

La determinazione della emoglobina glicata (Hb A_{1c}) nel sangue: raccomandazioni

Andrea Mosca¹, Annunziata Lapolla², Carlo Franzini³

¹Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

²Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Padova

³Ist. di Scienze Biomediche, Ospedale L. Sacco, Università degli Studi di Milano

INTRODUZIONE

Negli ultimi 20 anni circa si sono rese disponibili numerose metodiche per la misura dell'emoglobina glicata (Hb A_{1c}) nel sangue e la sua determinazione fa parte della routine della maggior parte dei laboratori di analisi e dei centri antidiabetici. Purtroppo la mancanza di metodiche di riferimento ufficiali e la non disponibilità di materiali comuni di calibrazione ha fatto sì che tuttoggi esista una ampia differenza negli intervalli di riferimento e che praticamente il risultato ottenuto in un laboratorio non sia confrontabile con quello ottenibile in un altro laboratorio sullo stesso campione, anche nel caso limite che i due laboratori utilizzino la stessa metodica analitica. In altri termini, manca tuttora la standardizzazione del dato, anche se le differenti metodiche disponibili possono essere considerate, ognuna per proprio conto, standardizzate.

Scopo di questo documento è pertanto quello di fornire raccomandazioni operative in attesa che il processo di standardizzazione internazionale attualmente in corso a livello di produttori di diagnostici possa essere definitivamente implementato. Pare opportuno tuttavia, prima di passare ad elencare le indicazioni operative, ricordare alcuni punti essenziali, riguardanti rispettivamente la biochimica della reazione tra emoglobina e glucosio, la tipologia delle metodiche analitiche e la terminologia.

Da un punto di vista biochimico la reazione di glicazione dell'emoglobina è complessa, soprattutto per due motivi: (a) perché più residui aminoacidici sono in grado di reagire col glucosio, principalmente le valine terminali delle catene β (Val 1 β), ma anche diversi altri residui (Lys 66 β , Lys 17 β , Val 1 α); (b) perché la reazione ad ogni residuo avviene in più fasi, passando prima per una fase reversibile (formazione della aldimina) e quindi per una fase lenta, praticamente irreversibile (ketoamina). Alcuni recenti dati di letteratura hanno provato che la glicazione ai residui N-terminali delle catene β rappresenta circa il 60% della glicazione totale della molecola (1), ma che esistono significative differenze tra individui a seconda del grado di scompenso glicometabolico.

Dal punto di vista analitico le metodiche attualmente disponibili possono essere raggruppate in tre categorie: (i) quelle basate sulla differenza di carica elettrica dell'Hb A_{1c} rispetto alla Hb A (HPLC, LC, elettroforesi); (ii) quelle in cromatografia di affinità; (iii) le immunochimiche. A riprova che si tratta di metodiche tra loro differenti è stato dimostrato (2) che la frazione corrispondente alla HbA_{1c} isolata in scambio ionico non è qualitativamente e quantitativamente equivalente alla frazione di emoglobina glicata separata mediante cromatografia di affinità. Non è nello scopo di questo documento descrivere nei dettagli le metodiche analitiche e le loro limitazioni. Per chi volesse approfondire l'argomento si rimanda alla rassegna di John (3).

Da un punto di vista metrologico infine, va sottolineato che anche la definizione stessa di emoglobina glicata è multiforme. In ambito clinico, per motivi fondamentalmente storici, la Hb A_{1c} è identificata come la frazione emoglobinica che presenta il glucosio legato covalentemente alle estremità delle catene β globiniche e che può essere separata come

componente cromatografica omogenea mediante cromatografia a scambio cationico dopo eliminazione della forma aldimerica. Più recentemente un gruppo di lavoro appositamente istituito presso la IFCC ne ha dato una definizione più rigorosa identificando la Hb A_{1c} come βN1-deossifruktosil-emoglobina. Per praticità in questo documento faremo riferimento a quanto finora maggiormente utilizzato in ambito clinico, e quindi utilizzeremo ancora la prima definizione, anche se formalmente non corretta. Per quanto riguarda le sigle, con DCCT ci si riferisce allo studio del Diabetes Control and Complications Trial (4), e con IFCC alle attività connesse al gruppo di lavoro sull'emoglobina glicata promosso dalla Federazione Internazionale di Chimica Clinica (5).

INDICAZIONE DELL'ESAME E SUA INTERPRETAZIONE

La concentrazione dell'HbA_{1c} nel sangue è il parametro di elezione per la valutazione retrospettiva del controllo glicemico nei soggetti con diabete mellito. La frequenza con la quale la determinazione dovrebbe essere eseguita è la seguente:

- 1 volta ogni 6 mesi, nei soggetti con diabete di tipo 2 in buon compenso metabolico
- 1 volta ogni 3-4 mesi, nei soggetti con diabete di tipo 1 e nei soggetti con diabete di tipo 2 in controllo metabolico non ottimale
- 1 volta ogni 1-2 mesi, nei casi di diabete di tipo 1 scompensato, in caso di gravidanza diabetica e nel diabete gestazionale.

Gli intervalli di riferimento sono metodo-dipendenti ed è prassi comune riferirsi agli intervalli di riferimento elaborati nell'ambito del trial clinico DCCT che sono, per soggetti adulti sani (di età compresa tra 14 e 40 anni) pari a 4,3 - 5,9 % (percentuale sul totale delle emoglobine eritrocitarie). Non vi è dipendenza dal sesso, e vi è una leggera variazione in funzione dell'età, anche se mancano dati di riferimento certi. Quale regola empirica vale l'approssimazione che vi sia un aumento di 0,1% (percentuale sul totale delle emoglobine eritrocitarie) per ogni decade di età.

Nell'interpretazione del risultato si tenga presente che i valori di emoglobina glicata possono riflettere variazioni della glicemia nelle 6 - 8 settimane precedenti il prelievo, con anche variazioni sensibili a seconda della glicemia del mese precedente. Un recente documento dello NCCLS, tuttora in fase di elaborazione, riporta che il 50% dell'informazione è relativa appunto al controllo glicemico del mese precedente il prelievo (6). Sono stati anche elaborati alcuni algoritmi (7, 8) che permettono di stimare la glicemia media delle 6 - 8 settimane precedenti il prelievo dal risultato della misura dell'Hb A_{1c}. Tali algoritmi sono metodo-dipendenti e non hanno quindi un'applicabilità generale. Secondo la dichiarazione di St. Vincent della WHO (9) un buon controllo glicemico è correlato a valori di Hb A_{1c} inferiori al limite di 3 deviazioni standard sopra il valor medio di riferimento, ed un cattivo controllo glicemico è correlato a valori di Hb A_{1c} superiori al limite di 5 deviazioni standard. Con riferimento agli intervalli di riferimento sopra menzionati (assumendo come valore medio della popolazione di soggetti non diabetici un valore di Hb A_{1c} pari a 5,1% ed una DS pari a 0,4%; percentuali sul totale delle emoglobine eritrocitarie) tale concetto può essere così schematizzato:

- Hb A_{1c} < 6,3 % = ottimo controllo glicemico
- Hb A_{1c} tra 6,3 e 7,1 % = buon controllo glicemico
- Hb A_{1c} tra 7,1 e 9 % = mediocre controllo glicemico
- Hb A_{1c} > 9 % = cattivo controllo glicemico

Più recentemente l'American Diabetes Association (10) ha definito quali sono gli obiettivi specifici che bisogna raggiungere, con adeguato trattamento, sia nei pazienti affetti da diabete di tipo 1 che in quelli con tipo 2. In particolare, considerando "normali" valori di Hb A_{1c} < 6%, l'obiettivo da raggiungere in tali pazienti è un valore di Hb A_{1c} del 7%; in pazienti che presentano valori di Hb A_{1c} > 8% l'ADA raccomanda la rivalutazione del regime terapeutico.

Un compendio sintetico dei principali interferenti nella misura della Hb A_{1c} è riportato infine in Tabella 1.

Tabella 1
Principali fonti di interferenze nella misura dell'emoglobina glicata

Interferenza	Osservazioni
Aumento dei globuli bianchi	Elevati livelli di globuli bianchi (LLC) possono interferire positivamente con diverse metodiche
Emoglobinopatie	L'eventuale interferenza (positiva o negativa) può essere sia analitica (metodiche in HPLC a scambio ionico generalmente più influenzabili) sia biologica (effetti sulla vita media eritrocitaria)
Frazione labile	Può causare valori falsamente aumentati se non eliminata o separata. Le metodiche immunochimiche ed in cromatografia di affinità non ne sono influenzate
Insufficienza renale	L'aumento dell'urea può formare, sotto forma di cianato, emoglobina carbamidata che generalmente coeluisce con le metodiche a scambio ionico. Spesso nei pazienti uremici la vita media eritrocitaria è ridotta
Invecchiamento del campione	Nei campioni di sangue non fresco (più di 3 - 4 giorni dal prelievo) l'aumento di glutationilemoglobina provoca la formazione di gluationilemoglobina che interferisce positivamente nelle metodiche HPLC
Ipertrigliceridemia	Interferenza positiva nelle metodiche immuno-turbidimetriche
Processi emolitici	Possono causare valori falsamente abbassati per diminuzione della vita media eritrocitaria
Variabilità stagionale	Discreto effetto (fino a circa 7%) di tipo ciclico, con periodo semestrale

Tabella 2
Traguardi per la imprecisione, per lo scostamento sistematico e per l'errore totale nella misura della HbA_{1c}, a tre livelli di qualità di esecuzione

Traguardo per	Livello di qualità		
	Minimo (%)	Desiderabile (%)	Ottimale (%)
Imprecisione	3,8	2,5	1,2
Scostamento sistematico (bias)	2,4	1,6	0,8
Errore totale	8,6	5,7	2,9

REQUISITI DI QUALITÀ ANALITICA

E' unanimemente ammesso che il migliore approccio alla definizione di requisiti di qualità analitica è rappresentato dal riferimento alla variabilità biologica.

I dati disponibili in letteratura sulla variabilità biologica intra- ed inter-individuale della HbA_{1c} sono piuttosto scarsi e discretamente discordanti. Le discordanze possono derivare dalle oscillazioni cicliche stagionali che sembrano caratterizzare la concentrazione della HbA_{1c} (11) e quindi dalla durata del periodo di osservazione. Una stima provvisoriamente accettabile della variabilità biologica intraindividuale (CV_w), come media dei valori riportati nel lavoro citato (11) e nelle ultime rassegne sull'argomento (12, 13, 14), scartando il valore più alto e quello più basso, darebbe CV_w = 5,0%. Per la variabilità biologica interindividuale (CV_b) l'unico dato riportato in letteratura (11) è pari a 3,3%. Calcolando la medesima (15) sulla base di un intervallo di riferimento corrispondente a 4,3 ± 5,9%, di CV_w = 5% e di una variabilità analitica (CV_a) pari a 3,5%, si ottiene CV_b = 4,8%. La media tra i due valori darebbe una stima provvisoriamente accettabile per la variabilità biologica inter-individuale corrispondente a CV_b = 4,0%.

Sulla base di queste due stime della variabilità biologica intra- ed inter-individuale (rispettivamente, CV_w = 5,0% e CV_b = 4,8%), applicando le formule correnti (13, 15) si possono calcolare i traguardi per la imprecisione, per lo scostamento sistematico e per l'errore totale, a tre livelli di qualità della esecuzione come suggerito recentemente (16); tali valori sono riportati nella Tabella 2. Si rammenta il carattere indicativo che si deve

assegnare ai valori riportati, sia in linea di principio sia in riferimento alla provvisorietà delle stime di variabilità biologica utilizzate per i calcoli.

STANDARDIZZAZIONE, CALIBRAZIONE E RISOLUZIONI OPERATIVE

Il gruppo di lavoro della IFCC ha recentemente proposto un metodo di riferimento per la misura della Hb A_{1c} basato sulla analisi specifica dei residui N-terminali delle catene β (17). In questo metodo gli esapeptidi N-terminali della Hb A e della Hb A_{1c} prodotti mediante digestione enzimatica con una endoproteinasi Glu-C sono separati con HPLC in fase inversa e quantificati con spettrometria di massa con ionizzazione ad elettrospray. Il gruppo IFCC ha anche prodotto materiali di calibrazione primari ed è in fase di definizione un materiale di calibrazione secondario di elevata commutabilità e stabilità (18). E' in fase di preparazione un documento IFCC il quale, una volta approvato e votato dalle singole società scientifiche, permetterà di presentare tale metodica e tali materiali come metodica e materiali di riferimento ufficiali.

Non è ancora tuttora pronto il trasferimento di questo sistema metrologico alla pratica clinica, solita riferirsi al "sistema DCCT". Tale riferimento è improprio dal punto di vista analitico (non esiste alcuna metodica di riferimento ufficiale prodotta dallo studio DCCT, né lo studio DCCT ha mai prodotto materiali di calibrazione o di riferimento), ma giustificabile sul punto di vista pragmatico (lo studio DCCT ha dimostrato che il buon controllo glicemico, valutabile sulla base delle misure di Hb A_{1c}, riduce il rischio di complicanze nel diabete di tipo 1; dallo studio DCCT è stato elaborato il primo algoritmo di stima della glicemia media dai valori di Hb A_{1c}). E' tuttora aperta la discussione se e quando il sistema di riferimento IFCC possa essere introdotto, soprattutto per l'inevitabile problema del cambio degli intervalli di riferimento, e non intendiamo in questa sede affrontare il problema che è complesso e che sarà sicuramente oggetto di almeno due o tre conferenze internazionali.

La prima applicazione pratica del nuovo sistema metrologico IFCC per la Hb A_{1c} è stata ciononostante illustrata al Congresso mondiale Wordlab 99 (19) con la presentazione di uno studio (*Florence II*) che si dovrebbe concludere entro la fine del 2000 e che vede coinvolti tutti i principali produttori di diagnostici per l'Hb A_{1c} ed una rete di laboratori di riferimento (10 laboratori tra Europa, Stati Uniti e Giappone). A studio completato sarà possibile conoscere, tra l'altro, le correlazioni tra il metodo di riferimento IFCC ed i metodi di routine, e definire fattori di allineamento per questi ultimi.

In attesa che i risultati delle metodiche di routine siano definitivamente armonizzati a livello di produzione è comunque indispensabile che chiunque misuri l'Hb A_{1c} tenga presenti le seguenti raccomandazioni.

1. Scelta della metodica. La riproducibilità totale della metodica deve essere, in termini di coefficiente di variazione, migliore del 3% ($CV_{tot} < 3.0\%$). Il dato può essere ricavato dai rapporti tecnici di valutazione o chiesto direttamente agli autori di questo documento. Generalmente le metodiche HPLC soddisfano tale criterio, mentre non tutte le metodiche immunochimiche riescono ad avere la riproducibilità desiderabile. Ci si accerti che la metodica non risente della eventuale interferenza da parte della frazione labile.

2. Risultato dell'analisi. I risultati delle analisi devono essere espressi in Hb A_{1c}% (equivalenti DCCT), abbandonando le altre unità di misura (GHb%, Hb A₁%). Gli utilizzatori di sistemi HPLC devono ispezionare attentamente ciascun cromatogramma per la possibile presenza di emoglobine varianti.

3. Calibrazione. La calibrazione deve essere fatta per tutte le metodiche, anche se per quelle HPLC ciò possa sembrare superfluo. In attesa della implementazione del sistema IFCC la calibrazione deve essere fatta con calibratori con titolo assegnato DCCT, in modo da poter ottenere risultati comparabili a quelli dello studio DCCT. I maggiori produttori di diagnostici offrono materiali di tale tipo, ai quali il titolo DCCT viene assegnato dalla rete internazionale di laboratori di riferimento. A riprova della bontà della calibrazione si effettui una verifica su un campione di soggetti sicuramente non diabetici (ad es. volontari di sangue abituali) al fine di provare che i risultati ottenuti cadano all'interno dell'intervallo di riferimento.

Sulla frequenza della calibrazione non vi è consenso unanime, soprattutto per le metodiche HPLC (20). Sicuramente va effettuata al cambio della colonna o del lotto di

reagenti. Si tenga presente che, nel caso di metodiche HPLC che separano la frazione labile, sovente il dato non calibrato ottenuto da tali metodiche è fortemente sottostimato (soprattutto per soggetti non diabetici) rispetto a quello risultante dopo la calibrazione. E' anche buona norma osservare che il fattore di calibrazione non cambi troppo ad ogni calibrazione, e che la qualità del cromatogramma sia stabile (attenzione alle modalità di integrazione ed alle aree).

4. Controllo interno di qualità. Ogni serie analitica deve comprendere misure su materiali di controllo, almeno a due livelli ed i risultati dei controlli devono essere analizzati prima della refertazione. Nel caso di sistemi HPLC è bene conservare anche i cromatogrammi dei controlli. Si raccomanda di utilizzare materiali separati per calibrazione e per il controllo interno della qualità, e di utilizzare delle regole (ad es. le regole di Westgard) per la valutazione dei risultati del CdQ.

5. Valutazione esterna di qualità. La partecipazione a programmi di valutazione esterna di qualità è sempre fortemente consigliata ed è il modo migliore per valutare la performance della metodica nel tempo, adottando quindi adeguate misure correttive nel caso in cui si riscontrino che i risultati ottenuti dalla propria metodica si discostino significativamente dal valore assegnato ai materiali. I migliori programmi di VEQ permettono di avere anche una stima reale della riproducibilità nell'arco di mesi, grazie a misure effettuate su aliquote diverse di medesimi campioni. Dal 1995 il gruppo intersocietario per la standardizzazione dell'Hb glicata coordina programmi nazionali di VEQ (21, 22), attualmente con l'elaborazione in tempo reale mediante Internet (23), con l'utilizzo di materiali di controllo di provata commutabilità e con valore assegnato DCCT.

6. Aggiornamento permanente. Non è tuttora chiaro se l'utilizzo di una metodica analitica di livello superiore quale quella presentata dalla IFCC possa aumentare il significato clinico della misura della Hb A_{1c}, per esempio ai fini diagnostici. Appositi esperimenti in corso dovrebbero permettere entro un anno circa di rispondere a tale quesito.

Sul fronte analitico alcune metodiche sono uscite dal mercato nel corso dell'anno o sono in fase di sostituzione ed altre ne stanno comparando (a livello di POC). Il gruppo di lavoro intersocietario è sempre a disposizione per fornire aggiornamenti in merito, e nell'ambito dei congressi nazionali delle rispettive società è possibile reperire le ultime novità.

RIFERIMENTI E BIBLIOGRAFIA

1. Roberts NB, Green BN, Morris M. Potential of electrospray mass spectrometry for quantifying glycohemoglobin. *Clin Chem* 1997;43:771-8.
2. Higgins PJ, Bunn HF. Kinetic analysis of the non-enzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1981;256:5204-8.
3. John WG. Glycated haemoglobin analysis. *Ann Clin Biochem* 1997;34:17-31.
4. 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 insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-86.
5. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardization of Hb A_{1c}/glycohemoglobin determinations. *JIFCC* 1996;9:62-7.
6. www.nccls.org.
7. Svendsen PA, Lauritzen T, Soegaard U, Nerup J. Glycosylated hemoglobin and steady-state mean blood glucose concentration in type I (insulin dependent) diabetes. *Diabetologia* 1982;23:403-5.
8. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984;310:341-6.
9. Anonymous. Diabetes care and research in Europe: the Saint Vincent declaration. *Diabetic Medicine* 1990;7:360.
10. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations 2000. *Diabetes* 2000;23(suppl. 1).
11. Garde AH, Hansen AM, Skovgaard LT, Christense JM. Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemo-globin A_{1c}, IgA, prolactin, and free testosterone in healthy women. *Clin Chem* 2000; 46:551-9.
12. Sebastiàn-Gàmbaro MA, Liròn-Hernadèz FJ, Fuentes-Arderiu X. Intra- and inter-individual biological variability data bank. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:845-52.
13. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Jimenèz CV, Minchinela J, Perich

- C, Simòn M. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
14. Brambilla S, Pagani A, Luraschi P, Infusino I, Franzini C. Variabilità biologica intra- ed inter-individuale: aggiornamento. *Biochim Clin* 2000, in corso di stampa.
 15. Franzini C. Requisiti qualitativi auspicabili per le prestazioni rese dal laboratorio di bio-chimica clinica. *Biochim Clin* 1998;22:42-7.
 16. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* 1999;45:321-3.
 17. Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A_{1c} based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997;43:1944-51.
 18. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema C, Jeppsson JO. Preparation of a candidate primary reference material for the International standardisation of Hb A_{1c} determinations. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:299-308.
 19. IFCC-SD working group on standardization of Hb A_{1c} glycohemoglobin, closed meeting, June 7, 1999, IFCC-Worldlab, Firenze.
 20. Gerlo E, Gorus F. Calibration of ion-exchange HPLC measurements of glycohemoglobin: effect on interassay precision. *Clin Chem* 1997;43:2353-7.
 21. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Capani F, Pagano G, Plebani M. A reevaluation of glycohemoglobin standardization: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:243-8.
 22. Mosca A, Paleari R. Standardizzazione dell'emoglobina glicata: rapporto sugli ultimi tre anni di attività. *Biochim Clin* 1998;22:645-9.
 23. www.glicata.org