica) competono con le Emoglobine assorbite spingendole all'esterno
- Le frazioni sono determinate otticamente dal rilevatore





HPLC

- Separa le Hb sulla base delle differenze di carica
- Uno spettrofotometro misura la concentrazione di Hb in ogni frazione
- Eluizione con tamponi che aumentano la forza ionica
- Risultati inesatti di HbA1c si verificano quando HbX, o HbX1c non possono essere separati da HbA0 o da HbA1c

Hb: Varianti fisiologiche

Emoglobine embrionali

geni Alfa, Zeta, Epsilon e Gamma presenti

Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$)

Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$)

Portland ($\zeta_2\gamma_2$)

Emoglobina fetale (Hb F)

geni Alfa e Gamma presenti

HbF ($\alpha_2\gamma_2$)

Emoglobine adulte (HbA)

geni Alfa, Beta e Delta presenti

HbA ($\alpha_2\beta_2$, > 95%)

HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$, < 3%)

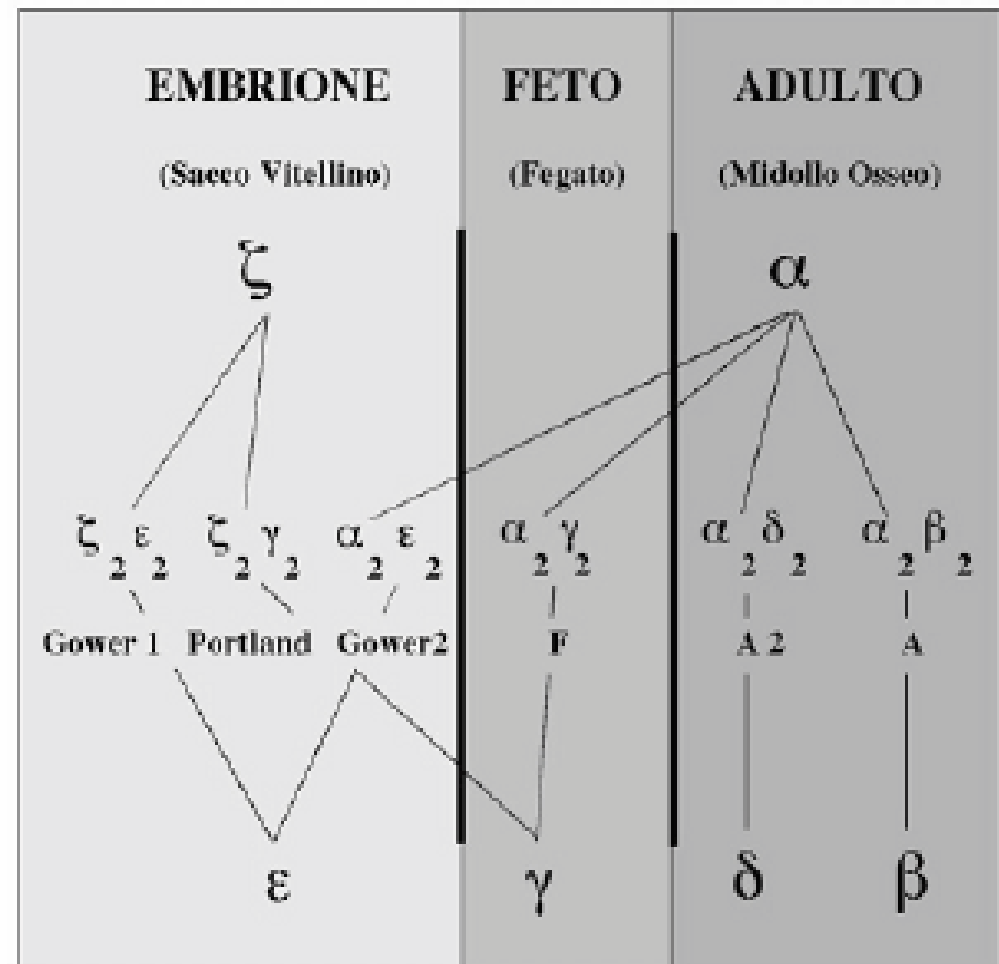
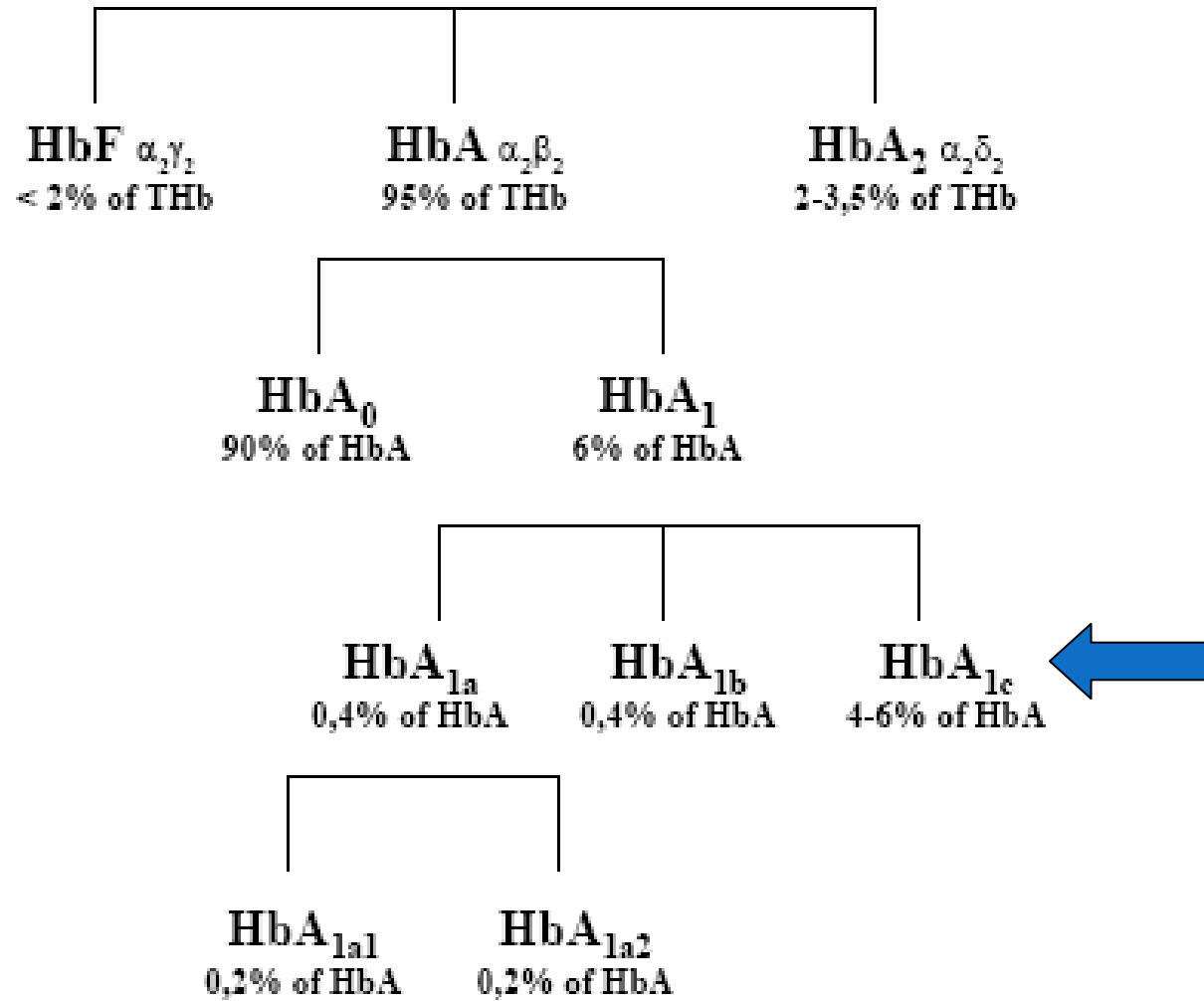


Fig.2. Composizione delle emoglobine (Gower 1, Gower 2, Portland, F, A, A₂) prodotte nell'uomo dall'embrione, dal feto e dall'adulto. Tra parentesi sono indicati i siti di eritropoiesi.

Total Haemoglobin (THb)



Le maggiori varianti emoglobiniche

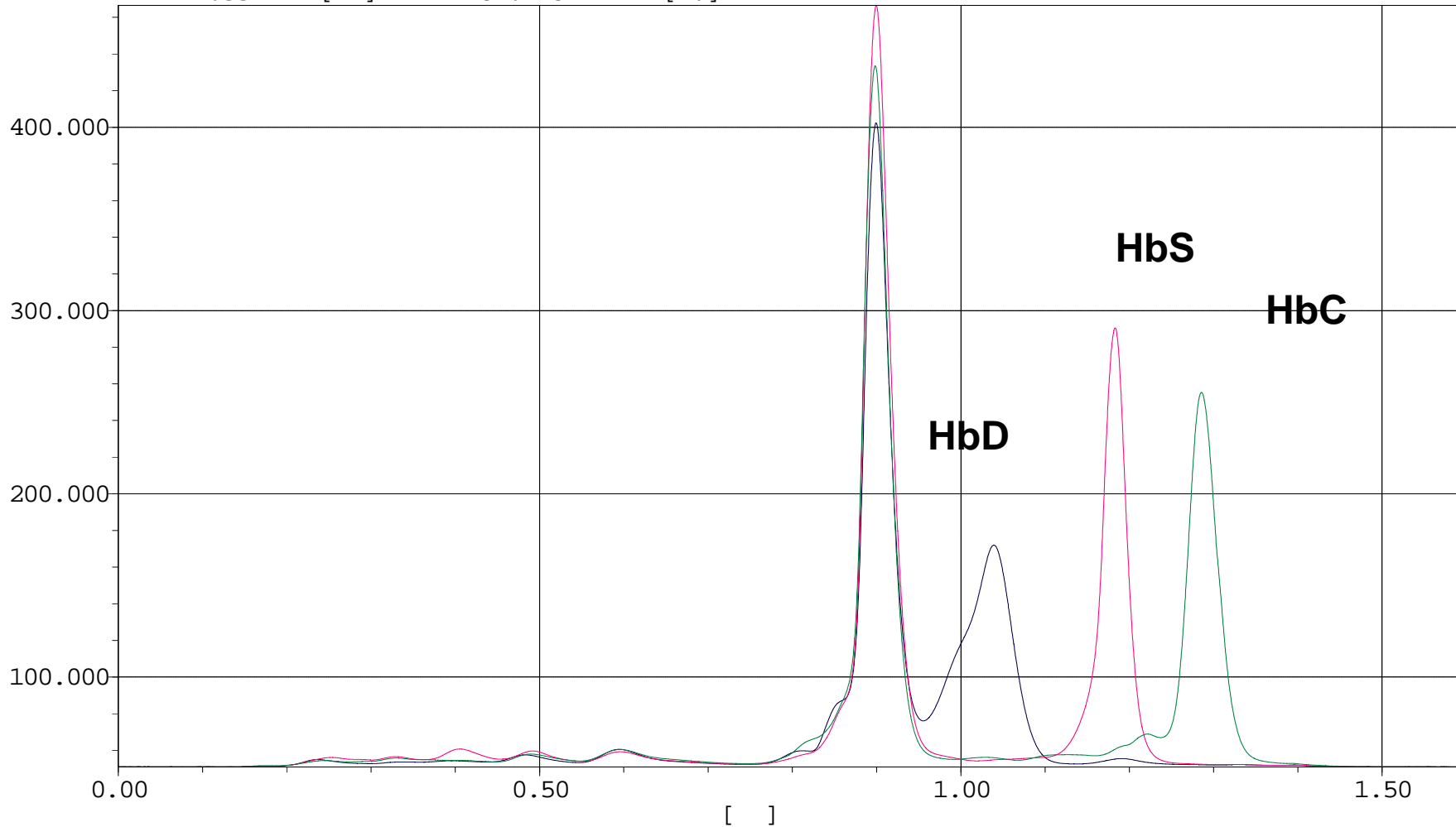
<i>Hb S</i>	<i>Bacino Mediterraneo</i> <i>Africa (regioni orientali 40%)</i> <i>Arabia</i> <i>India</i>
<i>Hb C</i>	<i>Africa (regioni occidentali 20%)</i>
<i>Hb D</i>	<i>India Nord-Ovest</i>
<i>Hb E</i>	<i>Sud-Est Asiatico (15-30%)</i>



[mV]

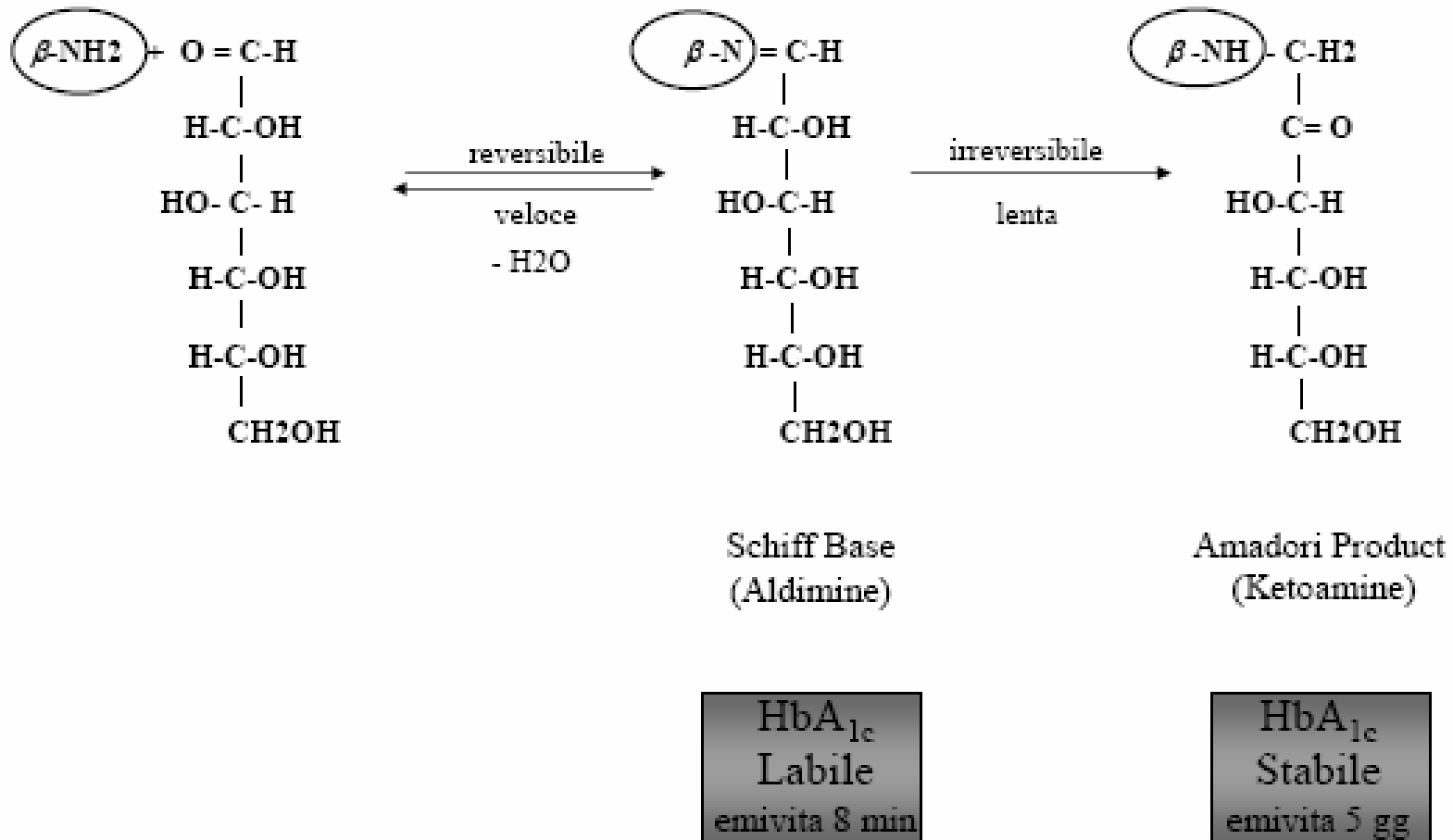
HbA0

x : 1.33 [] y1 : 487.178 [mV]

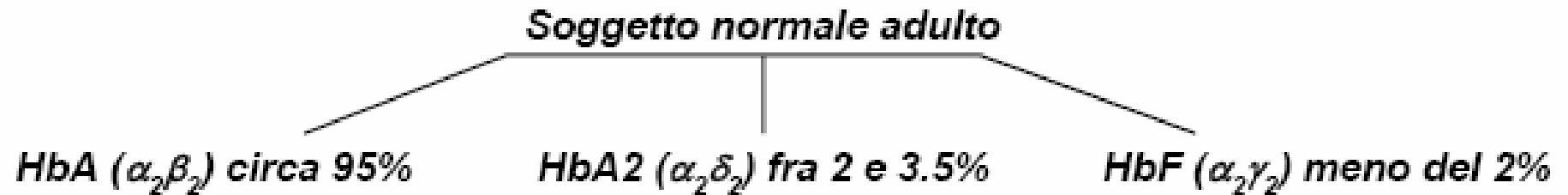


Reazione di glicazione non enzimatica

gruppo aldeidico del glucosio + il gruppo amminico N-terminale delle catene β dell' Hb



Emoglobine: cenni storici



1955 <i>Elettroforesi su amido</i>	<i>Resina a scambio cationico eluizione da colonnine di IRC-50</i>	Anno '68 circa	Anni '80 <i>Bunn et al.</i>
<i>Frazioni emoglobiniche "minori"</i> <i>Modifiche post-traduzionali</i>	A_{1a} A_{1b} A_{1c} A_{1d} A_{1e}	A_{1c} <i>aumenta in soggetti affetti da <u>diabete mellito</u></i>	<i>circa 60% del glucosio lega le valine N-terminali delle catene β dell'HbA_{1c}</i>

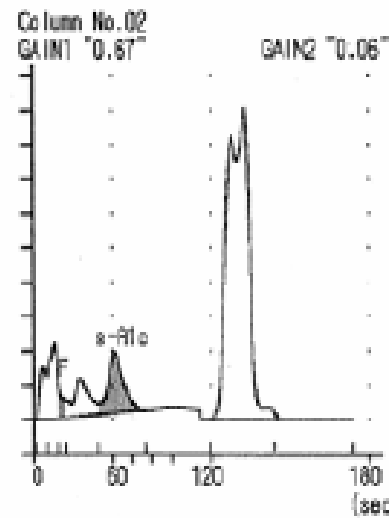
Menarini Adams A1c HA-8160



***** HA-8160 V7.35 *****
 22-02-2009 14:35 PORT No.0002
 MEAS No.
 ID

HbA1c 5.8 % HbF 0.3 %
 HbA1 7.9 %

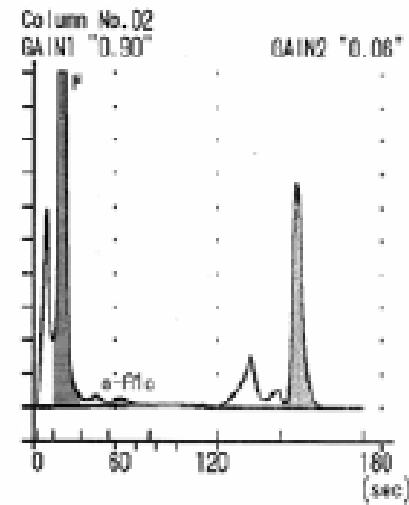
	Sec	Area	%
P1	8	332	0.9
P2	16	751	1.9
P3 F	20	101	0.3
P4 L-A1c	35	734	1.9
P5 s-A1c	62	1989	5.1
P6 A0	133	35040	90.0
Total		38947	



***** HA-8160 V7.35 *****
 MEAS No.
 ID

HbA1c 4.8 % HbF 11.3 %
 HbA1 --- -- %

	Sec	Area	%
P1	9	1462	20.8
P2 F	21	3667	11.3
P3 L-A1c	45	200	3.0
P4 s-A1c	64	284	4.1
P5 A0	132	5056	15.6
P6 S/C Window	147	21712	67.0
Total		32991	



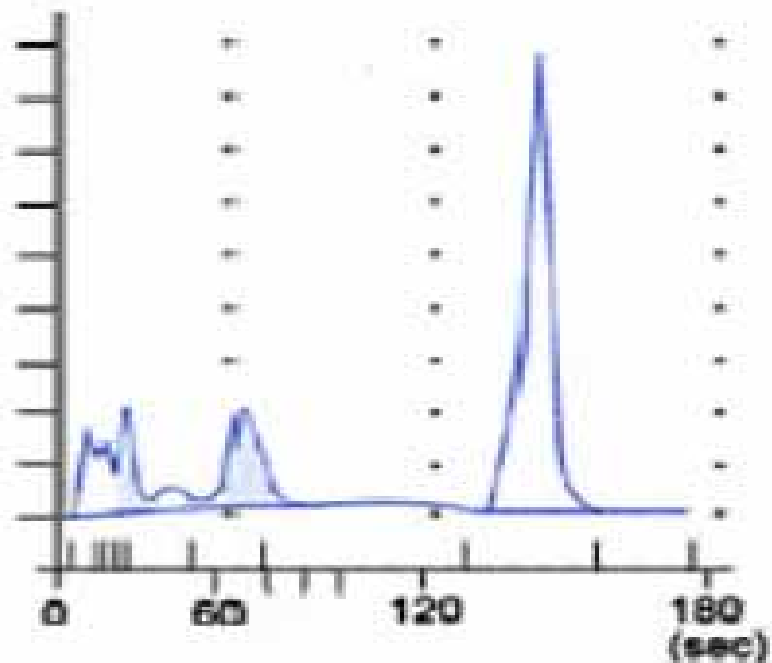
***** HA - 8160 VXLXX *****
2001-03-15 13:01 PORT No. 0001
MEAS No. 0001

HbA1c 5.4 % HbF 1.0 %
HbA1 7.2 %

	Sec	Area	%
P1	9	339	1.0
P2	14	281	0.8
P3 F	21	350	1.0
P4 L-A1c	39	406	1.2
P5 s-A1c	64	1895	5.4
P6 A0	140	32106	90.8
Total		35377	

Column No.00
GAIN 1 *0.52*

GAIN 2 *0.59*





Tosoh H723G7BetaThal Mode
Tosoh HLC-723G7HbA1c Variant Mode



* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *

TOSOH CORPORATION V01.15
 NO:
 ID:
 CALIB Y = 1.1091X + 0.8854

TP 836

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	7.9	0.31	14.23
A1B	0.0	0.00	0.00
F	8.7	0.52	77.87
LA1C+	0.0	0.00	0.00
SA1C	5.2	0.70	7.76
A0	71.7	1.06	126.79
H-V1	71.4	1.44	841.98
TOTAL AREA			899.85
HbA1C			5.2%
HbA1	13.1%	HbF	8.7%
0%		15%	

P00	8.6	1.32	15.50
P01	7.5	1.82	13.44
HB-VAR DETECT			

** THALASSEMIA REPORT **

OSP. RIUNITI (86)

TOSOH CORPORATION V01.15
 NO:
 ID:
 CALIB F Y = 0.9878X
 A2 Y = 1.6156X

TP 2074

NAME	%	TIME	AREA
F	8.4	1.11	101.15
A0	8.2	3.22	156.08
A2	4.8	4.12	56.07
D+	0.0	0.00	0.00
S+	72.4	6.03	1378.85
C+	0.0	0.00	0.00
TOTAL AREA			1804.11
F :		8.4%	
A2 :		4.8%	

P00	1.6	0.52	34.14
P01	1.6	1.91	27.75
P02	0.7	2.41	13.62
P03	0.6	2.85	8.35
P04	0.7	5.23	12.64
P05	1.6	5.55	34.21
P06	1.1	6.87	20.24

Sistema TOSOH

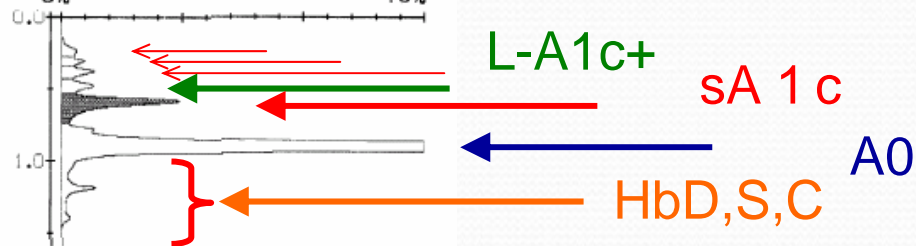
* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *
2006/09/25 16:21
TOSOH CORPORATION V01.04
NO: 9003 SL 0001 - 01
ID: 0001 - 01
CALIB Y = 1.0000X + 0.0000

TP 575

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	0.6	0.24	8.16
A1B	0.6	0.31	8.30
F	1.1	0.38	14.24
LA1C+	1.2	0.48	15.58
SA1C	4.9	0.59	65.55
A0	91.6	0.89	1221.71
TOTAL AREA			1333.53

HbA1C 4.9%

HbA1 6.1% HbF 1.1%



- 1.6 min / test (VAR-Mode)
- 37 Tests / hour (VAR-Mode)
- Alta risoluzione
 - Separazione di 6 frazioni + alcune varianti
 - No effetti da Hb modificate.
 - No effetti da alcune Hb Varianti

* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *

2006/12/19 11:15

TOSOH CORPORATION V01.05

NO: 0001 SL 0001 - 03

ID: 0001 - 03

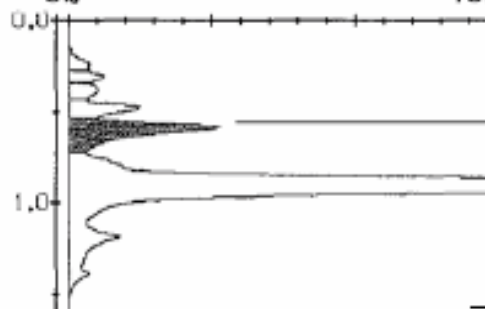
CALIB Y = 1.2283X + 0.0726

TP 431

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	0.5	0.23	7.84
A1B	0.7	0.31	10.57
F	0.8	0.38	12.31
LA1C+	1.5	0.48	23.69
SA1C	5.3	0.59	66.41
A0	92.3	0.89	1454.68
TOTAL AREA			1575.49

HbA1C 5.3%

HbA1 6.4 % HbF 0.8 %
0% 15%



Sample number of the day

Barcode or rack, position number

Different Hb fractions

Percentage for each fraction

HbA_{1c} percentage

HbA1 fraction

Date and time of analyses

Software version

Calibration equation

Theoretical plate

Retention time for each fraction

Area for each fraction

Total area

HbF fraction

HbA_{1c} marked in black

A0 fraction

Flag field

C r o m a t o g r a m m a

* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *

2006/12/19 11:15

TOSOH CORPORATION V01.05

NO: 0001 SL 0001 - 03

ID: 0001 - 03

CALIB Y = 1.2283X + 0.0726

Calibration equation

Different Hb fractions

TP 431

HbA₁ fraction

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	0.5	0.23	7.84
A1B	0.7	0.31	10.57
F	0.8	0.38	12.31
LA1C+	1.5	0.48	23.69
SA1C	5.3	0.59	68.41
A0	92.3	0.89	1454.68
TOTAL AREA			1575.49

HbA_{1c} fraction

Total Area
Sum of all areas
under the peaks

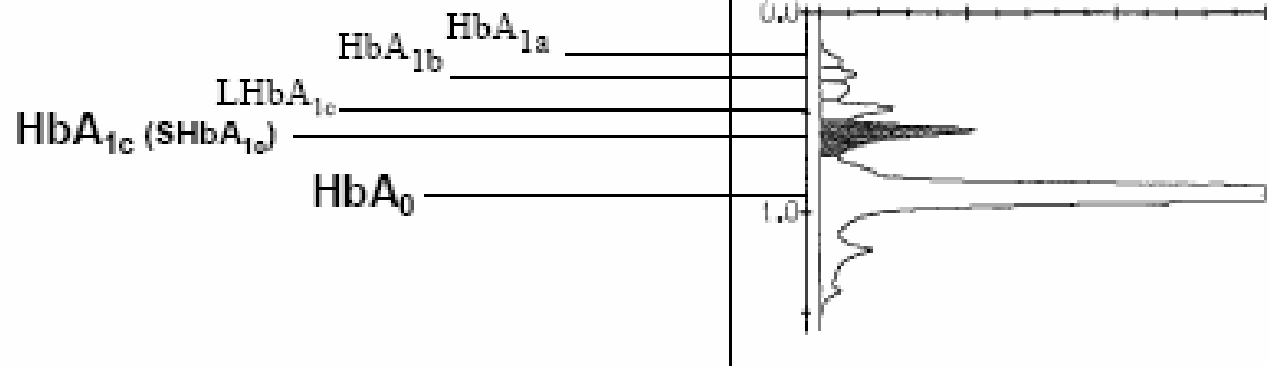
Calculation HbA_{1c}

Area SHbA_{1c} x 100

Total Area - Variant Area - F Area

HbA1C 5.3%

HbA1 6.4 % HbF 0.8 %
0% 15%



INTERPRETAZIONE HbA1c

Retention times

A1A : 0.3

A1B : 0.4

F : 0.5

IA1c : 0.6

sA1c : 0.69 - 0.75

A0 : 1.05 - 1.09

H-V0 : 1.15 - 1.35 presunta D

H-V1 : 1.35 - 1.55 presunta S

H-V2 : 1.55 - 1.75 presunta C

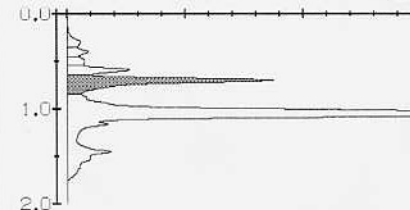
* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *

2004/10/07 18:24
TOSOH CORPORATION V01.08
NO: 0010 SL
ID: 0001 - 07
CALIB Y = 1.0000X + 0.0000

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	0.8	0.31	3.01
A1B	0.9	0.41	3.44
F	0.9	0.52	3.47
LA1C+	2.4	0.60	8.85
SA1C	8.8	0.71	32.90
A0	86.2	1.06	321.62
TOTAL AREA			373.30

HbA1C 8.8%

HbA1 10.5 % HbF 0.9 %
0% 15%



AREA LOW

HbA1c Cromatogramma Patologico

* GLYCOHEMOGLOBIN REPORT *

QA 50912

2001/03/13 10:30

TOSOH CORPORATION V01.03

NO: 9006 SL

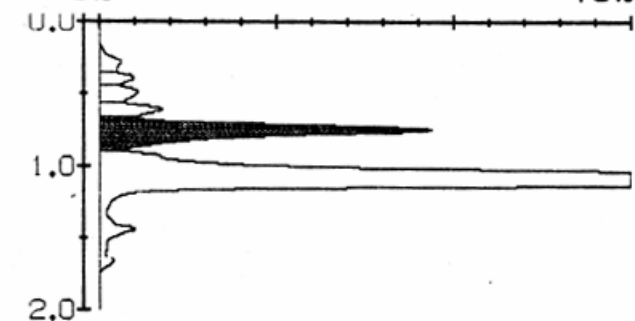
ID: 0001 - 02

CALIB Y = 1.0000X + 0.0000

NAME	%	TIME	AREA
FP	0.0	0.00	0.00
A1A	0.6	0.30	8.80
A1B	0.8	0.41	10.68
F	1.1	0.50	14.97
LA1C+	1.5	0.62	20.06
SA1C	9.3	0.76	128.51
A0	86.7	1.08	1193.94
TOTAL AREA			1376.97

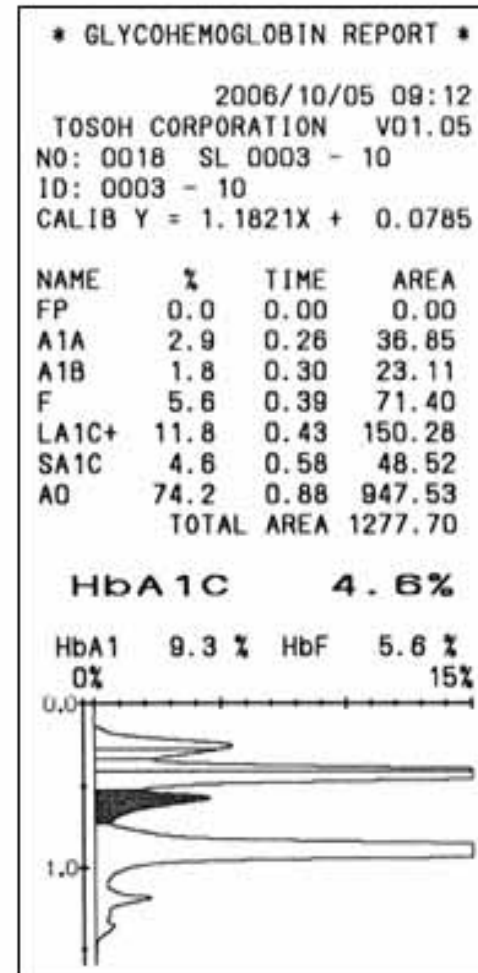
HbA1C 9.3%

HbA1 10.7 % HbF 1.1 %
0% 15%

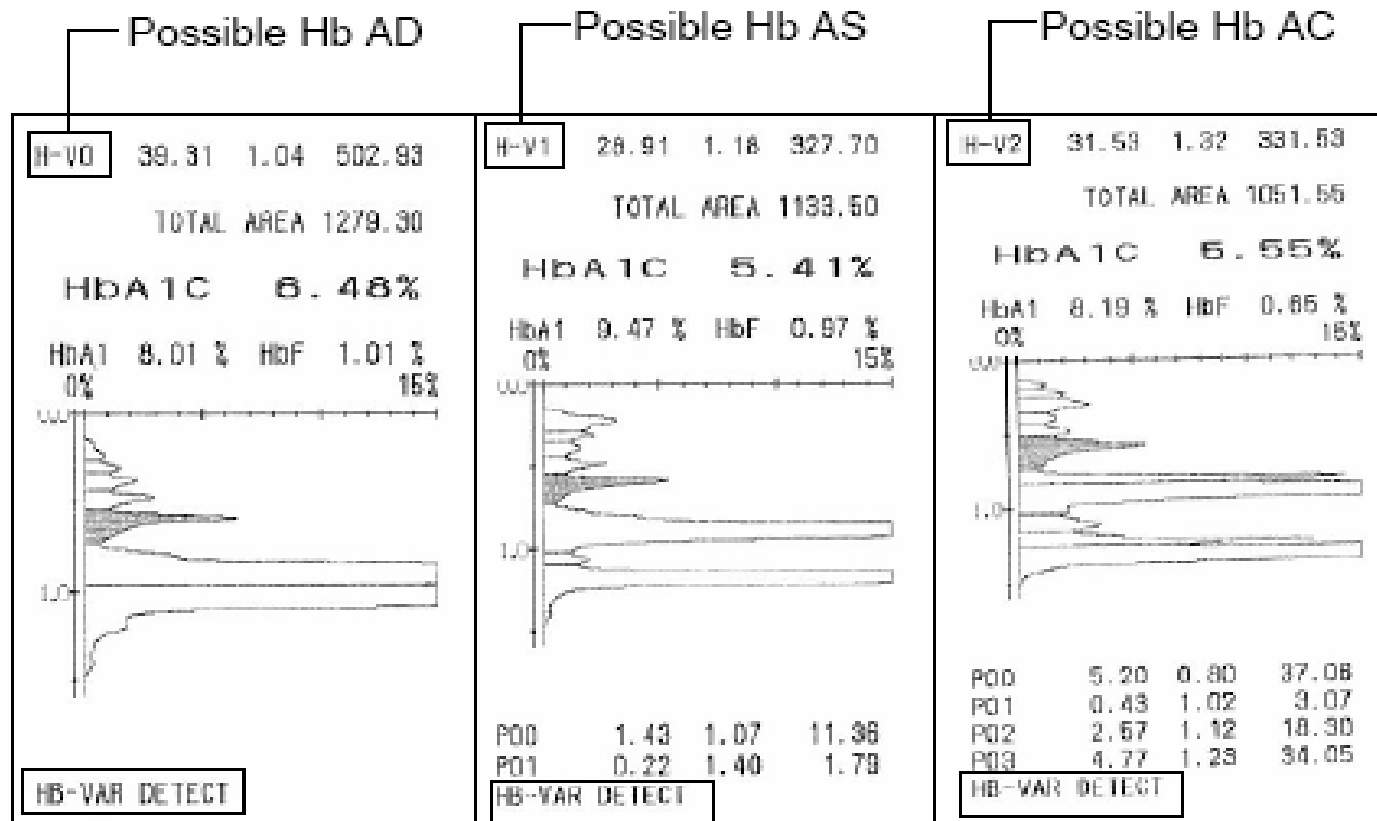


HbF alta

Risultati non dichiarabili perchè
HbF co-eluisce con L-A1c.



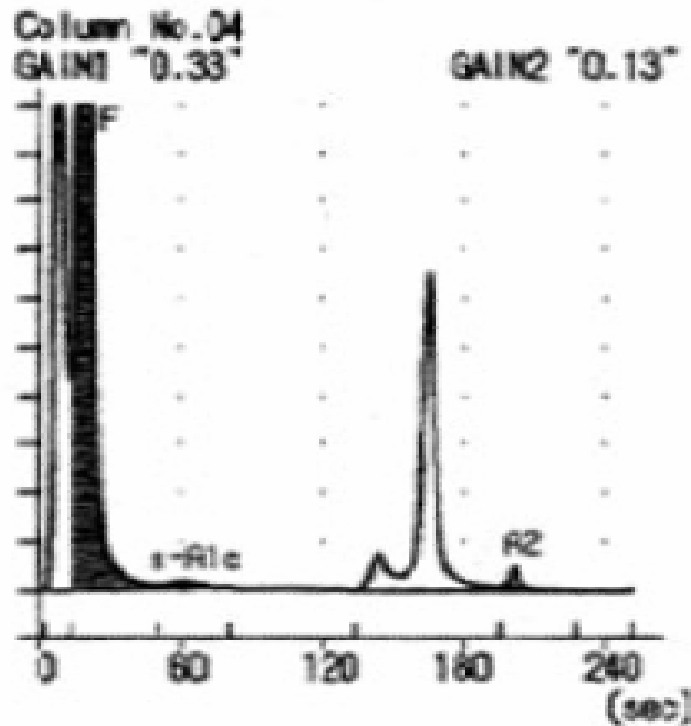
In presenza di varianti (aree HV0, HV1, HV2) tali aree sono automaticamente sottratte nel calcolo dell'Hb A1c



EXPERIMENT HA-8160 V7.31
03-07-2003 10:57 PORT No.0001
MEAS No.0001

HbA1c 3.5 % HbF 56.6 %
HbA1 ---.--- % HbA2 0.2 %

	Sec	Area	%
P1	9	9072	32.9
P2 F	19	27018	49.4
P3 s-A1c	60	701	2.5
P4 A0	165	17843	32.6
P5 A2	201	93	0.2
Total		54727	

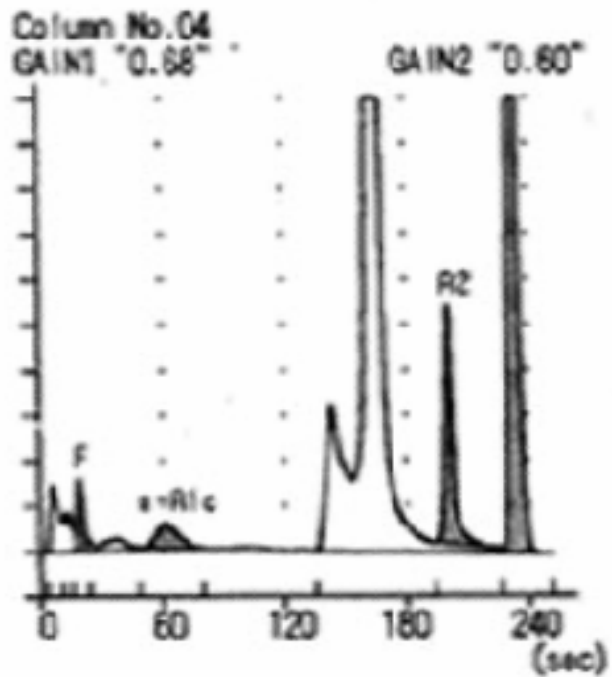


Campione neonatale

HA-8160 Y7.31
21-06-2008 11:13 PORT No.0022
MEAS No.0005

HbA1c 5.9 % HbF 1.7 %
HbA1 8.9 % HbA2 4.8 %

	Sec	Area	%
P1	6	309	2.6
P2	13	149	1.2
P3 F	19	314	1.6
P4 L-A1c	37	211	1.8
P5 s-A1c	62	611	5.1
P6 A0	165	10679	54.3
P7 A2	202	1068	5.4
P8 S/C Window	230	6328	32.2
Total		19889	

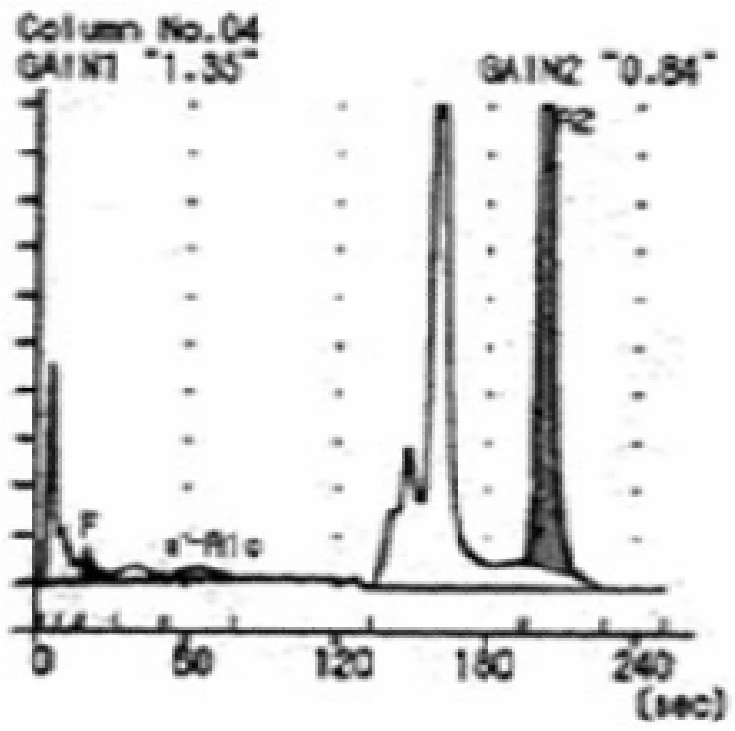


HbA5

RECEIVED HA-8160 V7.31 RELEASED
 20-05-2003 15:49 PORT No.0034
 MEAS No.0008

HbA1c 4.4 % HbF 0.7 %
 HbA1 — . — % HbA2 55.0 %

	Sec	Area	%
P1	6	336	5.8
P2	11	158	2.7
P3 F	20	115	0.7
P4 L-A1c	39	116	2.0
P5 s-A1c	85	200	3.4
P6 A0	160	5008	32.1
P7 A2	201	9584	62.0
Total		15597	

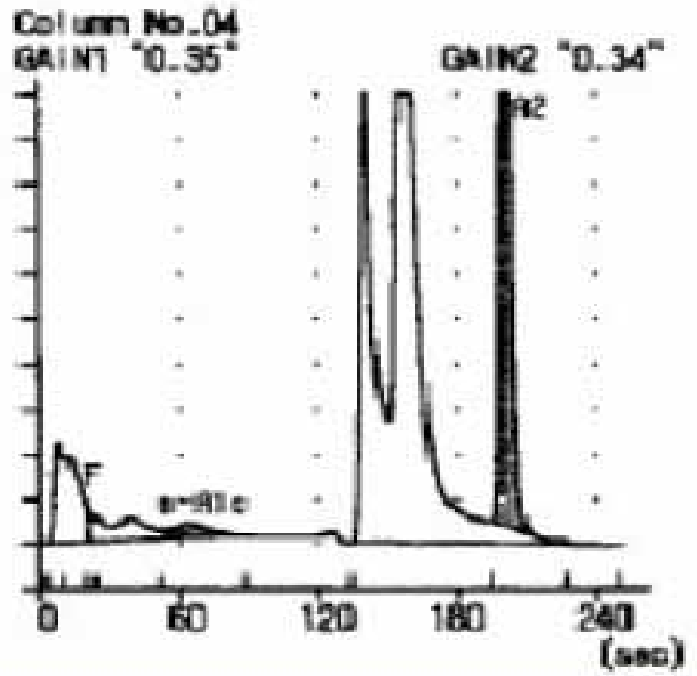


Beta + thal/D

08-06-2003 11:01
 MEAS No. 0008
 0021

HbA1c 4.6 %
 HbA1 0.7 %
 HbA2 18.2 %

	Sec	Area	%
P1	8	889	3.0
P2	12	1271	4.3
P3 F	19	268	0.7
P4 L-A1c	39	958	3.4
P5 a-A1c	64	1096	3.7
P6 A0	157	25295	67.4
PT A2	201	7702	20.5
Total		37517	



Hb AD