

Editoriale su invito

Perché e come misurare l'emoglobina glicata

A. Mosca

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche,
Università degli Studi di Milano

Corrispondenza: prof. Andrea Mosca, Dipartimento
Scienze e Tecnologie Biomediche, via Fratelli Cervi 93,
20090 Segrate (MI)
e-mail: andrea.mosca@unimi.it

G It Diabetol Metab 2009;29:179-183

La misura dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) nel sangue è da più di vent'anni il *gold-standard* per la valutazione del controllo glicemico nei soggetti diabetici. Infatti, dal momento della pubblicazione dei risultati dello studio del Diabetes Complications Control Trial (DCCT), sappiamo che livelli elevati dell' HbA_{1c} aumentano il rischio delle complicanze microvascolari (e anche macrovascolari) e che quindi questo parametro viene utilizzato come target per guidare le scelte terapeutiche¹. In particolare dallo studio DCCT è emerso che ogni aumento dell'1% nell' HbA_{1c} è associato a un peggioramento della glicemia media di circa 35 mg/dl e gli attuali target terapeutici raccomandati dalla American Diabetes Association (ADA) indicano che l'obiettivo primario della terapia deve portare a un valore di HbA_{1c} non superiore al 7%. Se invece l' HbA_{1c} è costantemente superiore all'8% è opportuno che il trattamento terapeutico debba essere prontamente rivalutato. Altri Enti diversi dall'ADA, quali la International Diabetes Federation (IDF) raccomandano di raggiungere e mantenere valori di HbA_{1c} inferiori a 6,5% per minimizzare il rischio delle complicanze². Tale target a volte è difficile da raggiungere, soprattutto in soggetti anziani.

Un altro utilizzo tipico dell' HbA_{1c} è per fornire una misura del grado di qualità delle cure prestate ai pazienti con diabete, e i criteri dell'ADA indicano che la percentuale di pazienti con valori di HbA_{1c} superiori al 9,0% non dovrebbe superare il 20% del totale dei pazienti adulti. Inoltre la quota dei diabetici con valori inferiori al 7% dovrebbe essere almeno pari al 40% del totale. Inoltre l'84% dei pazienti pediatrici dovrebbe avere valori di $HbA_{1c} < 10,0\%$ e il 34% dovrebbe avere valori inferiori a 8,0%³.

La misura dell' HbA_{1c} è anche molto importante per confermare la diagnosi di diabete, e recentissimamente sono state pubblicate le prime raccomandazioni in tal senso^{4,5}. In particolare, valori $\geq 6,5\%$, se confermati in almeno due occasioni successive, permetterebbero di porre diagnosi di diabete. Vedremo nei prossimi tempi sicuramente i primi risultati della

messa in atto di tali indicazioni. In questa sede si ritiene utile riassumere pro e contro dell'HbA_{1c} per lo screening e la diagnosi di diabete, come mostrato in tabella 1.

La frequenza della misurazione dell'HbA_{1c} è teoricamente legata alla vita media dei globuli rossi (4 mesi) e quindi dovrebbe essere di tre volte all'anno. Le raccomandazioni ADA consigliano di misurarla 2 volte all'anno in pazienti in controllo metabolico stabile e che abbiano raggiunto i target terapeutici e con un maggior numero di determinazioni per i pazienti in controllo instabile. Nel diabete gestazionale e in casi particolari le determinazioni possono essere fatte anche a distanza di due mesi. Segnalo che anche a distanza di un mese è possibile osservare diminuzioni significative dell'HbA_{1c} (tra 0,5 e 0,7%) in pazienti ospedalizzati e messi sotto stretto regime ipoglicemizzante. Una nota informativa dello NCCLS dice, a questo proposito, che la glicemia del mese precedente il prelievo pesa per circa il 50% sul risultato dell'HbA_{1c}, mentre un restante 25% riflette la glicemia dei 2 mesi precedenti e il rimanente 25% riflette quella dei 3-4 mesi prima⁶. Anche la frequenza delle determinazioni dell'HbA_{1c} è uno degli indicatori della qualità dei servizi offerti ai pazienti con diabete, nel 93% dei quali almeno una determinazione dell'HbA_{1c} deve essere stata fatta nell'anno precedente alla valutazione medesima³. Purtroppo recenti evidenze dimostrano che sovente il test dell'HbA_{1c} viene eseguito con una frequenza non appropriata (nel 26% dei casi il test viene ripetuto entro 3 mesi)⁷.

A oggi sono disponibili oltre 70 kit per misurare l'HbA_{1c}, ed è difficile avere un quadro aggiornato delle loro prestazioni e limiti, anche perché in continuazione ne vengono alla luce di nuovi, soprattutto per il *point-of-care-testing*. A grandi linee possono essere raggruppate in:

- metodiche cromatografiche basate sulla differenza di punto isoelettrico tra HbA_{1c} e HbA (scambio ionico, HPLC e simili), o sulla presenza di glucosio (affinità);
- metodiche immunochimiche;

c) metodiche enzimatiche (riconoscono la presenza di chetoammine).

Generalmente i risultati ottenuti con metodi basati su diversi principi sono molto ben correlati, a dispetto di quanto si sarebbe tentati a immaginare, perché evidentemente i diversi metodi sono sensibili alle differenze strutturali tra HbA_{1c} e HbA nella medesima zona della molecola emoglobinica (verosimilmente i dintorni dei residui terminali delle catene beta-globiniche) e non ci sono evidenze che i dati ottenuti con un metodo siano, da un punto di vista clinico, superiori a quelli ottenuti con un altro. Una rassegna delle diverse metodiche analitiche è stata curata da John⁸, e varie altre informazioni sono state raccolte in un paio di recenti pubblicazioni^{9,10}. È sempre utile tuttavia tenere presenti le possibili limitazioni dell'utilizzo dell'HbA_{1c}, che sono riassunte nella tabella 2. Come regola generale si raccomanda che se il risultato dell'HbA_{1c} contrasta visibilmente col quadro clinico del paziente, il test va ripetuto, possibilmente utilizzando una metodica di diverso principio analitico, oppure la valutazione del controllo glicemico va effettuata utilizzando altri parametri (per esempio la determinazione dell'albumina glicata, oggi effettuabile con grande affidabilità mediante metodo enzimatico-colorimetrico¹¹).

Come noto, perché il dato dell'HbA_{1c} sia utilizzabile, occorre che le misure siano standardizzate e, in quest'ottica, dal 1995 la Federazione Internazionale di Chimica Clinica (IFCC) ha promosso le attività di un gruppo di lavoro che affrontasse il problema (IFCC WG-HbA_{1c}). Dopo circa 13 anni siamo giunti al punto di avere un metodo ufficiale di riferimento¹², di aver prodotto e resi disponibili due materiali primari di riferimento¹³, di aver implementato una rete internazionale di laboratori di riferimento¹⁴, di avere coinvolto tutte le aziende diagnostiche nell'allineamento al sistema di riferimento e di essere sulla strada per sviluppare e rendere disponibili materiali secondari di riferimento, in collaborazione con l'ente europeo che ha già in deposito i materiali primari e che ren-

Tabella 1 Vantaggi e limitazioni dell'HbA_{1c} per lo screening e la diagnosi del diabete (modificata da Little RR e Sacks DB¹⁰).

Vantaggi	Svantaggi
Non c'è bisogno che il paziente sia a digiuno	La misura dell'HbA _{1c} può essere influenzata da alcuni variabili preanalitiche non note a priori (per es. presenza di varianti emoglobiniche) (Tab. 2)
L'HbA _{1c} è correlata allo sviluppo di complicanze	Il costo della determinazione dell'HbA _{1c} è più alto di quello della misura della glicemia
L'HbA _{1c} ha una variabilità biologica intra-individuale (entro il 2%) minore di quella della glicemia	La misura dell'HbA _{1c} potrebbe essere non disponibile come quella della glicemia (per es. nei Paesi in via di sviluppo)
L'HbA _{1c} riflette il controllo glicemico su un arco di tempo di 2-3 mesi e non risente di variazioni rapide della glicemia (per es. iperglicemie da stress)	
La maggior parte di produttori di kit per l'HbA _{1c} offre prodotti standardizzati agli attuali sistemi di riferimento	

Tabella 2 *Principali limitazioni e cautele interpretative della misura dell'HbA_{1c} nel sangue, legate a fattori pre-analitici non sempre noti a priori.*

Fattore interferente	Commenti
Aumento dei globuli bianchi	Elevati livelli di globuli bianchi (LLC) possono interferire positivamente con diverse metodiche (soprattutto immunochimiche). Alcune metodiche hanno superato questa interferenza aggiungendo un lisante dei leucociti nei reagenti.
Carenza di ferro	L'anemia sideropenica si associa a valori più elevati di HbA _{1c} , forse perché l'aumento di malondialdeide, che è aumentata in carenza di ferro, aumenta la glicazione dell'emoglobina.
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). Alcune metodiche HPLC correggono il risultato calcolando l'HbA _{1c} solo relativamente rispetto alla HbA (non rispetto all'Hb totale). Non sono noti gli intervalli di riferimento dell'HbA _{1c} in soggetti non diabetici portatori di HbS.
Età del soggetto	L'HbA _{1c} aumenta sensibilmente (0,03% per anno), secondo alcuni indipendentemente dalla tolleranza glucidica. Non si ritiene che tale aumento giustifichi un cambiamento dei target per differenti gruppi di età.
Frazione labile	Può causare valori falsamente aumentati se non eliminata o separata. Le metodiche immunochimiche e in cromatografia di affinità non ne sono influenzate. La maggior parte delle metodiche attuali non risente di questa interferenza.
Insufficienza renale	L'aumento dell'urea può formare, sotto forma di cianato, emoglobina carbamidata che generalmente co-eluisce 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 glutatione provoca la formazione di glutationil-emoglobina che interferisce positivamente nelle metodiche HPLC.
Ipertrigliceridemia	Interferenza positiva nelle metodiche immunoturbidimetriche.
Processi emolitici	Possono causare valori falsamente abbassati per diminuzione della vita media eritrocitaria.
Razza del soggetto	Sono state riportate differenze nei valori medi di HbA _{1c} in popolazioni di soggetti non diabetici, probabilmente dovute a fattori difficilmente controllabili (quali la cinetica di ingresso del glucosio negli eritrociti, variazioni della vita media eritrocitaria e altre). Le differenze sono generalmente piccole ($\leq 0,4\%$) per richiedere un cambiamento dei target per soggetti di differenti etnie.
Variabilità stagionale	Discreto effetto (fino a circa il 7%) di tipo ciclico, con periodo semestrale. Pochi dati in letteratura.

derà disponibili anche i materiali secondari, cioè l'Institute for Reference Methods and Materials (IRMM).

La fase che ora dobbiamo affrontare riguarda l'implementazione, a livello degli utilizzatori finali (laboratori di analisi, centri per la cura del diabete ecc.), di questo nuovo sistema di riferimento. A tal fine a maggio del 2007 un gruppo di persone rappresentative delle principali Società Scientifiche direttamente coinvolte nella tematica, quali l'ADA, l'European Association for the Study of Diabetes (EASD), l'International Diabetes Federation (IDF) e l'IFCC ha prodotto un documento di consenso sulla standardizzazione dell'HbA_{1c} che ne

dettava la strategia a livello mondiale¹⁵. In un secondo documento¹⁶ sono state riportate le conclusioni raggiunte a Milano in un successivo incontro tenutosi presso la sede IFCC con i rappresentanti delle aziende diagnostiche. I punti salienti di questo secondo documento possono essere così riassunti:

- tutti i produttori di diagnostici si allineeranno al sistema di riferimento IFCC entro il 31 dicembre 2009;
- il nome del test sarà "HbA_{1c}" (non "A1c", come già in voga soprattutto negli USA);
- tutti gli strumenti che saranno messi sul mercato dopo il

primo gennaio 2011 (data facile da ricordare: 1-1-11) esprimeranno il risultato della misura in unità IFCC (mmol/mol) e in unità derivate, allineate al sistema di riferimento americano del National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), cioè in unità %;

- d) i sistemi di misura non implementeranno, unitamente al risultato della misura dell'HbA_{1c}, il dato della glicemia media stimata, calcolabile sulla base dei risultati dello studio ADAG¹⁷, lasciando ai professionisti di laboratorio la possibilità di refertare anche questo dato interfacciandosi con i sistemi informatici di laboratorio;
- e) i materiali di controllo che dovranno essere usati nelle Valutazioni Esterne di Qualità (VEQ) dovranno essere commutabili e avere un valore di HbA_{1c} assegnato mediante il metodo di riferimento IFCC. Nei programmi di VEQ dovrà anche essere chiaramente definito il limite per l'errore totale ammissibile;
- f) il gruppo di studio IFCC sarà a disposizione dei produttori di diagnostici per aiutarli nella fase di allineamento al sistema di riferimento IFCC.

Una ulteriore puntualizzazione sulla terminologia e le unità di misura è stata pubblicata successivamente¹⁸.

Per concludere, lo scorso anno è stato formato un gruppo di lavoro, composto da delegati di tutte le principali associazioni/società scientifiche che si occupano di diabete (diabetologi, medici di medicina generale, endocrinologi,

laboratoristi, infermieri, associazioni dei pazienti diabetici) che hanno preparato un documento di consenso per quanto riguarda l'implementazione della standardizzazione internazionale in Italia (pubblicato anche su questo numero del *G It Diabetol Metab* alle pagg. 184-188)¹⁹. Le principali raccomandazioni di questo gruppo di lavoro sono riportate nella tabella 3, e nei prossimi mesi si avvierà una campagna informativa gestita in modo sinergico da tutte le società scientifiche o associazioni coinvolte, al fine di armonizzare la tempistica di passaggio al nuovo sistema di riferimento IFCC (per es.: comunicazioni ai soci, relazioni ai congressi, articoli su riviste, testi ad hoc).

Una volta implementato tale sistema di riferimento in maniera capillare, i professionisti di laboratorio potranno chiedere alle ditte produttrici di kit diagnostici le evidenze dell'allineamento dei loro sistemi al sistema di riferimento IFCC e potranno quindi verificare e monitorare le loro prestazioni analitiche mediante la partecipazione costante a programmi di valutazione esterna di qualità. Personalmente sono convinto che la messa in atto puntuale delle raccomandazioni indicate nel documento di consenso citato¹⁹ permetterà di mettere a disposizione di tutti gli utilizzatori finali un dato di HbA_{1c} sicuro e scientificamente valido, che sicuramente servirà a migliorare le cure dei pazienti e permetterà avanzamenti significativi per una più attenta diagnosi e sorveglianza del diabete in Italia.

Tabella 3 Raccomandazioni per l'implementazione della standardizzazione internazionale per l'HbA_{1c} in Italia (modificato da Mosca A. et al.¹⁹).

Numero progressivo	Raccomandazione
1	1.1 Il traguardo dell'errore totale è $\pm 6,7\%$ (espresso in termini di frazione percentuale sul valore assoluto di HbA _{1c}).
	1.2 L'imprecisione del metodo (CV), valutata sul lungo periodo, deve essere contenuta entro il 2%.
	1.3 La partecipazione a programmi di valutazioni esterne di qualità (VEQ), nei quali vengono utilizzati materiali commutabili e con valori di HbA _{1c} assegnati mediante il metodo di riferimento IFCC, rappresenta il modo corretto per poter valutare quanto le misure effettuate rispondano ai requisiti di errore totale sopra definiti.
2	La refertazione della eAG* sulla base dell'HbA _{1c} , attraverso l'equazione proposta a conclusione dello studio ADAG, è soggetta a troppe limitazioni perché se ne possa consigliare l'utilizzo sistematico.
3	3.1 L'HbA _{1c} deve essere misurata con metodi calibrati al sistema di riferimento IFCC.
	3.2 Il risultato deve essere riportato in mmol/mol e in unità % derivate, usando l'equazione di conversione sopra riportata.
	3.3 Nel referto di laboratorio, per comodità degli utilizzatori, il valore di HbA _{1c} sarà espresso, per un periodo limitato di tempo, mediante le unità convenzionali (%) seguite dalle unità IFCC (mmol/mol). Successivamente, le unità convenzionali saranno abbandonate.
4	A partire dal 01.01.2010 i risultati dell'HbA _{1c} saranno espressi sia in unità allineate al sistema DCCT (%), sia in unità standardizzate IFCC (mmol/mol). A partire dal 01.01.2012 i risultati dell'HbA _{1c} saranno refertati solamente in unità IFCC (mmol/mol).

*eAG: glicemia media stimata (*estimated average glucose*).

Bibliografia

1. DCCT 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.
2. International Diabetes Federation (IDF). *Global guideline for type 2 diabetes 2005*. Documento scaricabile dal sito www.idf.org (accesso verificato il 5 luglio 2009).
3. National Committee for Quality Assurance, <http://web.ncqa.org/tabid/139/Default.aspx>. (accesso verificato il 5 luglio 2009).
4. Saudek CD, Herman WH, Sacks DB, Bergenstal RM, Edelman D, Davidson MB. *A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metabol 2008;93:2447-53.
5. The International Expert Committee. *International Expert Committee report on the role of the A_{1c} assay in the diagnosis of diabetes*. Diabetes Care 2009;32:1-8.
6. Tahara Y, Shima K. *The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients*. Diabetes Care 1993;16:1313-4.
7. Salvagno GL, Lippi G, Targher G, Montagnana M, Guidi GC. *Monitoring glycemic control: is there evidence for appropriate use of routine measurement of glycated hemoglobin?* Clin Chem Lab Med 2007;45:1065-7.
8. John WG. *Haemoglobin A_{1c}: analysis and standardisation*. Clin Chem Lab Med 2003;41(9):1199-212.
9. Mosca A. *La misura dell'emoglobina glicata nel sangue umano, attualità e prospettive*. Biochimica Clinica 2008;32:27-35.
10. Little RR, Sacks DB. *HbA_{1c}: how do we measure it and what does it mean?* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2009;16:113-8.
11. Paroni R, Ceriotti F, Galanello R, Battista Leoni G, Panico A, Scurati E et al. *Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma*. Clin Biochem 2007;40:1398-405.
12. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T et al. *Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood*. Clin Chem Lab Med 2002;40:78-89.
13. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppsson JO. *Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA_{1c} determinations*. Clin Chem Lab Med 1998;36:299-308.
14. Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO et al. *The IFCC Reference Measurement System for HbA_{1c}: A 6-Year Progress Report*. Clin Chem 2008;54:240-8.
15. Consensus statement. *Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A_{1c} Measurement*. Diabetes Care 2007;30:2399-400.
16. Report. *Implementation of standardization of HbA_{1c} Measurement*. Clin Chem Lab Med 2008;46:573-4.
17. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ for the A_{1c}-Derived Average Glucose Study Group. *Translating the A_{1c} assay into estimated average glucose values*. Diabetes Care 2008;31:1-6.
18. John WG, Nordin G, Panteghini M. *What's in a name? Standardisation of HbA_{1c}: a response*. Clin Chem Lab Med 2008;46:1326-7.
19. Mosca A, Branca MT, Carta M, Genna ML, Giorda CB, Ghidelli R et al. *Raccomandazioni per l'implementazione della standardizzazione internazionale dell'emoglobina glicata in Italia*. Biochimica Clinica 2009;33:258-61.