

HbA1c : ASPECTS TECHNIQUES

COMPARAISON DES METHODES DE DOSAGE

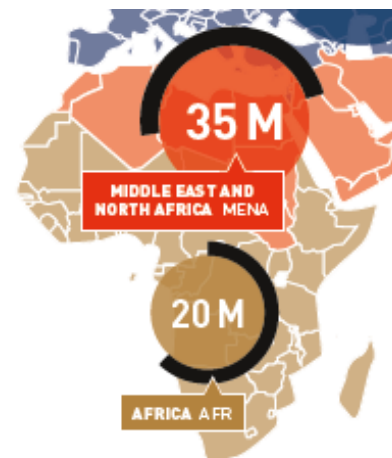
INTERET DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI

DU TAUX DIABETE SUCRE

Pr Marc VASSE
Hôpital Foch – Suresnes
UFR Pharmacie – Paris XI



- ❖ 382 M dans le monde (2013) dont 1,4 M au Maroc
- Prévalence mondiale : **6.6%**
- 2035 : 592 M (+ **55%**)
 - ▶ Augmentation rapide : pays en voie de développement
 - ▶ Diminution : pays industrialisés (prévention, l'accessibilité des moyens de santé...)
- Les facteurs :
 - ▶ vieillissement de la population,
 - ▶ changement de mode de vie,
 - ▶ augmentation de la population,
 - ▶ accessibilité du test grâce à un prix abordable...



- ❖ Un risque sous estimé:
 - **46 %** des patients diabétiques ne sont pas identifiés
 - 316 M de patients avec une intolérance au glucose risquent d'évoluer en diabète

=> Index rétrospectif et cumulatif de l'équilibre glycémique au cours des 4 à 8 semaines précédant le prélèvement

⇒ Peut être effectuée à n'importe quel moment de la journée vs glycémie

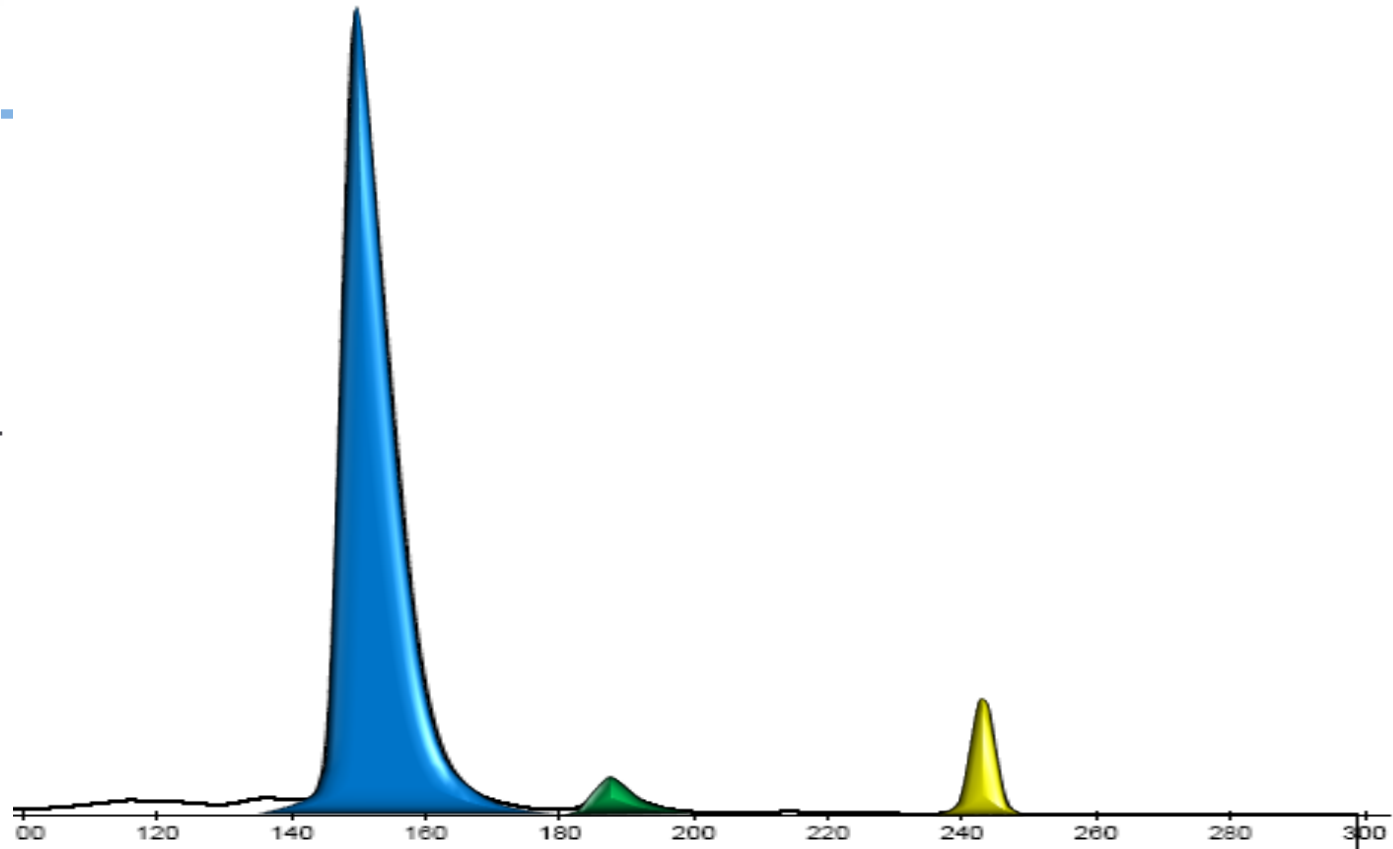
Il a clairement été établi les relations entre augmentation d'HbA1c et la survenue de complications du diabète sucré

Une Baisse de 1% du taux d'hémoglobine glyquée diminue les risques de :

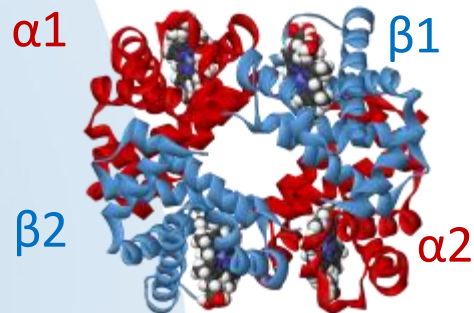
- Infarctus : de **14%**
- Maladies Cardio vasculaires : **37 %**
- Amputations : 43%

• L'association Américaine du Diabètes (ADA)

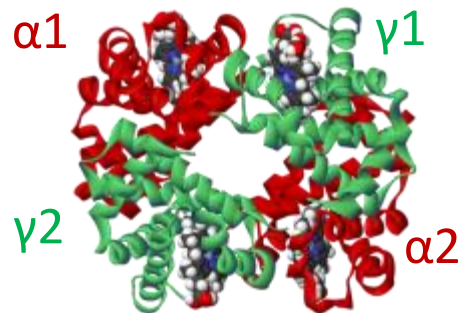
- Hb A1c = 6,5% (diagnostic)
- HbA1c = 5,7% - 6,4% (prédiabétiques)



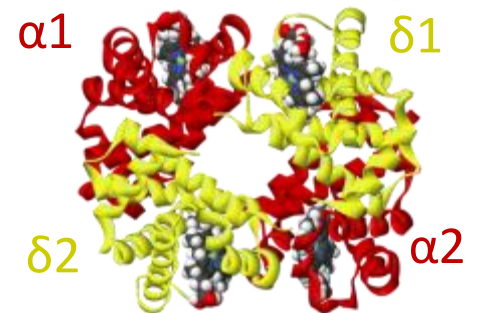
Hb A > 96,5%



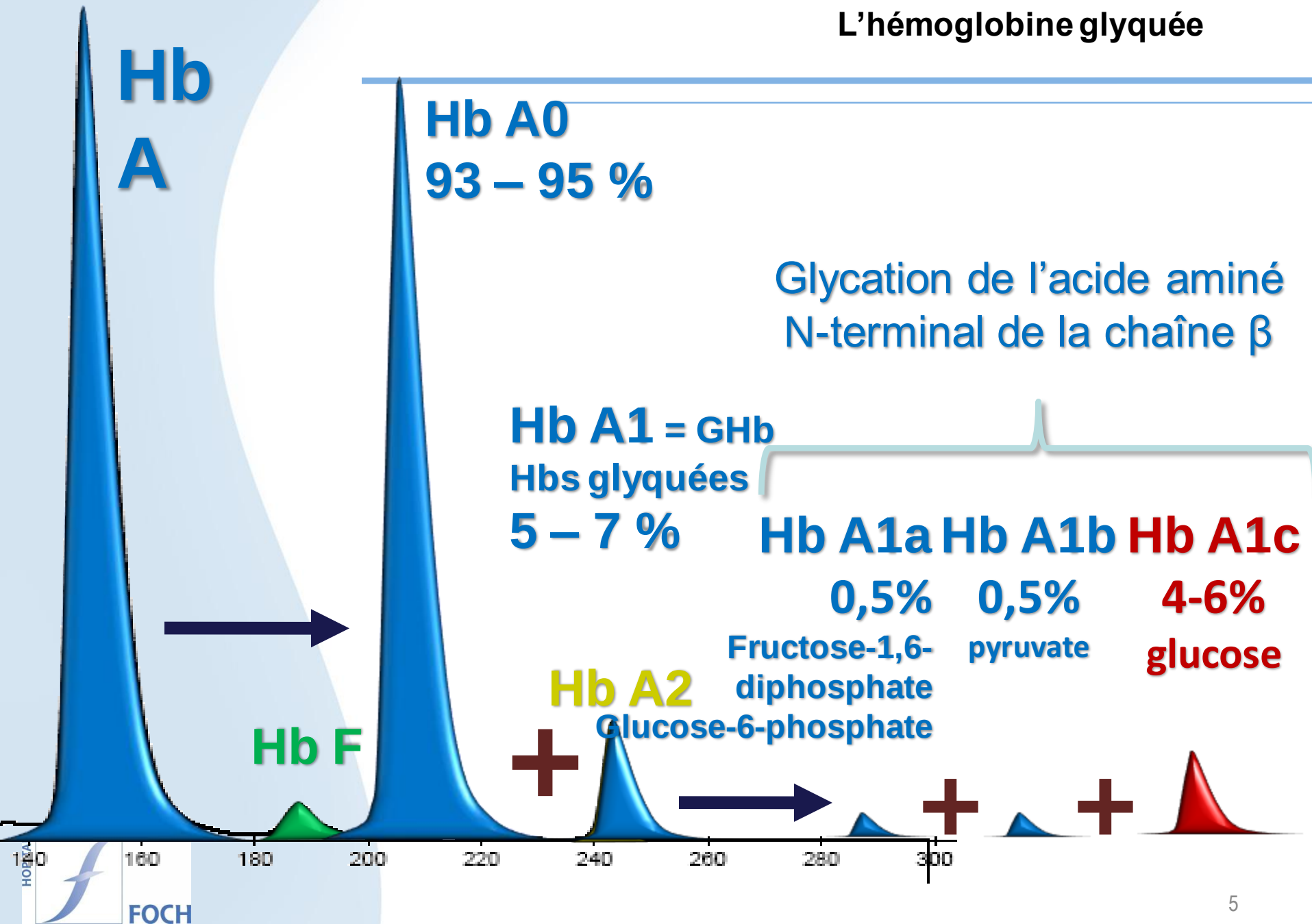
Hb F < 1%



Hb A2 < 3,5%



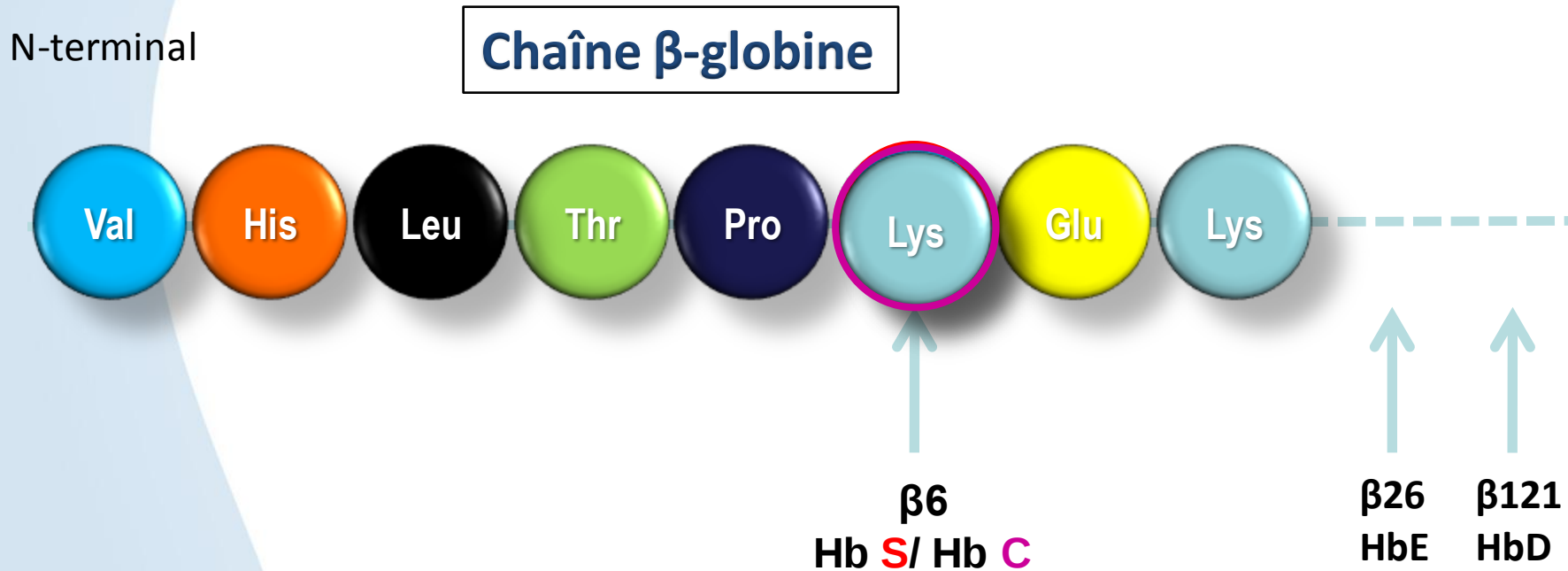
L'hémoglobine glyquée



**L'HbA1c est
le produit stable
de la fixation non-enzymatique
du glucose sur l'extrémité N-
terminale de la chaîne β de
l'hémoglobine A0 ($\alpha_2\beta_2$)**

$$\text{\% HbA1c} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{HbA1c} + \text{HbA0}}$$

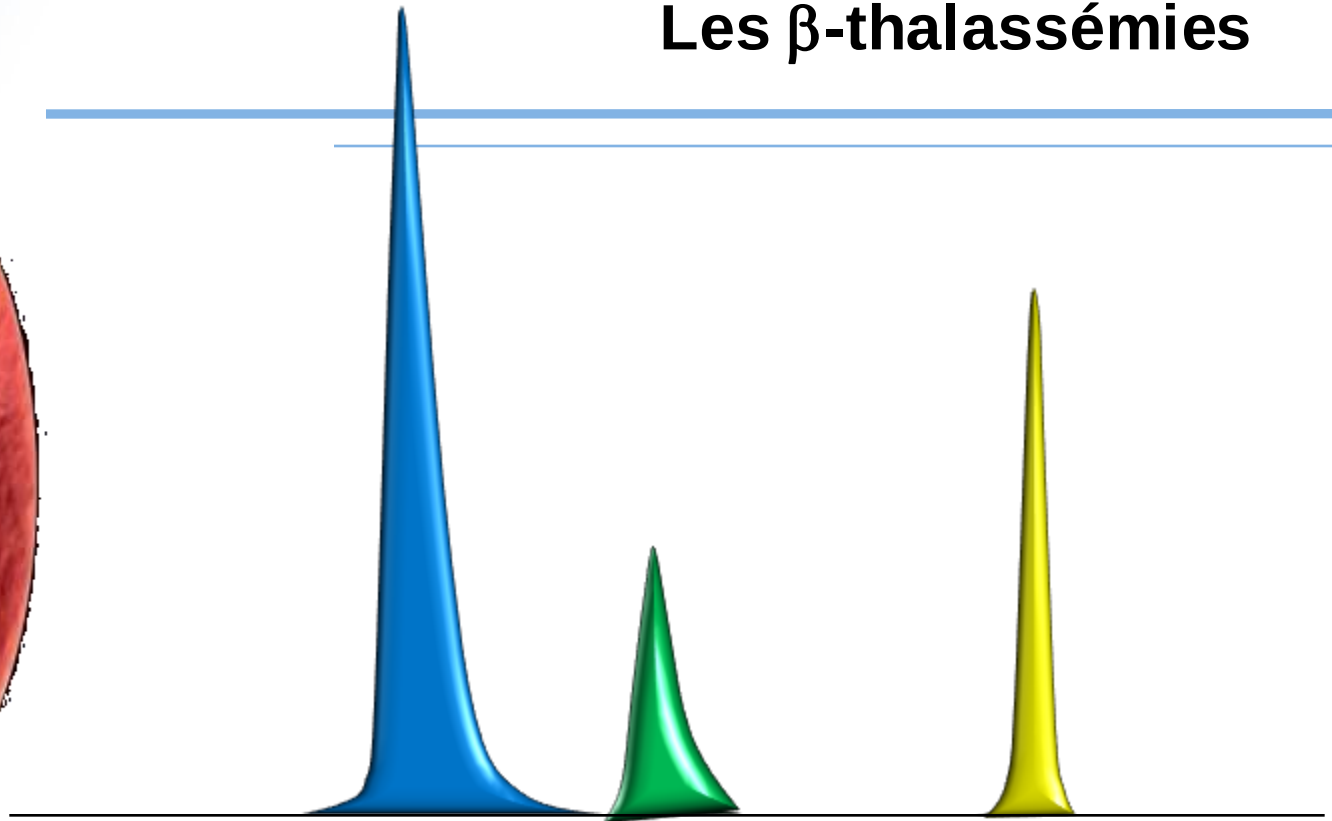
LE PROBLEME : LES ANOMALIES DE L'HEMOGLOBINE



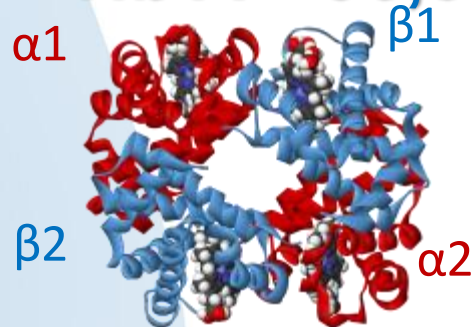
Fréquence estimée de l'Hb S : 15 à 25 % en Afrique Centrale et de l'Ouest

Fréquence estimée de l'Hb C : 1 à 10 % en Afrique du Nord
20 à 50 % en Afrique de l'Ouest

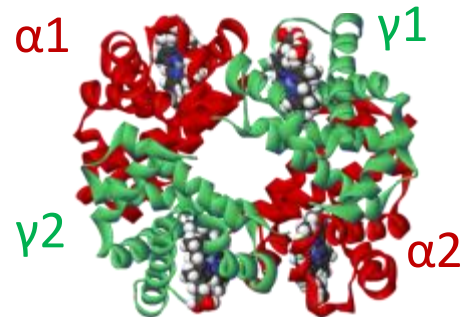
Les β -thalassémies



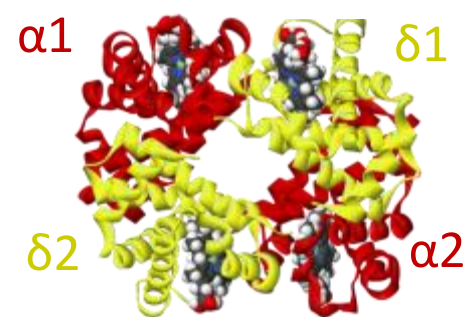
Hb A > 96,5%



Hb F



Hb A2



The relationship between anemia, fecal stercobilinogen, erythrocyte survival, and globin synthesis in heterozygotes for beta-thalassemia

E Gallo, P Pich, G Ricco, G Saglio, C Camaschella and U Mazza

Table 2. Red Cell Life Span, Stercobilinogen Excretion, and Globin Chain Synthesis Ratio in β -thalassemia Heterozygotes

Case	Hb (g/100 ml)	Fecal Stercobilinogen (mg per g Hb per day)	$t \frac{1}{2}$ (days)	α/β -chain Synthesis Ratio	
				Peripheral Blood	Bone Marrow
1	11.4	0.70	22	1.56	1.11
2	8.6	1.40	22	1.76	—
3	11.5	0.41	21	1.40	0.97
4	11.6	0.47	24	1.52	1.05
5	8.0	1.40	21	1.60	—
6	9.2	1.00	22	2.00	0.99
7	12.0	0.35	23	1.50	1.09
8	7.5	1.55	21	1.90	—
9	8.9	1.20	23	2.08	1.10
10	9.6	1.04	23	2.10	—

Red cell life span ($t \frac{1}{2}$) ranged from 21 to 24 days (normal values, 28–31 days).

La durée de vie des GR chez les patients beta-thal hétérozygotes varie
de 81 à 93 jours

RBC lifespan with Hb variant

Hb Variant	Avg. RBC Lifespan in Days (n)
HbSS	17 (10)
HbSC	28 (14)
HbCC	29 (7)
HbS- β Thal	75 (2)
HbAC	82 (9)
HbAS	93 (3)
Wild-type	120

Lancet. 1943

Blood. 1969

Blood. 1970

Blood. 1975

Effets de la durée de vie des GR sur l'HbA1c

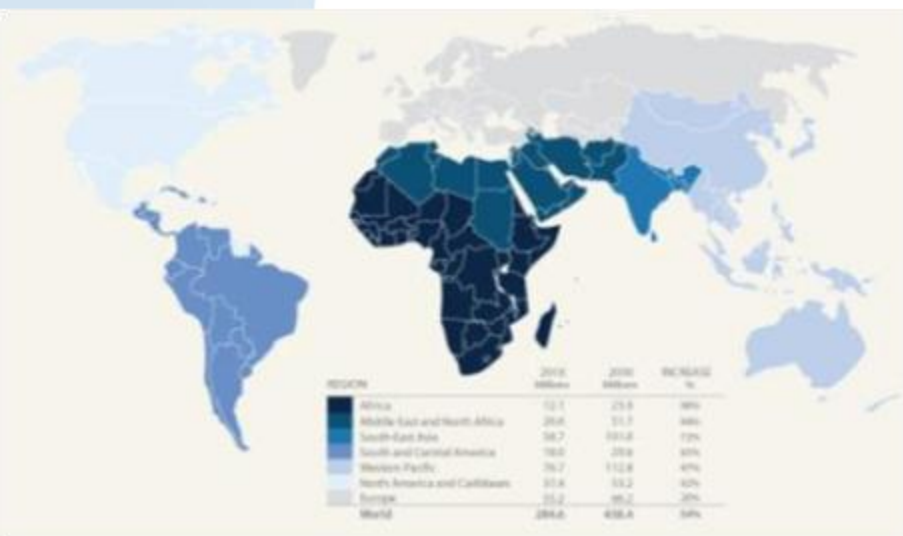
- Durée de vie des GR varie de 100 à 140 jours
(Moyenne : 120 ± 10 j)
- Si HbA1c à 7,0% avec une durée de vie de 120 jours
 - 110 jours = 6,4%
 - 130 jours = 7,6%



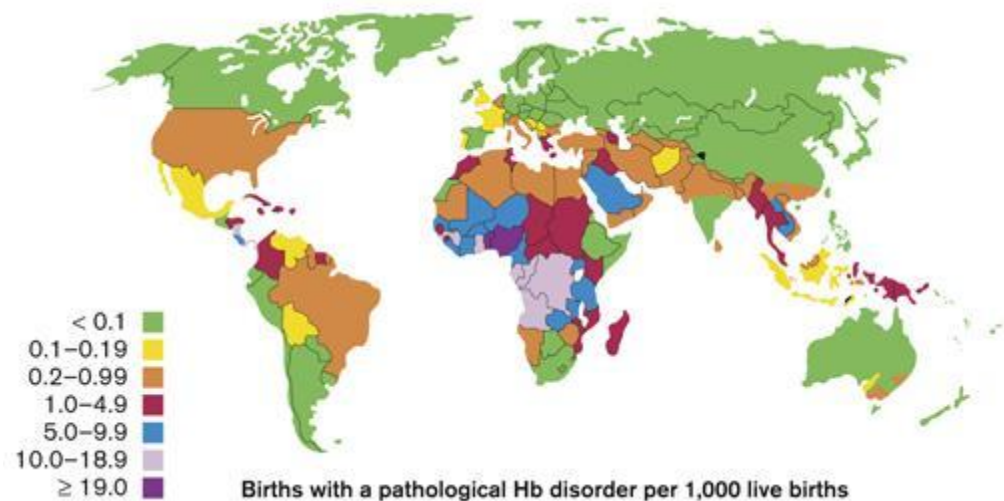
**Importance de diagnostiquer les anomalies asymptomatiques
de l'hémoglobine pour l'interprétation de l'HbA1c**

LE PROBLEME : LES ANOMALIES DE L'HEMOGLOBINE

Prevalence du diabète et anomalies de l'hémoglobine



Évolution du diabète 2000 – 2030



Prévalence des troubles de
l'hémoglobine
pour 1000 naissances

Sources : NEJM 356; 213 & World Health Organization 2008 and IDF 2010

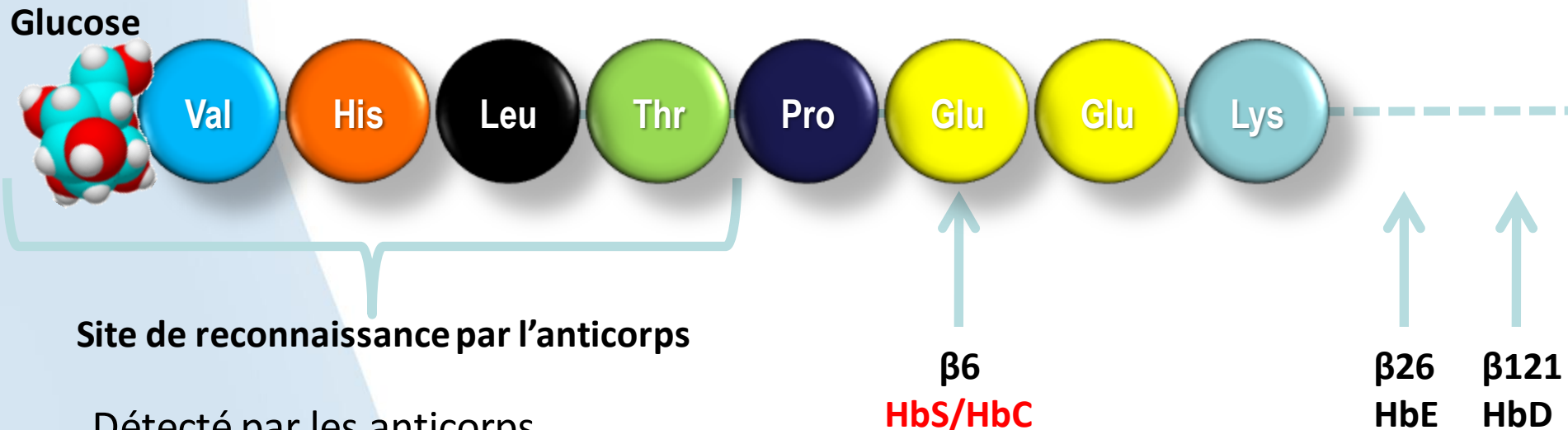


Immuno-essai: ce qui est mesuré

Utilisation d'**anticorps monoclonaux ou polyclonaux** dirigés contre l'**extrémité N-terminale glyquée (4-10 derniers Acides Aminés) de la chaîne β de l'HbA**

N-terminal

Chaîne β -globine

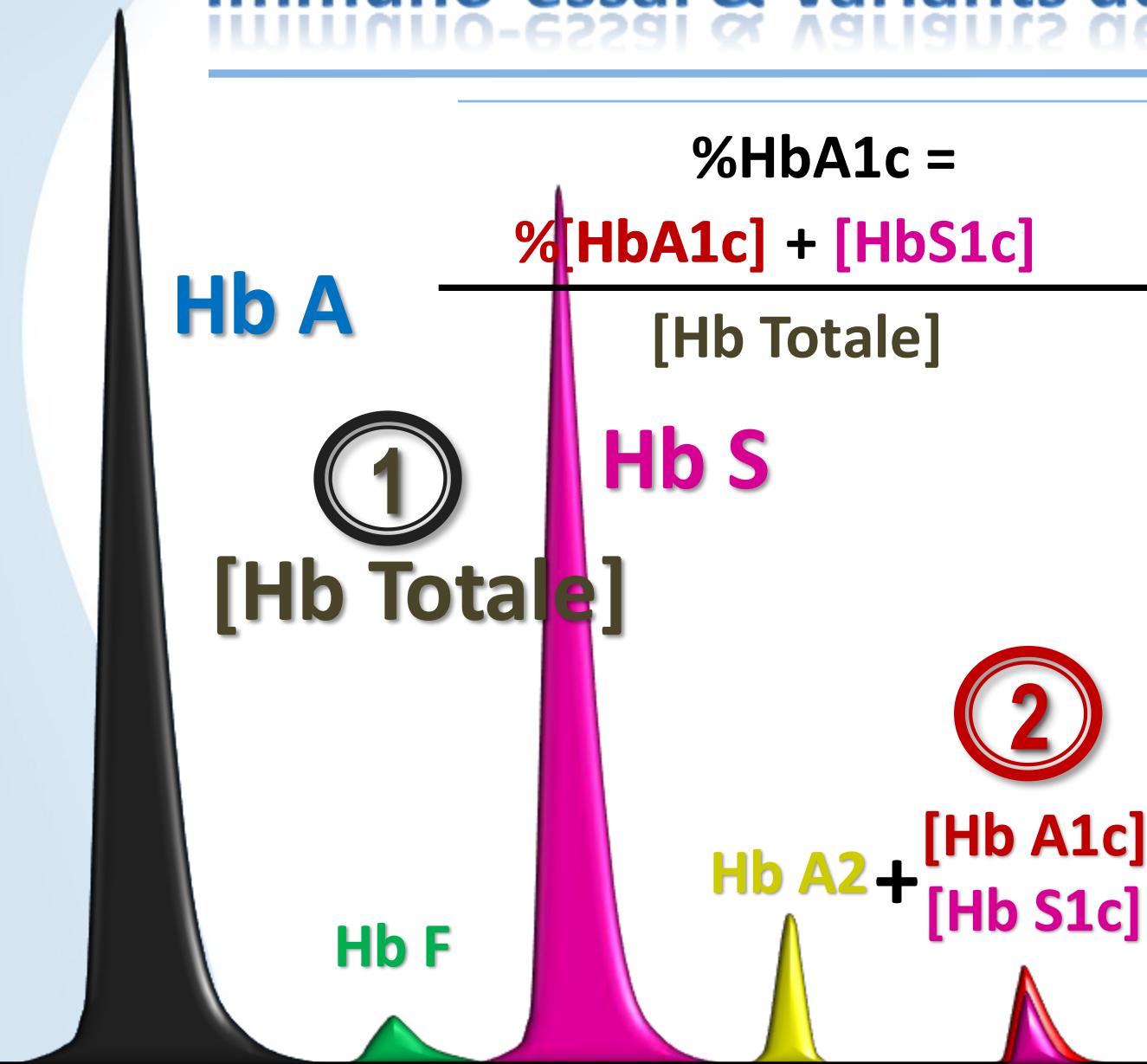


Détecté par les anticorps

- HbA1c ($\alpha 2\beta 2$): OUI
- HbF glyquée ($\alpha 2\gamma 2$): NON
- HbA2 glyquée ($\alpha 2\delta 2$): OUI
- HbX1c ($\alpha 2\beta 2$): OUI (X= S, C, D, E)



Immuno-essai & Variants de l'Hb



Immuno-essai et les dangers des variant Hb S/S, S/C

Variant Hb	Hb A _{1c} (%)		
	Roche	Trinity	Siemens
SC	4.7	4.9	6.3
SC	4.3	4.7	6.1
SC	4.3	4.1	5.6
SC	4.6	4.5	6.0
SC	4.6	4.3	5.5
SS	4.6	3.3	4.0
SS	4.4	3.1	3.9
SS	5.1	4.0	4.5
SS	4.4	3.1	4.0
SS	4.2	3.9	4.7
S β-thal	4.6	4.9	4.2
S β-thal	5.3	5.3	5.8
S β-thal	5.4	6.7	7.3
S β-thal	5.1	5.4	6.3
S β-thal	4.5	4.7	5.4



**Une valeur HbA_{1c}
est rendue en
l'absence complète
d'HbA**

Extrait de HbA_{1c}: What should we know?

Ross J. Molinaro; January 2013



HPLC & Hb Variant

NOM
FP

A1A

A1B

F

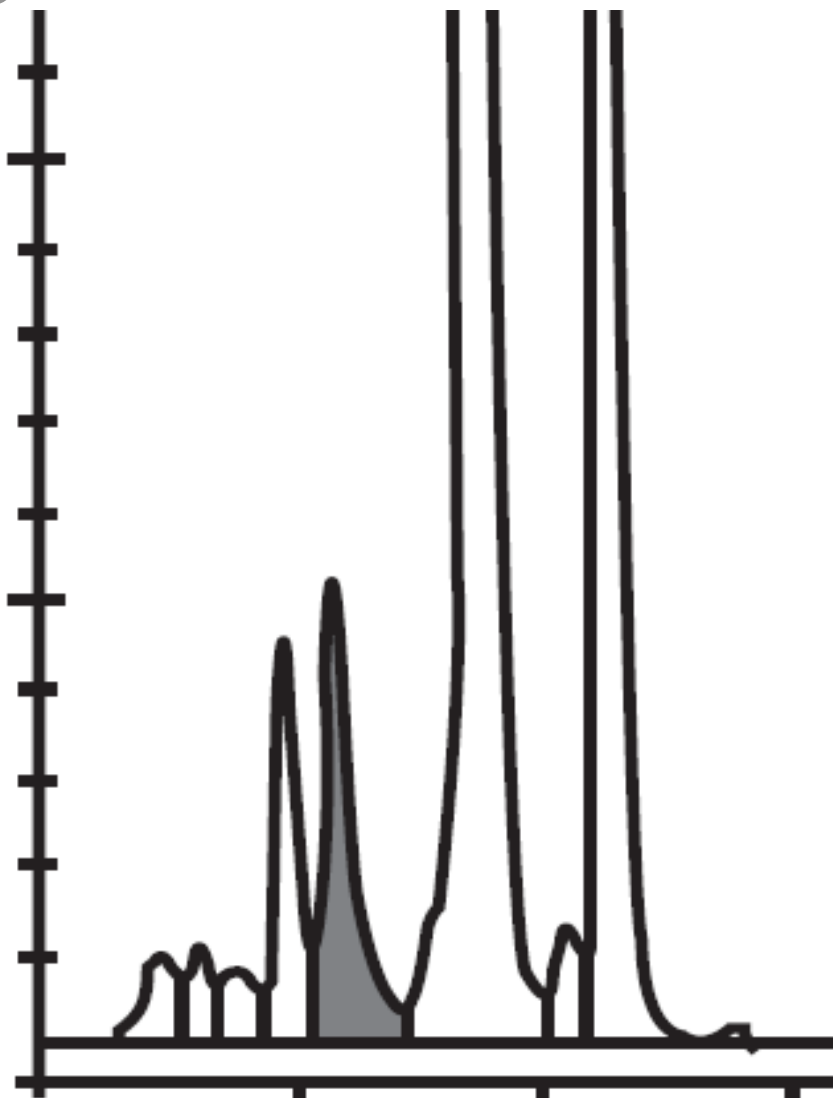
LA1C+

SA1C

A0

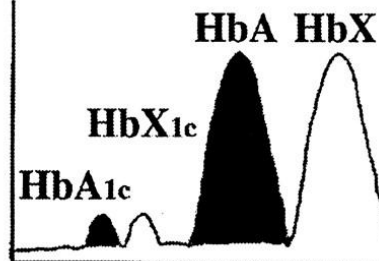
HbA1

HbA1



CHATELAIN 2006, 2013 - Guillaume FRANC

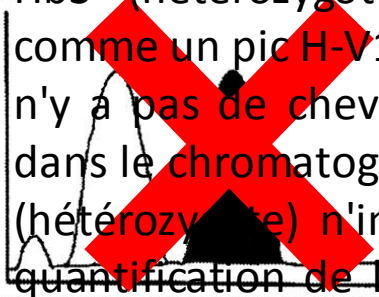
B



Separation of HbA from HbX and HbA1c from HbX1c
Normal estimation of %HbA1c

C

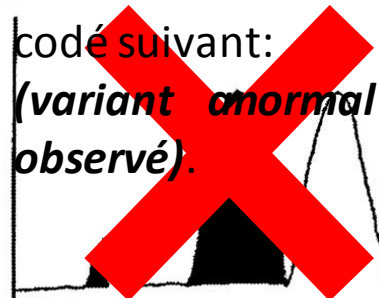
HbS (hétérozygote) - HbS apparaît comme un pic H-V1 après le pic A0 et il n'y a pas de chevauchement observé dans le chromatogramme qui suit la quantification de l'HbA1c. Reporter le



HbX elutes with HbA1c
Overestimation of %HbA1c

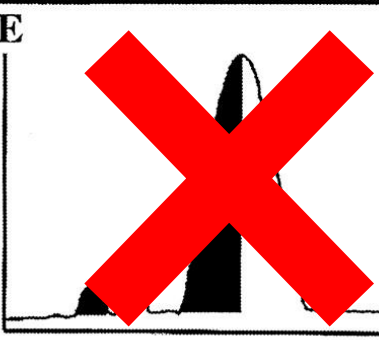
D

Résultat d'HbA1c avec le commentaire codé suivant:
(variant normal observé).



HbX1c elutes with HbA1c
Overestimation of %HbA1c

E



HbX1c separates from HbA1c while HbX co-elutes with HbA
Underestimation of %HbA1c

HPLC et variants d'hémoglobine

Comparison of analytical interferences on HbA_{1c} measurement by two high pressure liquid chromatography analyzers

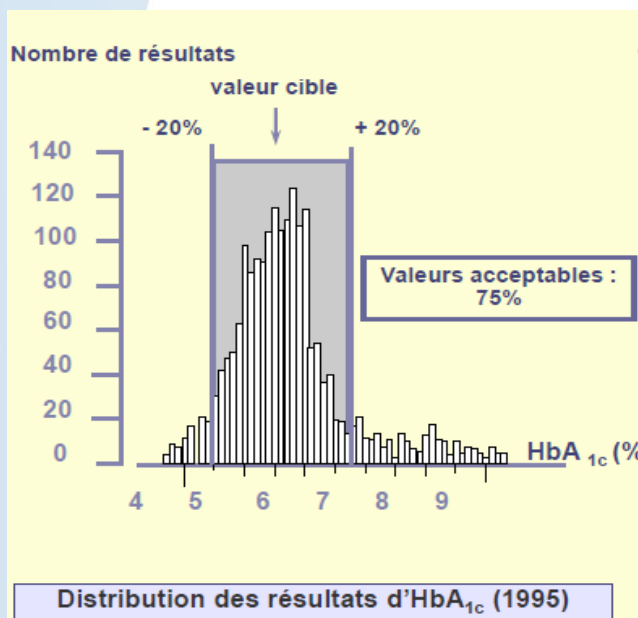
S. Jaisson, E. Guillard, N. Leroy, P. Gillery

Ann Biol Clin 2011; 69 (1) 63-9

	Variant d'Hb (% Hb totale)	HbA _{1c} (%)	
		G8	Variant II
Échantillon 1	HbC (35 %)	6,1	6,2
Échantillon 2	HbC (39 %)	5,5	5,6
Échantillon 3	HbC (36 %)	7,4	5,9
Échantillon 4	HbD (39 %)	6,2	6,6
Échantillon 5	HbS (36 %)	5,1	5,2
Échantillon 6	HbS (28 %)	5,9	6,2
Échantillon 7	HbS (40 %)	6,9	8,3
Échantillon 8	HbS (34 %)	6,3	7,0

Standardisation du dosage de l'HbA1c

Méthodes de références de l'IFCC



INTERNATIONAL FEDERATION
OF CLINICAL CHEMISTRY (IFCC)



Groupe de travail

Blood



Erythrocytes



Hemolysate



Enzymatic
cleavage



Quantify specific
peptides



Method A
HPLC - Mass
Spectrometry

Method B
HPLC-Capillary
Electrophoresis

Méthodes de reference, IFCC

Clin Chem Lab Med 2002; 40(1):78–89 © 2002 by Walter de Gruyter · Berlin · New York

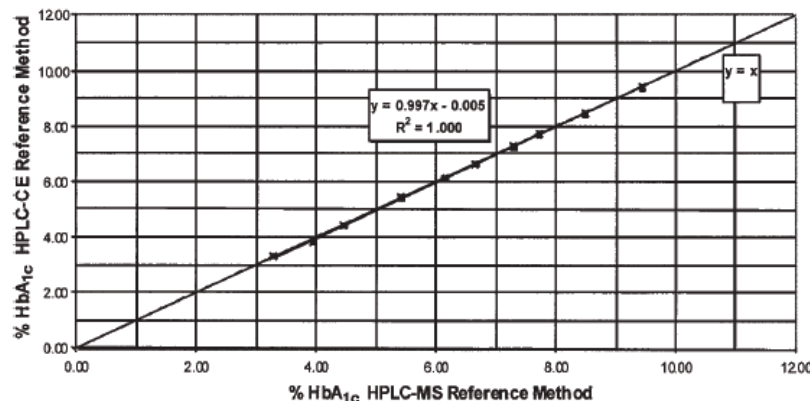
Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA_{1c} in Human Blood

IFCC 2002/1

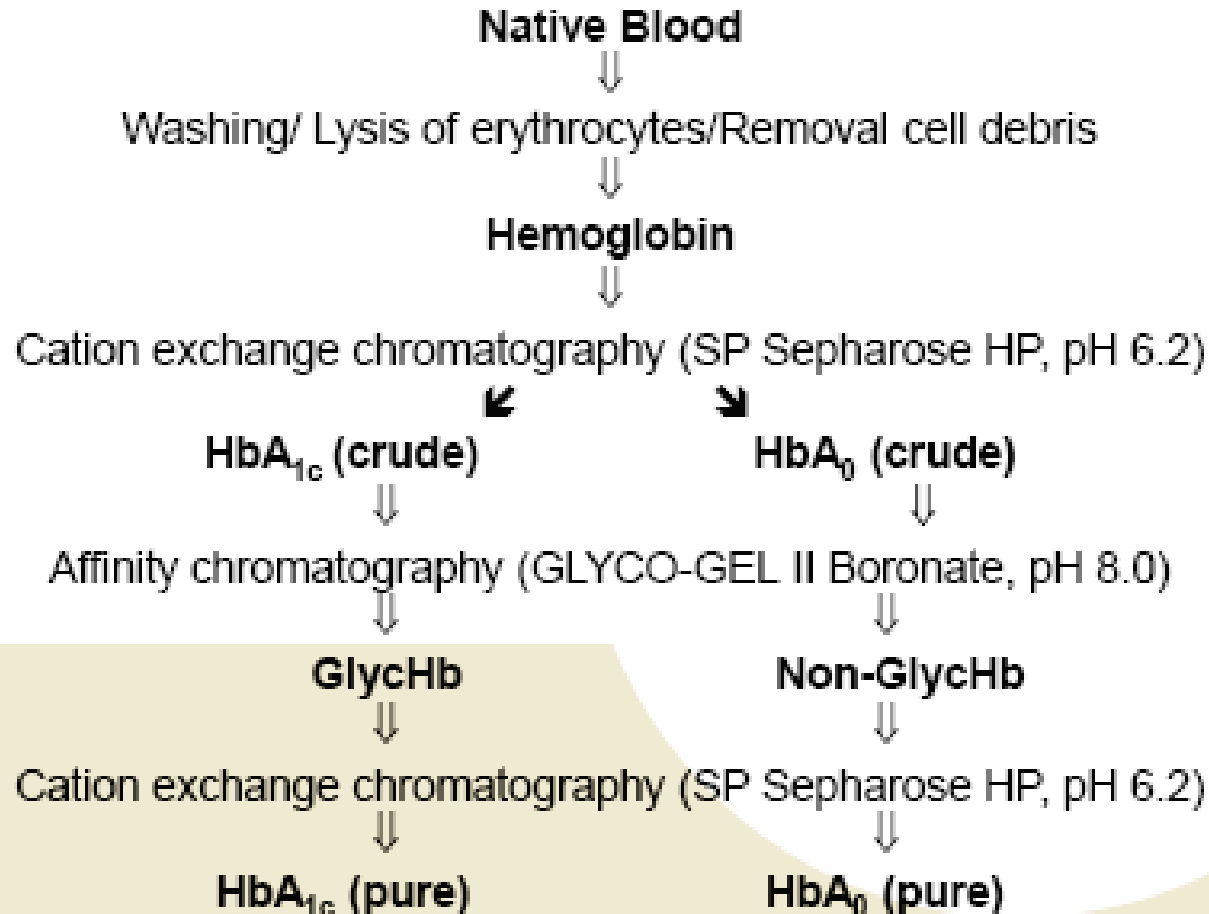
HPLC methods often used as “reference method” for the standardisation of routine tests provide good precision and long-term stability but they are rather unspecific. Different values for HbA_{1c} can be obtained when the same blood samples are measured, depending on the chromatographic system, *e.g.* the kind of resin, lot-to-lot variation of resins, column size, buffer composition and elution times. The peak considered to be HbA_{1c}

4. HPLC separation and capillary electrophoresis

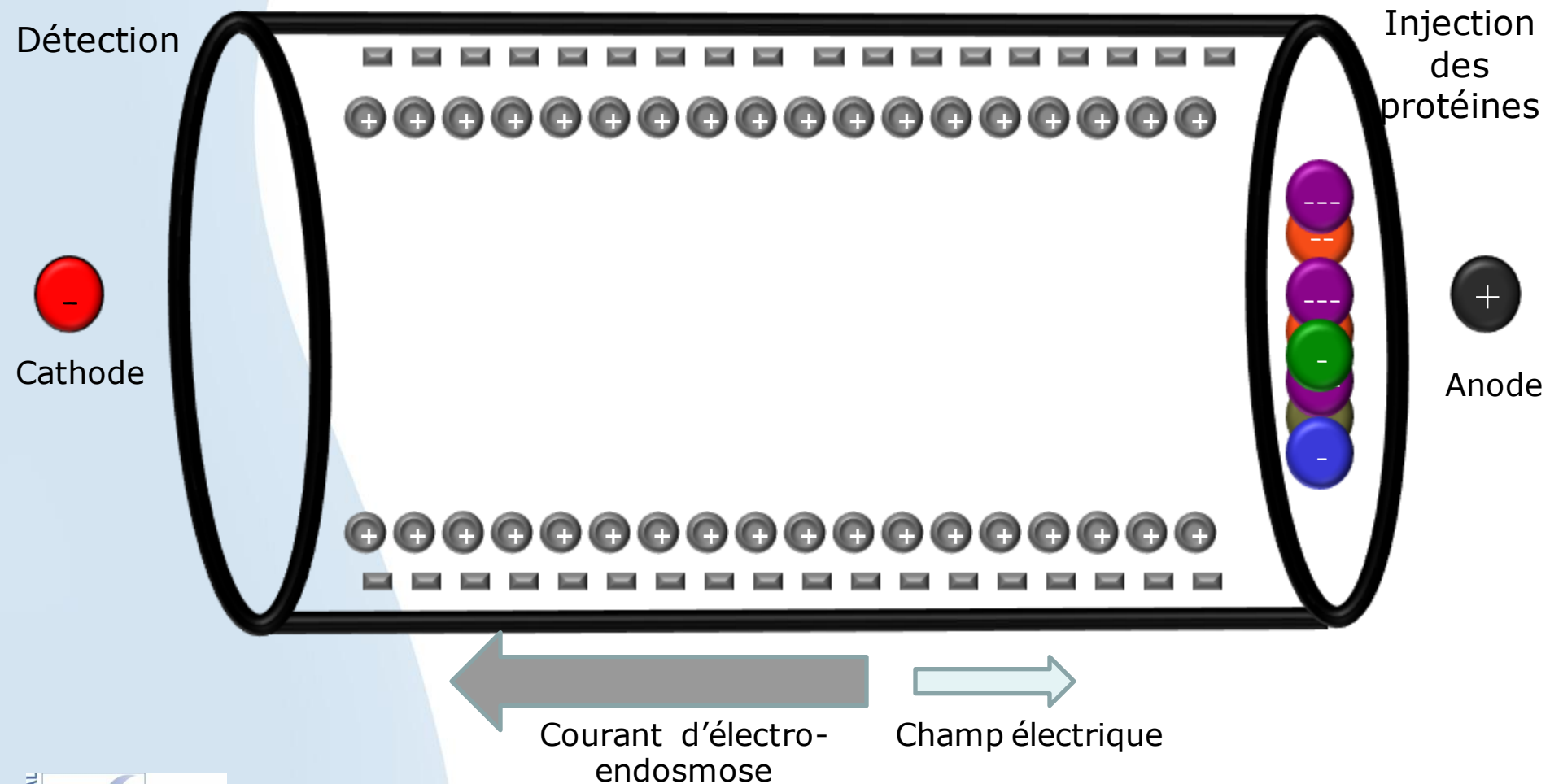
Glycated and non-glycated β -N-terminal hexapeptides co-eluted together on the C₁₈ column used. This step was used for an enrichment of these peptides. The In a second step, capillary electrophoresis was introduced which separated the C₁₈ fraction into two major separated peaks and some minor impurities (Figure 9). MS approach, using the same calibrators. The HPLC-CE approach generates identical results when the mean values from reference laboratories which use the HPLC-CE method are compared with those of reference laboratories which use the HPLC-MS method (Figure 10).



Préparation du calibrant IFCC



Principe de l'électrophorèse capillaire



Le courant d'électro-endosmose (EOF) est une force plus importante que celle du champ électrique. De ce fait, toutes les protéines sont transportées vers l'extrémité cathodique du capillaire



L'Hôpital Foch – Suresnes - France

- Un des principaux ESPIC (Etablissement de Soin Privé à Intérêt Collectif) d'Île de France
- 560 lits :
 - 275 lits de Médecine
 - 194 lits de chirurgie
 - 66 lits d'obstétrique
 - 49 lits de réanimation et soins intensifs
 - 57 places ambulatoires
- 260 000 consultations externes / 44 000 passages aux urgences
- 45 000 hospitalisations
- 117 transplantations dont 56 poumons et 61 reins en 2012

⇒ **Traitements immunosuppresseurs et diabètes acquis**

CAPYLLARYS 2 Flex Piercing depuis novembre 2011

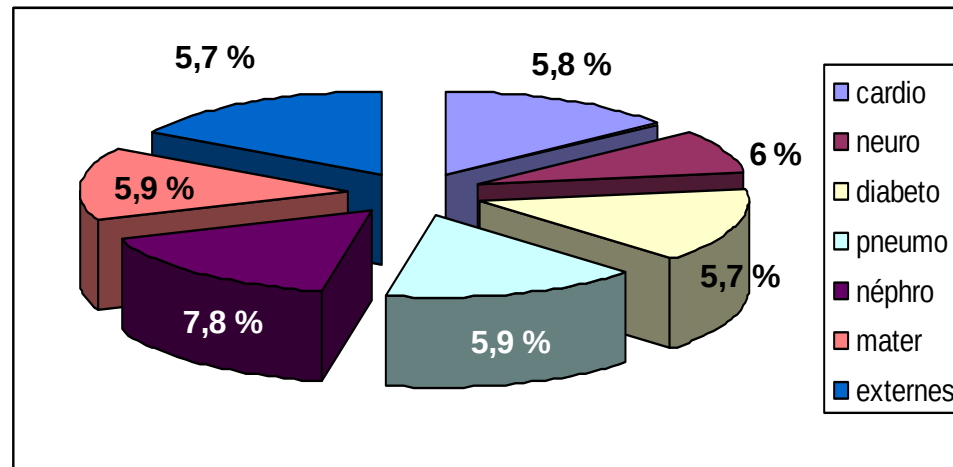


Capillary 2 Flex Piercing

- Agitation par basculement
- Perçage sur tubes fermés



Activité HbA1c

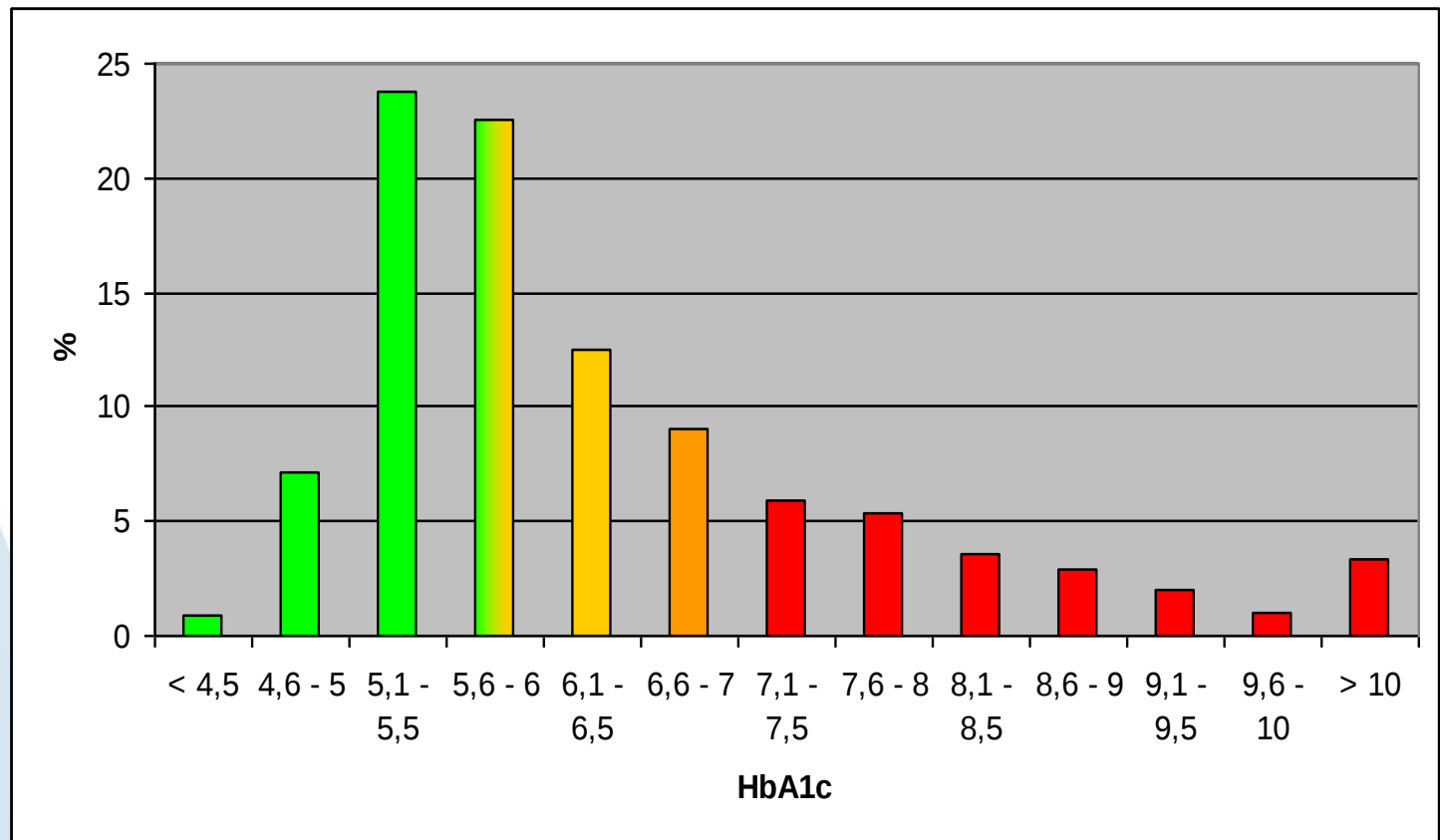


Valeur médiane d'HbA1c en fonction du service

- 5722 mesures d'HbA1c en 2013
- Initialement : 3 séries/semaine,
- Depuis juillet 2013 : 1 série par jour $\Rightarrow$ 25/série
- Temps moyen pour 1 série
 - Contrôle interne (8 capillaires) : 20 minutes
 - par rack : 20 minutes

En général, 1h20 /jour

Répartition des taux d'HbA1c

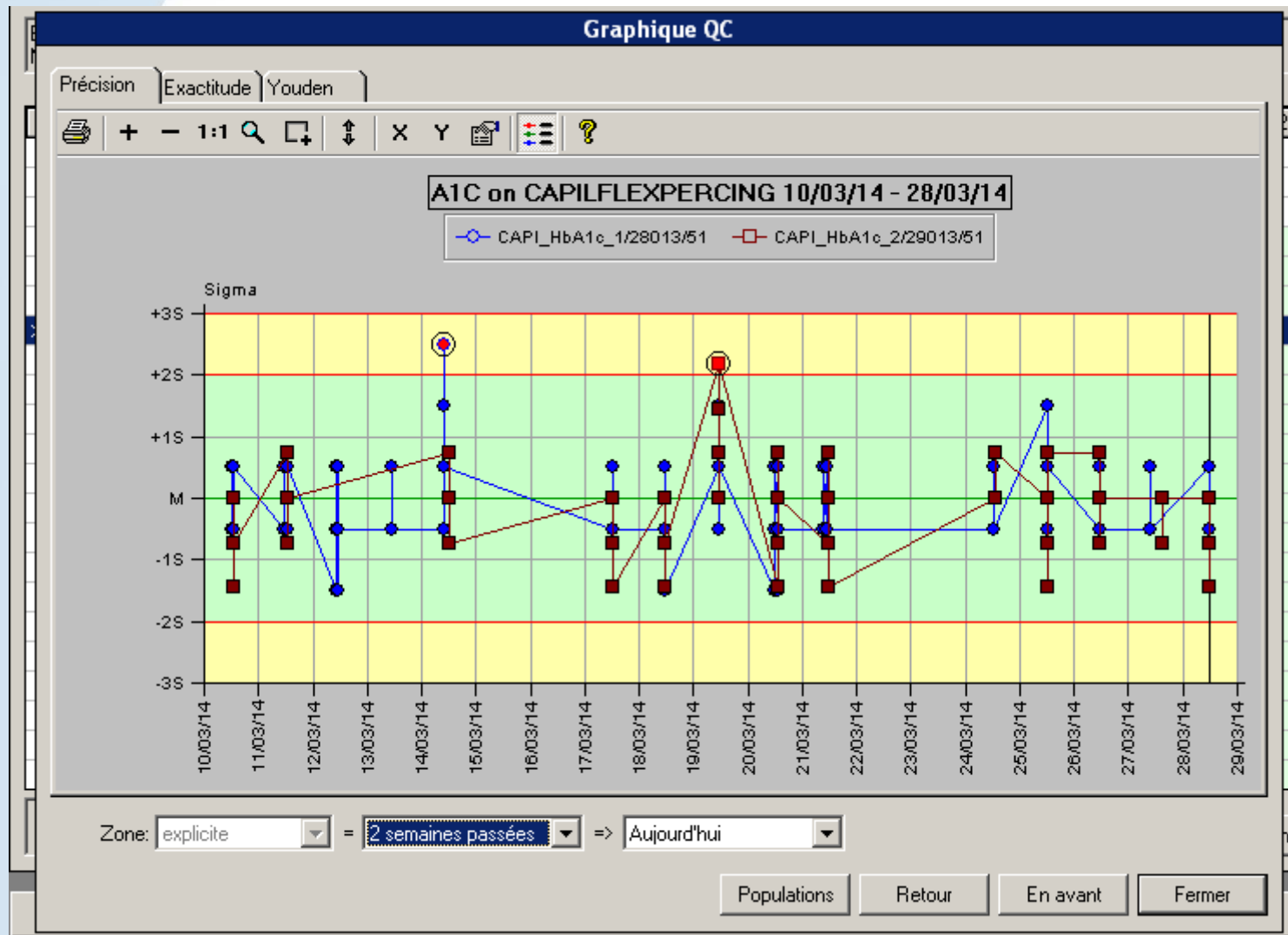


Contrôles de qualité interne : répétabilité, reproductibilité

Résultats							
A1C on CAPILFLEXPERCING using CAPI_HbA1c_1/28013/51							
Equipe	Entré à	Valeur	Alr	Eta	Commentaire externe	R	d
0331-1	31/03/14 13:46	5.4 %	0	Val			
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val			
0331-1	31/03/14 13:46	5.4 %	0	Val			
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val			
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val			
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val			
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val			
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.4 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.4 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val			
0328-1	28/03/14 11:49	5.4 %	0	Val			

Résultats								
A1C on CAPILFLEXPERCING using CAPI_HbA1c_2/29013/51								
Equipe	Entré à	Valeur	Alr	Eta	Commentaire externe	Raison discontinuation	Obs. a	
0331-1	31/03/14 14:08	8.2 %	0	Val			non	
0331-1	31/03/14 14:08	8.2 %	0	Val			non	
0331-1	31/03/14 14:08	8.1 %	0	Val			non	
0331-1	31/03/14 14:08	8.2 %	0	Val			non	
0331-1	31/03/14 14:08	8.2 %	0	Val			non	
0331-1	31/03/14 14:08	8.4 %	0	Val			non	
0331-1	31/03/14 14:08	8.1 %	0	Val			non	
0331-1	31/03/14 14:08	8.4 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.2 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.3 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.3 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.1 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.3 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.2 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.2 %	0	Val			non	
0328-1	28/03/14 11:53	8.1 %	0	Val			non	

Contrôles de qualité interne : reproductibilité



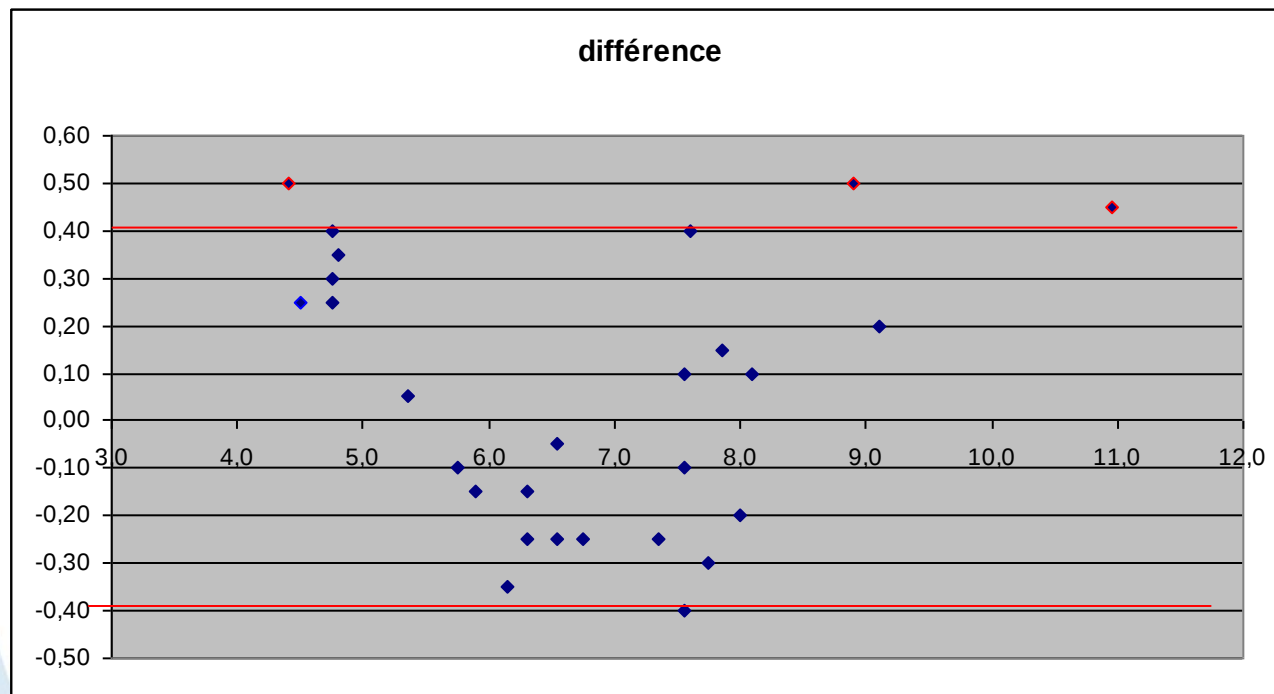
Comparaison reproductibilité CQI méthode Immuno *versus* Capiyllaris

Résultats						
A1C on RXL2_BACKUP using B_RXL2_HBA1C1/DBCL10041						
Equipe	Entré à	Valeur	Alr	Eta	Commentaire externe	
0318-1	18/03/09 10:03	5.9 %	0	Val		
0316-1	16/03/09 10:11	5.6 %	0	Val		
0315-1	15/03/09 08:50	5.9 %	0	Val		
0314-1	14/03/09 14:02	5.9 %	0	Val		
0311-1	11/03/09 10:28	5.7 %	0	Val		
0311-1	11/03/09 08:33	5.7 %	0	Val		
0309-1	09/03/09 16:48	5.8 %	0	Val		
0309-1	09/03/09 08:47	6.5 %	0	Val		
0212-1	12/02/09 10:14	6.4 %	0	Val		
0211-1	11/02/09 14:32	6.4 %	0	Val		
0211-1	11/02/09 09:00	6.4 %	0	Val		
0206-1	06/02/09 09:38	6.6 %	0	Val		
0204-1	04/02/09 10:03	6.3 %	0	Val		
0202-1	02/02/09 11:21	6.5 %	0	Val		
0129-1	29/01/09 09:39	6.5 %	0	Val		
0128-1	28/01/09 12:54	6.6 %	0	Val		

Résultats						
A1C on CAPILFLEXPERCING using CAPI_HbA1c_1/28013/51						
Equipe	Entré à	Valeur	Alr	Eta	Commentaire externe	Raison discontinuation
0331-1	31/03/14 13:46	5.4 %	0	Val		non
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val		non
0331-1	31/03/14 13:46	5.4 %	0	Val		non
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val		non
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val		non
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val		non
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val		non
0331-1	31/03/14 13:46	5.3 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.4 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.4 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.3 %	0	Val		non
0328-1	28/03/14 11:49	5.4 %	0	Val		non

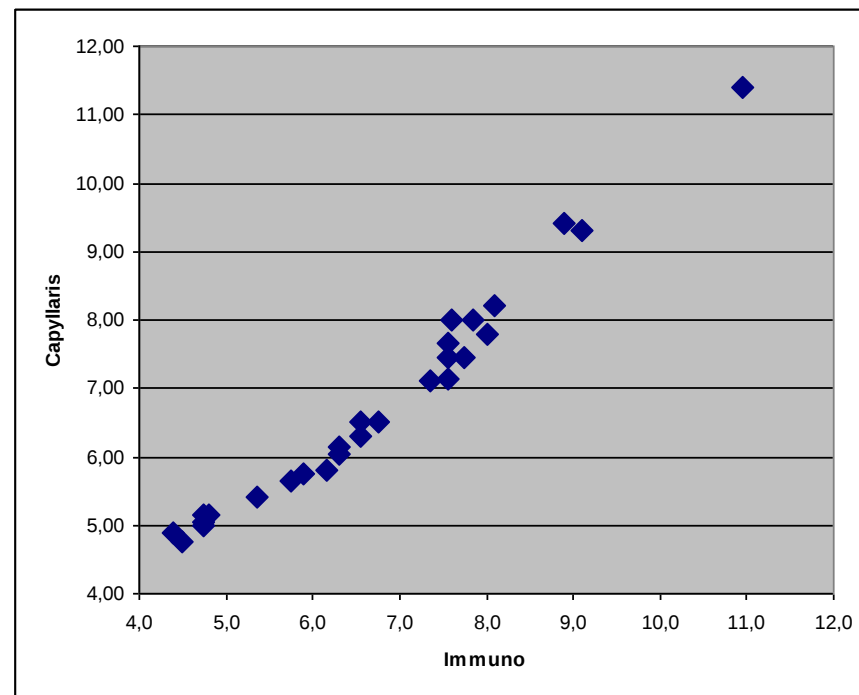
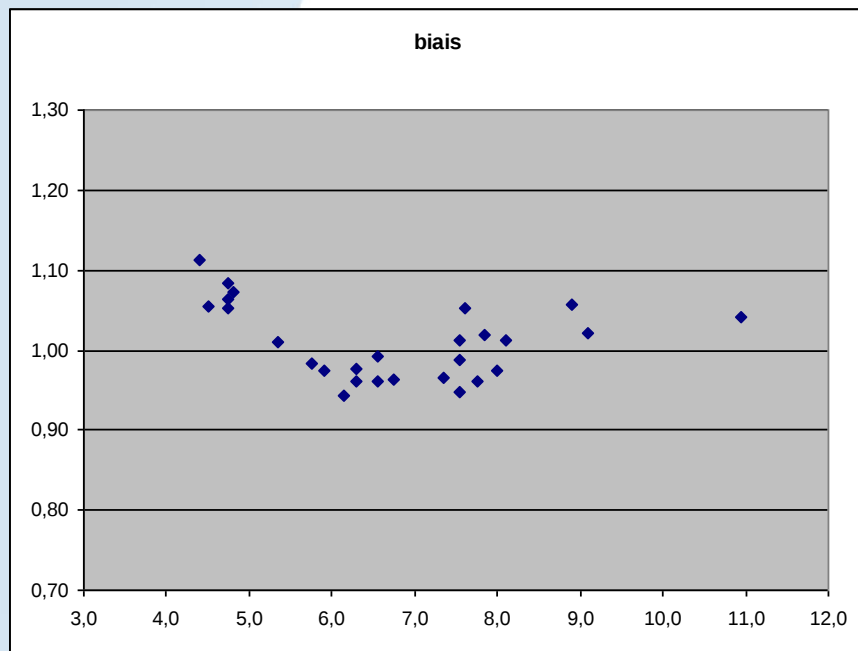
Comparaison de méthodes : Immuno versus Capillarys

- 24 échantillons différents passés en double sur Vista (Siemens) et Sebia



Comparaison de méthodes : Immuno versus Capillarys

- 24 échantillons différents passés en double sur Vista (Siemens) et Sebia



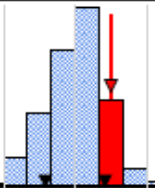
Comparaison des variances

P(échantillons)	27	25
s^2	0,011	0,00148

**La méthode alternative (Capyllaris®) est acceptable
et meilleure que la technique actuelle**

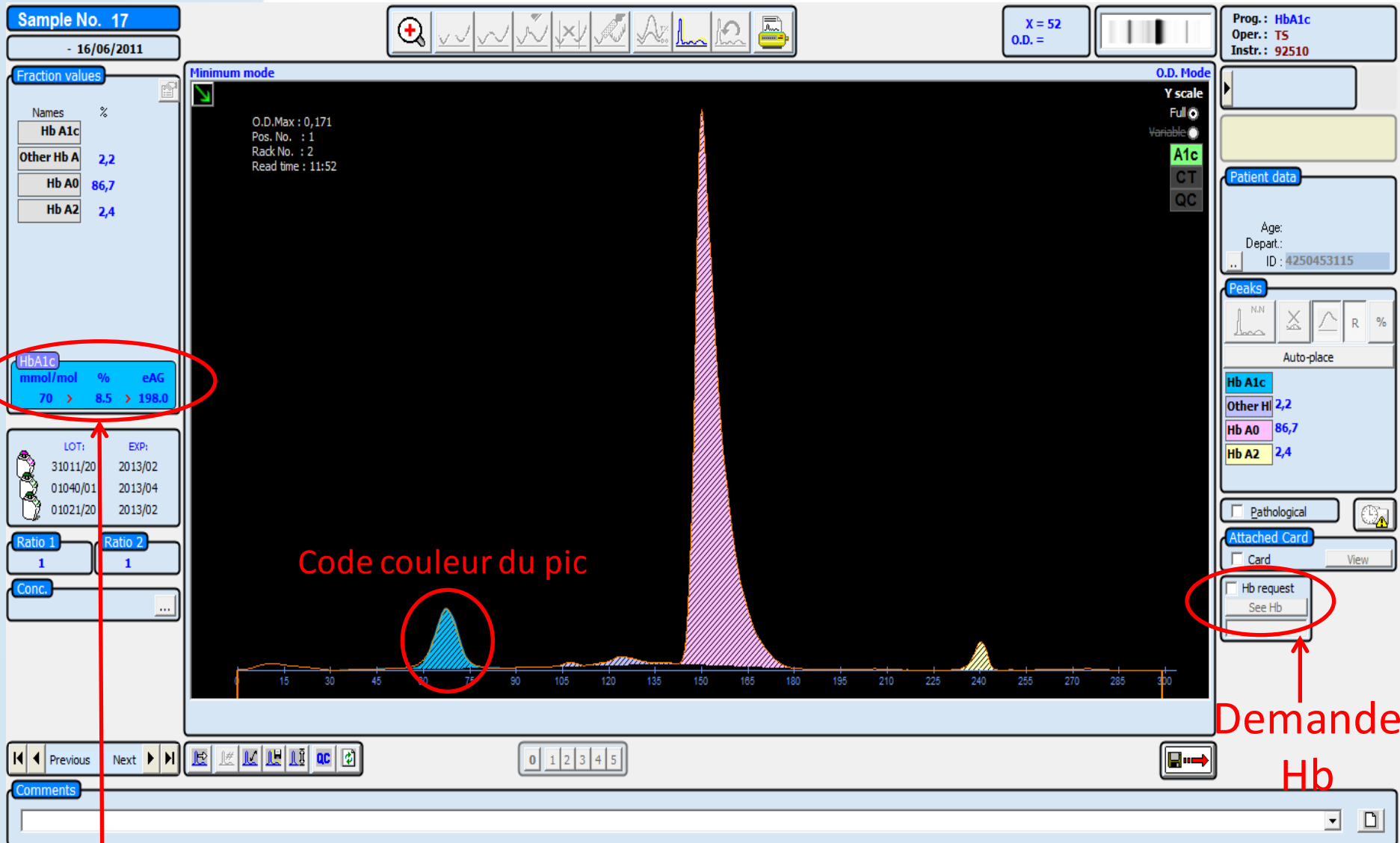
Capillarys et Contrôle Qualité Externe



Groupes techniques/pairs	Codage	Histogramme	n	Cible	CV	E/M%	Limites
ENSEMBLE DES RESULTATS	G 		413	9,04 Note : +1	6,0 zscore 1,0		8,50 - 9,58 Biais 6,2%
ELECTROPHORESE CAPILLAIRE	G		39	9,39	2,9	3,9	8,83 - 9,95
SEBIA Capillarys 2 Flex piercing	GC		39	9,39 Note : TB	2,9 zscore 0,8	3,9	8,83 - 9,95 Biais 2,2%
Chromatographie Liquide Haute Performance	2		238	8,81	5,4	-2,5	8,28 - 9,34

Le Collège des pathologistes américains recommande un biais cliniquement significatif de $\pm 7\%$ de la valeur HbA1c

Résultats HbA1c sur Capillarys 2/Minicap Flex Piercing



Alarmes si variant d'hémoglobine

Si Hb atypique



Biologiste

Variant connu ?



oui

non

Réponse avec
commentaire

EP de l'Hb

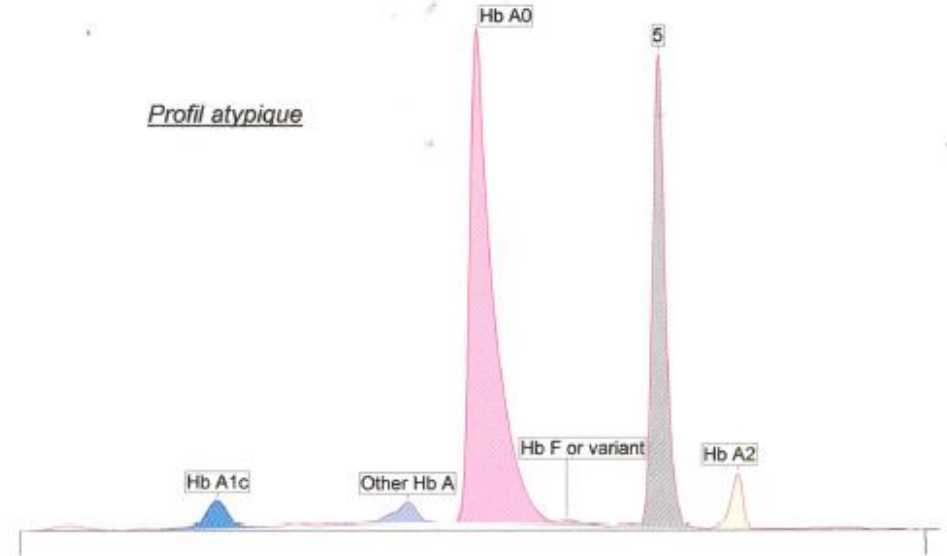


Clinicien
prévenu



Commentaire

Profil atypique



Electrophorèse de l'hémoglobine A1c

(technique capillaire réalisée sur Capillarys 2 FLEX PIERCING - SEBIA)

Fractions	%	mmol/mol	Rapport %
Hb A1c (*)	-	38	5,6
Other Hb A	3,7		
Hb A0	58,0		
Hb F or variant	0,7		
5	30,8		
Hb A2 (!)	3,6		

Concentration HbA1c (*) = 5,6 %

(*) Profil atypique
HbA1c mmol/mol (*) = 38 mmol/mol

Si difficultés d'interprétation de l'HbA1c

Fructosamines plasmatiques

- ❖ Dose l'ensemble des protéines glyquées plasmatiques
- ❖ Dosage colorimétrique
- ❖ Réaction non spécifique

Intérêt

- ❖ Dosage rapide, simple, automatisable
- ❖ Donne une image de l'imprégnation glycémique des 2 à 3 dernières semaines

Limites:

- ❖ Peu spécifique
- ❖ A défaut quand troubles protéiques (pertes urinaires, hypothyroïdie...)
 - ❖ Seuils cliniques mal définis

Si difficultés d'interprétation HbA1c

Albumine glyquée

- ❖ Dosage immunologique
- ❖ Test plus récemment introduit sur le marché
- ❖ Même intérêt que la fructosamine, mais...
- ❖ Pourrait constituer un marqueur du risque cardiovasculaire
- ❖ Autres corrélations cliniques à démontrer
- ❖ Limites : troubles affectant le métabolisme de l'albumine.....

Le dosage de l'HbA1c

- ❖ Paramètre validé pour le suivi de l'équilibre glycémique des diabétiques et du risque de complication du diabète
- ❖ L'interprétation doit tenir compte de la durée de vie des hématies, tout paramètre (Hémoglobinopathie, anémie, etc....) doit être intégré par le clinicien
- ❖ L'électrophorèse capillaire permet à la fois une détermination spécifique et hautement reproductible de l'HbA1c
- ❖ Méthode qui permet de détecter simultanément les variants d'hémoglobine ⇒ favorise une prise en charge optimale par le clinicien



Merci de votre attention !