

La determinazione dell'emoglobina glicata nel sangue umano: attualità e prospettive

Andrea Mosca

Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME),
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi di Milano

ABSTRACT

The measurement of glycated haemoglobin in human blood: news and perspectives. Glycated haemoglobin (HbA_{1c}) is the gold standard measurement for assessing the glycometabolic control in diabetics. Aim of the present paper is to give an update about the analytical and clinical aspects related to this test, as well to summarize the status of the international process of standardization of HbA_{1c} measurement. A brief discussion about the issues related to the transition to the IFCC standardized assays is presented together with the most recent proposals related to the studies on the relationship between HbA_{1c} and "mean blood glucose".

INTRODUZIONE

I globuli rossi di un soggetto adulto in buono stato di salute contengono principalmente emoglobina A (HbA) ($\alpha_2\beta_2$), emoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e tracce di emoglobina fetale ($\alpha_2\gamma_2$). Queste tre emoglobine costitutive si differenziano per la sequenza amminoacidica delle catene non- α . In realtà, separando le emoglobine eritrocitarie con tecniche sufficientemente risolutive si possono evidenziare molte più frazioni, perchè le emoglobine possono subire modifiche post-traduzionali, molte delle quali ancora poco studiate e caratterizzate.

La prima segnalazione che riportava la presenza di frazioni emoglobiniche chiamate allora "minori", separabili dall'HbA per elettroforesi su amido risale al 1955 (1). Studi successivi eseguiti utilizzando come matrice separativa la resina a scambio cationico Amberlite IRC-50 confermarono la presenza di 5 componenti minori che furono chiamate A_{1a}, A_{1b}, A_{1c}, A_{1d} ed A_{1e} secondo l'ordine di eluizione dalle colonnine di IRC-50 (2). Bisogna tuttavia attendere altri 10 anni perchè un medico iraniano infine dimostri che queste frazioni emoglobiniche, soprattutto la HbA_{1c}, aumentano sensibilmente in soggetti affetti da diabete mellito (3).

I siti potenziali dell'HbA che possono essere modificati dal legame col glucosio includono i 4 residui N-terminali delle catene α e β e tutti i gruppi ϵ -amminici liberi dei 44 residui lisinici presenti nel tetramero emoglobinico. Negli anni '80 Bunn et al. hanno dimostrato che nell'HbA_{1c} circa il 60% del glucosio è legato alle valine N-terminali delle catene β (1 o 2 molecole di glucosio per tetramero) e che altri residui di glucosio possono legarsi alle valine N-terminali delle catene α ed alle lisine β 17 ed β 66 (4, 5). Da un punto di vista chimico la reazione tra il glucosio ed i gruppi amminici liberi procede in due stadi. Nella prima fase si forma un complesso labile (base di Schiff) con un'emivita di circa 8 min; successivamente questo complesso aldiminico si riarrangia in una forma stabile, detta chetoammina, con una reazione lenta

caratterizzata da un'emivita di circa 5 giorni (6). Dal momento che i globuli rossi sono liberamente permeabili al glucosio, l'entità della formazione dell'HbA_{1c} è direttamente proporzionale alla concentrazione di glucosio alla quale i globuli rossi sono esposti durante il loro permanere in circolo ed al tempo relativo di esposizione, senza mai tuttavia raggiungere un tetto massimo od una soglia (7).

Successivamente alla caratterizzazione dell'HbA_{1c} diversi gruppi hanno dimostrato che il glucosio è in grado di reagire in maniera simile anche con numerose altre proteine, quali l'albumina (8), la proteina del cristallino (9), il collagene (10), la proteina della lamina basale del glomerulo renale (11), modificandone significativamente diverse proprietà strutturali e funzionali. Nel caso dell'HbA_{1c} l'affinità per l'ossigeno ne risulta significativamente aumentata, essenzialmente per una mancata disponibilità al legame con il 2,3-difosfoglicerato, anche se da un punto di vista clinico il dato è di scarso rilievo (12,13).

ASPETTI METODOLOGICI

A tutt'oggi sono disponibili oltre 70 tipi diversi di metodiche commerciali per misurare l'HbA_{1c}, principalmente basate su tre principi: la differenza di carica elettrica tra HbA_{1c} ed HbA (minicolonnine, HPLC, isoelettrofocalizzazione ed elettroforesi), la natura di determinanti antigenici dei primi 8 residui amminoacidici della catena β (metodiche immunochimiche) e la presenza di glucosio legato covalentemente all'emoglobina (cromatografia di affinità). La maggior parte delle metodiche basate sulle differenze di carica e quelle immunochimiche misurano la HbA_{1c}, altre quantificano la emoglobina glicata "totale", includendo quindi il glucosio legato alle lisine ed alle valine N-terminali delle catene α . Ciò spiega in parte perchè nel corso degli anni, in mancanza di uno standard di riferimento internazionale, siano stati definiti intervalli di riferimento metodo-dipendenti e perchè i dati ottenuti in

ambiti metodologici diversi siano a volte non confrontabili. Generalmente, tuttavia, i risultati ottenuti con metodi basati su diversi principi analitici sono ben correlati 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 disponibili è stata recentemente curata da John (14). Interessante segnalare il continuo evolversi delle metodiche, sia sul fronte degli strumenti "point-of-care" (15) che su quello della misura in spettrometria di massa (16).

Variabili pre-analitiche

Fattori legati ai soggetti

Sesso ed etnicità non influiscono sul risultato. I dati sull'effetto dell'età sono controversi, anche se alcuni hanno riportato un aumento dell'HbA_{1c} dello 0,1% per ogni decade di età a partire dai 30 anni (17,18). Va segnalato che nella popolazione esistono soggetti che consistentemente presentano valori più alti o più bassi di HbA_{1c} rispetto alla media, a parità di glicemia media giornaliera. Tali individui sono stati denominati a fenotipo glicatore "veloce" o "lento" e sono attualmente oggetto di attento studio (19). Da informazioni preliminari sembrerebbe che l'incidenza di tali fenotipi sia piuttosto rara (2-3% della popolazione). Altri fattori di variabilità intradividuale sono correlati a possibili variazioni stagionali nelle concentrazioni dell'HbA_{1c}, verosimilmente spiegabili sulla base del diverso stile di vita/alimentazione tra estate ed inverno (20). Tali variazioni possono causare cambiamenti del 5-7% rispetto al valore medio annuale.

Ogni condizione che porta ad una riduzione della vita media eritrocitaria (emolisi intra- ed extravascolare) produce un abbassamento dei valori dell'HbA_{1c} indipendentemente dal metodo utilizzato (21). L'assunzione di vitamina C o E sembra causare un abbassamento dei valori di HbA_{1c}, probabilmente per una inibizione del processo di glicazione (22,23), anche se la vitamina C sembra interferire in alcune metodiche di misura, principalmente per la formazione di emoglobina acetilata (22). È stato riportato che in presenza di anemia sideropenica i valori di HbA_{1c} tendono ad aumentare, anche se le ragioni non sono chiare (24). L'ipertrigliceridemia, l'iperbilirubinemia, l'assunzione cronica di salicilato e la dipendenza da oppiacei possono essere causa di interferenze con diverse metodiche, portando ad innalzamenti dell'HbA_{1c} (25-27). La condizione uremica può essere anche causa di un'interferenza positiva (circa +0,066% per ogni incremento di 1 mmol/L di urea) per formazione di emoglobina carbamidata, che può interferire in certe metodiche (soprattutto nelle metodiche a bassa risoluzione basate sulla separazione dell'HbA_{1c} in funzione del suo punto isoelettrico). Nei soggetti sani l'emoglobina carbamidata rappresenta 0,2 - 0,4% dell'emoglobina totale, ma negli uremici può salire fino al 3%, il che potrebbe portare ad un aumento dell'HbA_{1c} di circa il 3%, se la emoglobina carbamidata interferisce nella determinazione dell'HbA_{1c}

(28). La presenza di varianti emoglobiniche può essere causa di interferenza sia positiva che negativa, a seconda delle metodiche utilizzate (29,30). Le metodiche basate sulla cromatografia di affinità sono generalmente meno influenzate delle altre. Nel caso delle metodiche HPLC, l'ispezione attenta del cromatogramma può rivelare la presenza di picchi anomali e quindi essere utile per integrare il referto. È comunque consigliabile valutare il controllo glicometabolico utilizzando altri esami non basati sull'HbA_{1c}, ad esempio l'albumina glicata (31,32). Infine, la presenza di emoglobina fetale in concentrazione insolitamente elevata (portatori di certi tipi di β-talassemia, persistenza ereditaria di emoglobina fetale) e di quote elevate di frazione labile (base di Schiff) possono essere causa di interferenza positiva, anche se la maggior parte delle metodiche attuali ha superato queste limitazioni. Solo alcune metodiche manuali (minicolonnine a scambio ionico, elettroforesi) possono risentirne. Si raccomanda a tal fine un'attenta valutazione delle informazioni fornite dal produttore.

Raccolta e conservazione dei campioni

Può essere usato prelievo sia venoso che di sangue capillare tramite apparecchio pungidito. L'anticoagulante varia a seconda dei metodi, ma generalmente l'EDTA è quello più utilizzato. La stabilità del campione di sangue intero è di almeno 5 giorni a 4 °C e di almeno 6 mesi a -80 °C (33), anche se recenti segnalazioni indicano a questa temperatura stabilità fino a 10 anni (34). Nel caso del congelamento a -80 °C possono essere congelate direttamente le provette primarie purché di materiale resistente al congelamento e con volume di sangue non elevato (circa 2 mL). Si raccomanda un congelamento rapido ed uno scongelamento lento a temperatura ambiente (circa 1 ora) con successivo delicato rimescolamento. Una volta scongelati i campioni debbono essere analizzati entro breve tempo. Alcuni produttori di diagnostici hanno recentemente introdotto sistemi di raccolta del sangue capillare che garantiscono una stabilità di circa 1/2 settimane a temperatura ambiente (35-37). Questi sistemi sono estremamente dipendenti dal metodo utilizzato e non possono essere adattati, senza opportune verifiche, ad altri sistemi analitici.

Variabili analitiche

I dati che abbiamo a disposizione sul grado attuale di concordanza delle metodiche per l'HbA_{1c} sono ricavabili essenzialmente dai programmi di VEQ, che si sono sviluppati in maniera autonoma in diverse nazioni. Senza la pretesa di voler stilare un elenco completo di tali programmi, menziono quello americano del College of American Pathologists (CAP), quello inglese NEQAS (38), quello olandese dello European Reference Laboratory (ERL) (39), il francese (40), lo svedese EQALIS (41), il tedesco INSTAND (42) e quelli italiani, intersocietario a partecipazione volontaria (43) ed interregionale a partecipazione obbligatoria (44).

Negli Stati Uniti è obbligatoria la partecipazione alla

VEQ del CAP (45) e la maggior parte dei laboratori che vi partecipa si accredita presso il National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) (46), che si è costituito nel 1993 per facilitare l'armonizzazione dell'HbA_{1c} negli Stati Uniti in modo che i risultati che tutti i laboratori ottengono possano essere confrontati e riferiti con quelli riportati nello studio Diabetes Control and Complication Trial ("DCCT) (47). I dati degli esercizi 2005 del CAP dimostrano che oltre il 99% dei laboratori americani che vi ha partecipato usa metodiche certificate dallo NGSP e referta l'emoglobina glicata come HbA_{1c} od in equivalenti di HbA_{1c} (per coloro che usano le metodiche in cromatografia di affinità). I valori mediani trovati dai partecipanti erano tutti tra lo 0,4% e l'1,0% dei valori target NGSP, con circa 80% dei partecipanti che si discostava di non più di 0,2-0,3% di HbA_{1c} sul campione a bassa concentrazione e non più dello 0,5% di HbA_{1c} sul campione ad alta concentrazione. Il CV interlaboratorio oscillava dal 1,9% al 9,7%. Per quanto riguarda l'imprecisione intralaboratorio, dato che due dei campioni inviati erano aliquote diverse dello stesso pool di materiale, sono stati ricavati dei dati che hanno dimostrato che oltre il 95% dei laboratori riportava uno scostamento non superiore allo 0,5% di HbA_{1c} tra le due misure replicate. In generale si è osservato che i metodi in HPLC (sia a scambio ionico che in cromatografia di affinità) hanno dimostrato di avere una minore variabilità rispetto alle metodiche immunochimiche. Dati più o meno simili si possono ricavare dagli altri programmi di VEQ sopra menzionati. In Italia, i dati raccolti negli ultimi esercizi interlaboratorio a partire dal 2004 dimostrano una variabilità media inter-laboratorio compresa tra il 4% ed il 10% circa, per valori di HbA_{1c} compresi tra 5,2% e 10,5%. Non sembra rilevarsi un peggioramento delle prestazioni a basse concentrazioni di HbA_{1c} rispetto alle alte concentrazioni.

Traguardi analitici

I criteri per la definizione dei traguardi analitici in Medicina di Laboratorio possono essere definiti utilizzando l'approccio proposto da Fraser, basato sullo studio della variabilità biologica (48). E' molto importante che tali traguardi siano definiti in modo da stabilire limiti di accettabilità delle prestazioni per i produttori di diagnostici, criteri oggettivi per la valutazione di strumenti e di kit, sistemi di valutazione dei partecipanti nei programmi di

Tabella 1

Traguardi analitici per l'imprecisione, il bias e l'errore totale per la determinazione dell'HbA_{1c}, espressi a tre differenti livelli di qualità (riprodotta dal rif. 51)

Traguardo	Livello di qualità		
	minimo	desiderabile	ottimale
	%	%	%
Imprecisione (CV)	3,8	2,5	1,2
Bias (scostamento sistematico)	2,4	1,6	0,8
Errore totale	8,6	5,7	2,9

VEQ ed, infine, per assicurare una qualità analitica adeguata alla cura dei pazienti.

Per quanto riguarda l'HbA_{1c} non ci sono molti dati disponibili in letteratura relativamente alla variabilità biologica intra- ed interindividuale. Una stima secondo i lavori più attendibili (49,50) fornirebbe una variabilità biologica intraindividuale ("within-subject variability", CV_w) = 5,0% e una variabilità interindividuale (CV_G) tra il 4,3 ed il 5,9%. Utilizzando le formule correnti (48) per il calcolo dei traguardi di imprecisione, bias ed errore totale, si ottengono i valori riportati nella Tabella 1, calcolati a tre livelli di qualità come precedentemente raccomandato (51). Tali limiti debbono essere considerati con cautela per l'incertezza associata alle stime della variabilità biologica usate nei calcoli. Una recente rassegna di rappresentanti delle Associazioni Australiane di Biochimica Clinica, Endocrinologia e Diabetologia ha raccomandato che i metodi per la determinazione dell'HbA_{1c} debbano avere una imprecisione nel lungo periodo corrispondente ad un CV <2% e debbano essere caratterizzati da un valore minimo di bias (il più possibile vicino a zero) e di interferenze metodologiche da parte delle più comuni componenti emoglobiniche (emoglobina carbamidata, varianti emoglobiniche) che tipicamente possono interferire nella misura dell'HbA_{1c} (52).

Unità di misura

E' appena stato pubblicato un documento a nome dell'IFCC "Committee on Nomenclature, Properties and Units" riguardante la nomenclatura e l'unità di misura dell'HbA_{1c} (53). Tale documento propone, sulla base di rigorose considerazioni metrologiche, una nuova unità di misura per l'HbA_{1c} (mmol/mol), che dovrebbe essere utilizzata una volta deciso il passaggio al nuovo sistema di riferimento IFCC. La tradizionale unità in percentuale sarebbe infatti da eliminare perchè ambigua e non conforme al Sistema Internazionale (SI).

Intervalli di riferimento

Teoricamente ogni laboratorio dovrebbe determinare i suoi intervalli di riferimento, ma l'utilizzo di metodiche standardizzate e certificate e la definizione rigorosa della popolazione permettono di superare questo punto, come recentemente illustrato su questa rivista (54). Nel caso di metodiche certificate presso il NGSP, gli intervalli di riferimento per soggetti adulti non obesi e senza familiarità diabetica sono compresi tra 4,0 e 6,0% (55). Nelle donne in gravidanza i valori sono lievemente ma significativamente spostati più in basso, con intervalli tra 4,0 e 5,5% (56).

Gli intervalli di riferimento non sono però molto utilizzati da un punto di vista clinico, dal momento che i livelli decisionali definiti dagli studi DCCT e "UK Prospective Diabetes study" (UKPDS) sono generalmente più utili per valutare il grado di controllo glicometabolico dei pazienti. Tuttavia, è raccomandabile che, nel caso di risultati inferiori al limite inferiore di riferimento, le misure siano ripetute. Se confermati, tali risultati potrebbero far

sospettare la presenza di fattori che riducono la vita media eritrocitaria (ad es. anemie emolitiche). Analogamente, valori di HbA_{1c} molto elevati (superiori a 15-16%) debbono essere considerati con attenzione per la possibile eventuale presenza di emoglobine anormali che interferiscono nella misura dell'HbA_{1c} (ad es. emoglobina Camperdown).

UTILIZZO CLINICO

La misura dell'HbA_{1c} è utilizzata nei pazienti con diabete mellito, soprattutto al fine di sorvegliare il controllo glicometabolico a medio-lungo periodo (58,59). Tale prassi è suffragata da una raccomandazione con livello di evidenza "A" nel documento della "National Academy of Clinical Biochemistry" (NACB) americana, che dice inoltre che i goal di trattamento debbono essere basati sui risultati di studi clinici retrospettivi randomizzati (58). Tali studi, i più famosi dei quali sono il DCCT e l'UKPDS (47,60), hanno infatti provato che vi è una stretta correlazione tra il grado di controllo glicemico, valutato in base ad una serie di misure dell'HbA_{1c}, ed il rischio dello sviluppo e della progressione delle complicanze croniche del diabete. In particolare, dallo studio DCCT è emerso che ogni aumento di 1% nell'HbA_{1c} è associato ad un peggioramento della glicemia media di circa 35 mg/dL.

Gli attuali target terapeutici raccomandati dalla American Diabetes Association (ADA) indicano che il goal primario della terapia deve portare ad un valore di HbA_{1c} non superiore al 7% e che il trattamento terapeutico dei pazienti che presentino valori di HbA_{1c} costantemente superiori all'8% deve essere prontamente rivalutato. Questi livelli decisionali valgono solo per i metodi che sono certificati NGSP. Sempre dallo studio DCCT è emerso che una riduzione dell'HbA_{1c} del 10% (per esempio da 12,0% a 10,8% o da 8,0% a 7,2%) era associata ad una riduzione del 45% del rischio di sviluppare la retinopatia diabetica (47). Successive valutazioni hanno confermato il ruolo cardine dell'HbA_{1c} quale predittore di rischio di complicanze nei soggetti diabetici (61).

Va ricordato che valori target differenti dell'HbA_{1c} sono stati proposti anche da altre Società Scientifiche e che, in particolare per i diabetici di tipo 2, la Federazione Internazionale di Diabetologia (IDF) ha pubblicato nel 2005 una linea guida che raccomanda di raggiungere e mantenere valori di HbA_{1c} inferiori a 6,5% per minimizzare il rischio delle complicanze (62).

Un ulteriore utilizzo clinico della misura dell'HbA_{1c} è quello di fornire una misura del grado di qualità delle cure prestate ai pazienti con diabete da parte del personale medico e paramedico. I criteri stabiliti dall'ADA a questo proposito sono che la percentuale di pazienti con valori di HbA_{1c} superiori a 9% non superi il 20% del totale dei pazienti adulti e che la quota dei diabetici con valori inferiori a 7% debba essere almeno pari al 40% del totale. Inoltre 84% dei pazienti pediatrici dovrebbe avere valori di HbA_{1c} <10% ed il 34% dovrebbe avere valori <8% (63).

La frequenza di determinazione dell'HbA_{1c} è ancora oggetto di discussione. Da un punto di vista teorico, avendo i globuli rossi una vita di circa 4 mesi, la frequen-

za dovrebbe essere di tre volte all'anno. Le raccomandazioni ADA consigliano una frequenza di 2 volte all'anno in pazienti in controllo metabolico stabile, che abbiano raggiunto i target terapeutici, e più determinazioni per i pazienti in scarso controllo. Nel diabete gestazionale le determinazioni possono essere eseguite anche a distanza di due mesi. È utile segnalare 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 in stretto regime ipoglicemizzante. Una nota informativa 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 ed il rimanente 25% riflette quella di 3-4 mesi prima (64). 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 eseguita nell'anno precedente (63). Purtroppo recenti evidenze dimostrano che sovente l'esame viene eseguito con una frequenza non appropriata (nel 26% dei casi l'esame viene ripetuto entro 3 mesi, cioè entro un intervallo di tempo troppo breve) (65).

Dati recenti indicherebbero che, anche in soggetti senza diabete, aumenti anche lievi dell'HbA_{1c} si associano ad un rischio crescente di patologie cardiovascolari (66-68). In particolare, in soggetti non diabetici con glicemia fisiologica un aumento del 1% nei livelli dell'HbA_{1c} sarebbe associato ad un aumento del 28% del rischio di morte per cause cardiovascolari, indipendentemente dall'età, dalla pressione arteriosa, dalla colesterolemia, dall'indice di massa corporea e dal fumo di sigaretta.

Per quanto riguarda invece l'utilizzo dell'HbA_{1c} a fini diagnostici ci sono dati per ora contrastanti e l'ADA sconsiglia tale utilizzo (69). Dati ottenuti da Ko et al. (70) hanno peraltro provato che l'utilizzo combinato dell'HbA_{1c} e della glicemia a digiuno permetterebbe di evitare circa l'80% delle curve da carico di glucosio. A conferma di questo dato, i risultati dello studio NHANES III (71) hanno dimostrato che per valori di HbA_{1c} >6,1% (2 DS al di sopra della media dei valori in una popolazione sana) la specificità diagnostica dell'esame è elevata (97,4%) e che pertanto la probabilità di escludere il diabete in soggetti che hanno valori inferiori a 6,1% di HbA_{1c} è molto alta. Ulteriori studi clinici tuttora in corso su popolazioni ben definite e di ampie dimensioni (Inter-Heart, DREAM, PURE) permetteranno tra alcuni anni di conoscere con esattezza se l'HbA_{1c} potrà essere impiegata per diagnosticare il diabete e l'intolleranza al glucosio, quale sia il suo potere di predire vari tipi di rischio di complicanze, e se eventualmente il suo dosaggio sarà utile per definire nuove categorie a rischio, oltre a quelle dei soggetti con alterata glicemia a digiuno (IFG) ed alterata tolleranza al glucosio (IGT).

STANDARDIZZAZIONE INTERNAZIONALE DELLA MISURA

A parte il sistema implementato dal NGSP, prima citato, il processo di armonizzazione della misura

dell'HbA_{1c} è stato anche affrontato in altri paesi. In Svezia ed in Giappone si sono sviluppati programmi finalizzati a ridurre la variabilità interlaboratorio dei risultati, sia mediante lo sviluppo di un metodo analitico altamente risolutivo per la misura dell'HbA_{1c} (72), sia mediante il riferimento a valori di consenso ricavati da laboratori di riferimento (73). Nel 1995 la IFCC ha istituito un gruppo di lavoro con il compito di standardizzare i risultati della HbA_{1c} a livello globale (IFCC Working Group on HbA_{1c} Standardization) (74). Tale gruppo di lavoro ha proceduto a:

- a) produrre materiali di riferimento altamente purificati per HbA₀ e HbA_{1c} che potessero servire da base per la preparazione di calibratori (75);
- b) sviluppare e validare un metodo di riferimento per l'HbA_{1c} basato sulla digestione proteolitica delle emoglobine mediante endoproteasi Glu-C. I peptidi risultanti dalla digestione, tra i quali gli esapeptidi N-terminali glicati e non glicati delle catene β, vengono separati e quantificati mediante HPLC e spettrometria di massa (MS) oppure mediante HPLC ed elettroforesi capillare (CE) e l'HbA_{1c} calcolata con un algoritmo dal rapporto di tali peptidi (76). Il metodo sviluppato dal gruppo di lavoro è stato quindi approvato dalle società nazionali affiliate e pubblicato come metodo di riferimento IFCC (77);
- c) raffrontare i risultati ottenuti con la metodica di riferimento con quelli ottenuti dai metodi nazionali (americano, giapponese e svedese), elaborando quindi delle equazioni di conversione ("master equations") che potessero essere utilizzate per convertire tra loro i risultati ottenuti con diversi sistemi (78);

- d) implementare una rete internazionale di laboratori di riferimento che svolge due esercizi di intercomparazione all'anno allo scopo di mantenere sempre attivi i metodi di riferimento, aggiornare le relative procedure operative, assegnare valori ai calibratori ed ai materiali di controllo che di volta in volta vengono preparati e messi a disposizione dei produttori di diagnostici (79).

La Figura 1 mostra il sistema di riferimento IFCC per l'HbA_{1c} e schematizza la catena della relativa riferibilità metrologica. Al momento un solo paese (la Cecoslovacchia) ha adottato questo sistema di riferimento in quanto la sua adozione comporta un abbassamento dei valori numerici di HbA_{1c}, all'incirca pari a 1,3-1,9 unità percentuali di HbA_{1c} nell'intero intervallo fisiopatologico. Questo fatto, che dal punto di vista analitico è facilmente spiegabile in base alla maggiore specificità della metodica di riferimento IFCC rispetto a qualsiasi altra metodica usata come riferimento nei sistemi americano, giapponese o svedese, dal punto di vista dell'utilizzo clinico del risultato ha destato preoccupazione. Pertanto all'inizio del 2004 si è costituito un altro gruppo di lavoro (ADA/EASD/IDF Working Group of the HbA_{1c} assay), costituito prevalentemente da clinici afferenti a tre grandi associazioni diabetologiche, ADA, European Association for the Study of Diabetes (EASD) e IDF, con il compito di discutere come raggiungere la standardizzazione dei risultati dell'HbA_{1c}, alla luce dei traguardi raggiunti dal gruppo di lavoro IFCC (80). Le conclusioni che tale gruppo ha raggiunto possono essere così schematizzate:

- 1) il nuovo sistema di riferimento IFCC deve da subito essere adottato come standard globale per la calibra-

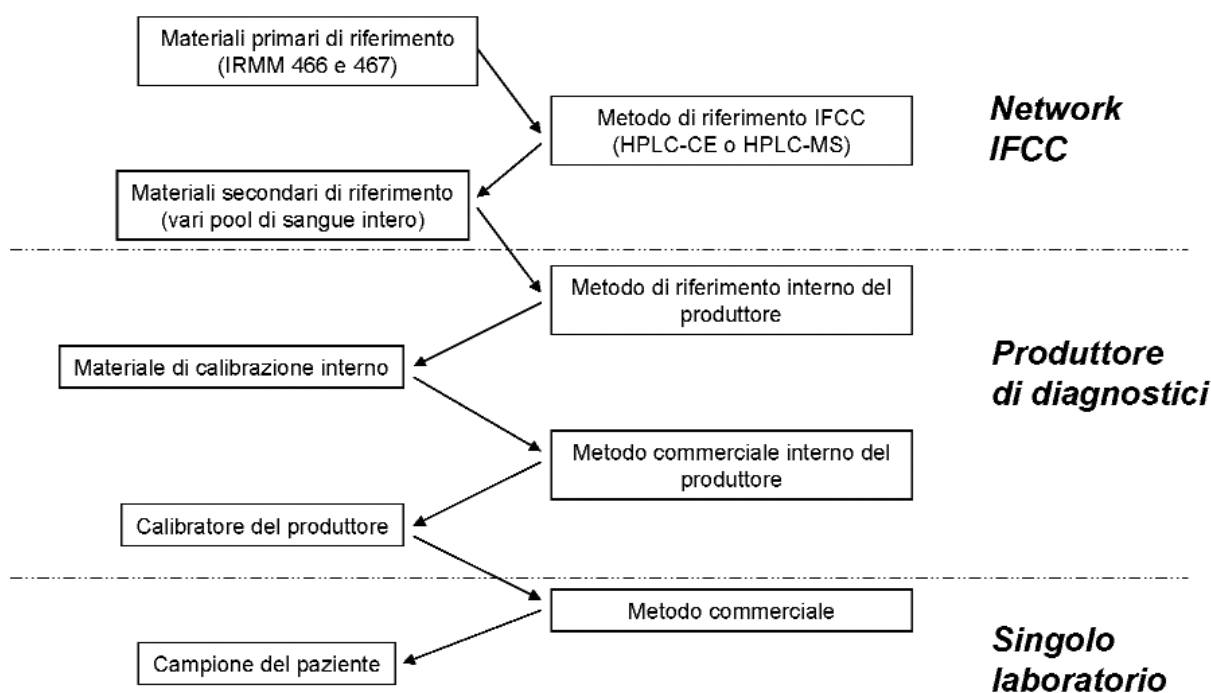


Figura 1
Il sistema di riferimento IFCC per la misura dell'HbA_{1c}.

zione delle metodiche per l'HbA_{1c} a livello dei produttori di diagnostici; questa affermazione è stata ribadita anche dal documento intersocietario australiano prima citato (52);

- 2) il nuovo sistema di riferimento IFCC deve essere utilizzato parimenti per ancorare un processo internazionale di certificazione all'interno delle reti dei sistemi secondari nazionali;
- 3) i produttori di diagnostici sono per il momento invitati a non modificare i valori di HbA_{1c} nei loro referti fintanto che non saranno stati completati ulteriori studi clinici (v. sotto).

Il gruppo di lavoro ADA/EASD/IDF ha successivamente reso noto che, al fine di evitare confusioni tra i diversi modi di intendere la standardizzazione della misura dell'HbA_{1c}, e soprattutto per cercare di aumentare il valore del dato clinico, sulla base della relazione che vi è tra HbA_{1c} e glicemia media giornaliera, che è stata oggetto di elaborazioni varie a conclusioni dello studio DCCT (81), l'HbA_{1c} potrebbe un domani essere misurata come tale e quindi refertata in termini di glicemia media giornaliera (82). Dato però che la relazione tra HbA_{1c} e glicemia media giornaliera è stata elaborata principalmente in diabetici di tipo 1, si rende necessario studiare più attentamente tale aspetto, che è quindi diventato l'oggetto di alcuni nuovi studi prospettici su diverse popolazioni nel mondo. Tali studi dovrebbero servire a ridefinire l'utilizzo dell'HbA_{1c} per la valutazione del controllo glicemico a lungo termine nei diabetici di tipo 1 e di tipo 2 (in condizioni di controllo glicometabolico stabile). Si spera che tali studi permettano di rispondere a domande quali:

- a) che relazione esiste tra glicemia media giornaliera (valutata mediante curva a 7 punti e monitoraggio continuo della glicemia in sottocute) e HbA_{1c} in pazienti diabetici di tipo 1 e 2?
- b) qual'è la relazione tra glicemia media giornaliera ed HbA_{1c} nelle diverse etnie?
- c) la relazione tra glicemia media giornaliera ed HbA_{1c} è lineare a differenti valori della prima?
- d) variazioni rapide della glicemia, a parità di glicemia media giornaliera, possono far cambiare i valori di HbA_{1c}?
- e) la relazione tra glicemia media giornaliera ed HbA_{1c} è stabile anche quando la prima aumenta oppure diminuisce?
- f) farmaci o medicamenti vari in che modo alterano tale relazione?

A studio concluso si potrà senza dubbio dare più peso clinico alla misura dell'HbA_{1c}, ma ci sono perplessità in ambito laboratoristico ad accettare la proposta che la glicemia media giornaliera possa essere refertata sulla base di una misura dell'HbA_{1c}. Il gruppo di lavoro IFCC ha preso posizione ufficiale su questo punto, raccomandando inoltre che il termine HbA_{1c} sia mantenuto nella pratica clinica (83).

Recentemente si è tenuto un meeting tra rappresentanti dell'ADA, dell'EASD, della IDF e della IFCC che hanno raggiunto infine un accordo sui modi di riportare i risultati dell'HbA_{1c} (84). I termini di questo "consensus agreement" sono riassunti nella Tabella 2. Si auspica che questo consenso possa contribuire al processo di comparabilità globale dei risultati dell'HbA_{1c}, in modo da avanzare ulteriormente nel livello di qualità delle cure fornite ai pazienti (85). Indubbiamente l'uso di nuove

Tabella 2

Punti del documento di consenso ADA-EASD-IDF-IFCC sulla standardizzazione globale dell'HbA_{1c} (adattata da rif. 84)

Punto	Oggetto	Contenuto
1	Campo di applicazione	La standardizzazione dell'HbA _{1c} deve essere implementata su scala mondiale, unitamente al sistema di riferimento ed al modo di refertazione
2	Sistema di riferimento	Il sistema di riferimento IFCC è l'unico valido per implementare la standardizzazione della misura
3	Unità di misura	I risultati dell'HbA _{1c} devono essere riportati in unità IFCC (mmol/mol) ed in unità derivate allineate al NGSP (%)
4	Interpretazione	Un valore di glicemia media stimata potrà essere riportato come aggiunta interpretativa del referto dell'HbA _{1c}
5	Interpretazione	Tutti i traguardi glicemici che appariranno nelle linee guida dovranno riportare le unità IFCC, le unità derivate NGSP e la glicemia media stimata
6	Tempistica	Le raccomandazioni dovranno essere implementate globalmente il più presto possibile

Tabella 3

Unità di misura e valori soglia per l'HbA_{1c} standardizzata IFCC e confronto con i valori attuali riferiti al sistema NGSP (adattata da rif. 85)

	Valori attuali ^a	Valori riferibili al sistema di riferimento IFCC
Intervallo di riferimento (soggetti non diabetici)	4-6%	20-42 mmol/mol
Target di trattamento nei soggetti diabetici ^b	<7%	<53 mmol/mol
Target per il cambiamento della terapia ^b	>8%	>64 mmol/mol

^a riferiti a metodiche allineate al National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).

^b secondo le raccomandazioni ADA.

unità di misura potrebbe evitare confusioni e disorientamento tra i pazienti qualora si passasse al nuovo sistema di riferimento. La Tabella 3 fornisce, a tale proposito, una possibile chiave di lettura che legherebbe le nuove unità di misura alle vecchie. E' tuttavia chiaro che solo con la piena collaborazione tra clinici, laboratoristi, industrie di diagnostici, medici di base, istituzioni pubbliche e tutti gli altri enti interessati il tanto atteso processo di standardizzazione globale delle misure dell'HbA_{1c} potrà finalmente essere concluso.

BIBLIOGRAFIA

- Kunkel HG, Wellenius G. New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 1955;122:288.
- Clegg MD, Schroeder, WA. A chromatography study of the minor components of normal adult hemoglobin including a comparison of haemoglobin from normal and phenylketuronic individuals. *J Amer Chem Soc* 1959;81:6065-9.
- Rabhar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 1968;22:296-8.
- Bunn HF, Shapiro R, McManus M, et al. Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *J Biol Chem* 1979;254:3892-8.
- Shapiro R, McMannus MJ, Zolot C, et al. Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin. *J Biol Chem* 1980;255:3120-7.
- Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM. The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 1978;200:21-7.
- Bunn HF, Haney DN, Kamin S, et al. The biosynthesis of human haemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation of haemoglobin in vivo. *J Clin Invest* 1976;57:1652-9.
- Shaklai N, Garlick RL, Bunn HF. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J Biol Chem* 1984;259:3812-7.
- Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA, et al. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes* 1991;40:101-5.
- Charonis AS, Tsilibary EC. Structural and functional changes of laminin and type IV collagen after nonenzymatic glycosylation. *Diabetes* 1992;41:49-54.
- Krishnamurti U, Rondeau E, Sraer JD, et al. Alterations in human glomerular epithelial cells interacting with nonenzymatically glycosylated matrix. *J Biol Chem* 1997;272:27966-70.
- McDonald MJ, Bleichman M, Bunn HF, et al. Functional properties of the glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J Biol Chem* 1979;254:702-7.
- Samaja M, Melotti D, Carenini A, et al. Glycosylated hemoglobins and the oxygen affinity of whole blood. *Diabetologia* 1982;23:399-402.
- John WG. Haemoglobin A_{1c}: analysis and standardisation. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1199-212.
- Shephard M, Whiting M. Assessment of the practicability and analytical performance of a point-of-care affinity chromatography haemoglobin A_{1c} analyser for use in the non-laboratory setting. *Ann Clin Biochem* 2006;43:513-5.
- Biroccio A, Urbani A, Massoud R, et al. A quantitative method for the analysis of glycated and glutathionylated hemoglobin by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2005;336:279-88.
- Wiener K, Roberts NB. Age does not influence levels of HbA_{1c} in normal subject. *QJM* 1999;92:169-73.
- Kilpatrick ES, Dominiczak MH, Small M. The effects of ageing on glycation and the interpretation of glycaemic control in type 2 diabetes. *QJM* 1996;89:307-12.
- Hudson PR, Child DF, Jones H, et al. Differences in rates of glycation (glycation index) may significantly affect individual HbA_{1c} results in type 1 diabetes. *Ann Clin Biochem* 1999;36:451-9.
- Garde AH, Hansen AM, Skovgaard LT, et al. Seasonal and biological variation of blood concentrations of total cholesterol, dehydroepiandrosterone sulfate, hemoglobin A_{1c}, IgA, prolactin and free testosterone in healthy women. *Clin Chem* 2000;46:551-9.
- Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, et al. Tests of glycaemia in diabetes. *Diabetes Care* 1995;18:896-909.
- Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effects of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes* 1992;41:167-73.
- Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A, et al. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care* 1991;14:68-72.
- Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, et al. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A_{1c} in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int* 1999;41:357-62.
- Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, et al. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986;32:B64-70.
- Nathan DM, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983;29:466-9.
- Ceriello A, Giugliano D, Dello Russo P, et al. Increased glycosylated haemoglobin A1 in opiate addicts: evidence for a hyperglycaemic effect of morphine. *Diabetologia* 1982;22:379.
- Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;47:153-63.
- Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, et al. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 1993;39:1717-23.
- Sacks D. Hemoglobin variants and hemoglobin A_{1c} analysis: problem solved? *Clin Chem* 2003;49:1245-7.
- Kouzuma T, Uemastu Y, Usami T, et al. Study of glycated amino acid elimination reaction for an improved enzymatic glycated albumin measurement method. *Clin Chim Acta* 2004;346:135-43.
- Paroni R, Ceriotti F, Galanello R, 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.
- Little RR, England JD, Wiedmeyer HM, et al. Effects of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. *Clin Chem* 1983;29:1113-5.
- Rolandsson O, Marklund SL, Norberg M, et al. Hemoglobin A_{1c} can be analyzed in blood kept frozen at -80 degrees C and is not commonly affected by hemolysis in the general population. *Metab Clin Experim* 2004;53:1496-9.
- Baglin SK, Brown AS. Two capillary blood-collection techniques for estimating glycohemoglobin compared. *Clin Chem* 1995;41:330-2.
- Voss EM, Cembrowski GS, Clasen BL, Set al. Evaluation of capillary collection system for HbA_{1c} specimens. *Diabetes Care* 1992;15:700-1.
- Vanelli M, Cerutti F, Chiarelli F, et al. Nationwide cross-

- sectional survey of 3560 children and adolescents with diabetes in Italy. *J Endocrinol Invest* 2005;28:692-9.
38. <http://www.ukneqas.org.uk/>
 39. <http://www.euroreflab.com/>
 40. <http://www.ctcb.com>
 41. <http://www.equalis.se/>
 42. <http://www.instand-ev.de/>
 43. <http://www.glicata.org>
 44. <http://www.ao-careggi.toscana.it/crrveq/>
 45. <http://www.cap.org/apps/cap.portal>
 46. <http://www.ngsp.org/prog/index.html>
 47. 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.
 48. Fraser CG, Hyltoft Petersen P. Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* 1999;45:321-3.
 49. Ricòs C, Alvarez V, Cava F, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:491-500.
 50. Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, et al. Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem* 2002;48:1116-8.
 51. Mosca A, Lapolla A, Franzini C. La determinazione della emoglobina glicata (HbA_{1c}) nel sangue: raccomandazioni. *Biochim Clin* 2000;24:183-8.
 52. Goodall I, Colman PG, Schneider HG, et al. Desirable performance standards for HbA_{1c} analysis – precision, accuracy and standardisation. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1083-97.
 53. Nordin G, Dybkaer R. Recommendation for term and measurement unit for "HbA_{1c}". *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1081-2.
 54. Ceriotti F. Gli intervalli di riferimento nel nuovo millennio. *Biochim Clin* 2007;31:254-66.
 55. American Diabetes Association. Clinical practice recommendations: standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1995;18(Suppl 1):S8-15.
 56. Mosca A, Paleari R, Dalfrà G, et al. Reference intervals for hemoglobin A_{1c} in pregnant women: data from an Italian multicenter study. *Clin Chem* 2006;52:1138-43.
 58. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
 59. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(Suppl 1):S15-35.
 60. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) 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;352:837-53.
 61. Krishnamurti U, Steffes MW. Glycohemoglobin: a primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2001;47:1157-65.
 62. International Diabetes Federation (IDF). Global guideline for type 2 diabetes 2005. www.idf.org
 63. National Committee for Quality Assurance, <http://web.ncqa.org/tabid/139/Default.aspx>.
 64. Tahara Y, Shima K. The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. *Diabetes Care* 1993;16:1313-4.
 65. Salvagno GL, Lippi G, Targher G, et al. Monitoring glycaemic control: is there evidence for appropriate use of routine measurement of glycated hemoglobin? *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1065-7.
 66. Park S, Barrett-Connor E, Wingard DL, et al. GHb is a better predictor of cardiovascular disease than fasting or postchallenge plasma glucose in women without diabetes. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1996;19:450-6.
 67. Khaw KT, Wareham N, Luben R, et al. Glycosylated haemoglobin, diabetes and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). *Br Med J* 2001;322:15-8.
 68. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, et al. Association of hemoglobin A_{1c} with cardiovascular disease and mortality in adults: the European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk. *Ann Intern Med* 2004;141:413-20.
 69. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:S37-42.
 70. Ko GT, Chan JC, Yeung VT, et al. Combined use of a fasting plasma glucose concentration and HbA_{1c} or fructosamine predicts the likelihood of having diabetes in high-risk subjects. *Diabetes Care* 1998;21:1221-5.
 71. U.S. Department of Health and Human Services. National Center for Health Statistics. National Health and Nutrition Examination Survey, III 1988-94, NHANES III Examination Data File. Hyattsville: Center for Disease Control and Prevention, 1997.
 72. Arnquist H, Wallensteen M, Jeppsson JO. Standardization of longterm glucose measurements established. *Lakartidningen* 1997;50:4789-90.
 73. Shima K, Endo J, Oimomi M, et al. Inter-laboratory difference in HbA_{1c} measurement in Japan. A report of the Committee on an inter-laboratory standardization of HbA_{1c} determination, the Japan Diabetes Society. *J Jpn Diabetes Soc* 1994;37:855-64.
 74. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardisation of HbA_{1c}/glycohemoglobin determinations. *JIFCC* 1996;9:62-7.
 75. Finke A., Kobold U, Hoelzel W, et al. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA_{1c} determinations. *Clin Chem Lab Med* 1998;36:299-308.
 76. Kobold U, Jeppsson JO, Dülffer Th, et al. Candidate reference methods for HbA_{1c} based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997;43:1944-51.
 77. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.
 78. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A_{1c} in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004;50:166-74.
 79. <http://www.ifcchba1c.net/>
 80. Report of the ADA/EASD/IDF Working Group of the HbA_{1c} Assay, London, UK, January 2004. *Diabetologia* 2004;47:R53-4.
 81. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, et al. Defining the relationship between plasma glucose and HbA_{1c}: analysis of glucose profiles and HbA_{1c} in the diabetes control and complications trial I. *Diabetes Care* 2002;25:275-8.
 82. Sacks DB for the ADA/EASD/IDF working group for the HbA_{1c} assay. Global harmonization of hemoglobin A_{1c}. *Clin Chem* 2005;51:681-3.
 83. Mosca A, Goodall I, Hoshino T, et al. Global standardization of glycated hemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:1077-80.
 84. Hicks J, Mueller M, Panteghini M, et al. American Diabetes Association (ADA), European Association for the

- Study of Diabetes (EASD), International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) and International Diabetes Federation (IDF) consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A_{1c} measurement. *Biochim Clin* 2007;31:359-60.
85. Panteghini M, John WG. Implementation of haemoglobin A_{1c} results traceable to the IFCC reference system: the way forward. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:942-4.