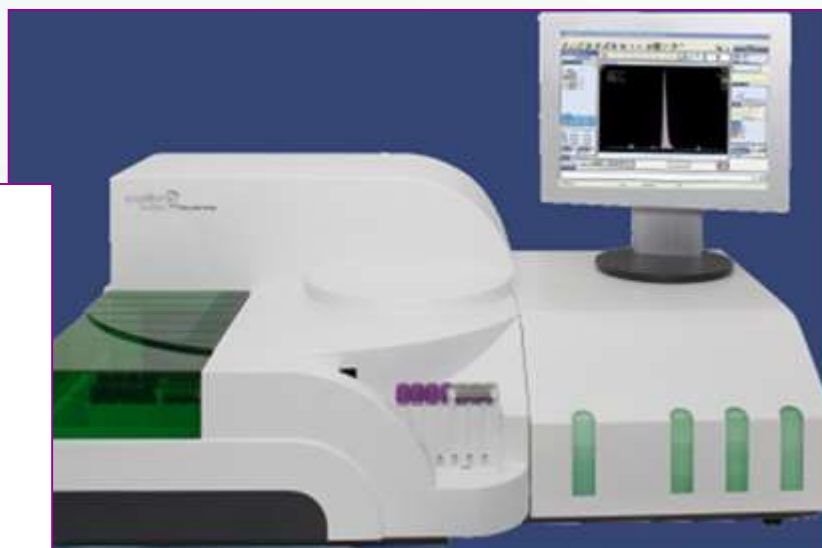
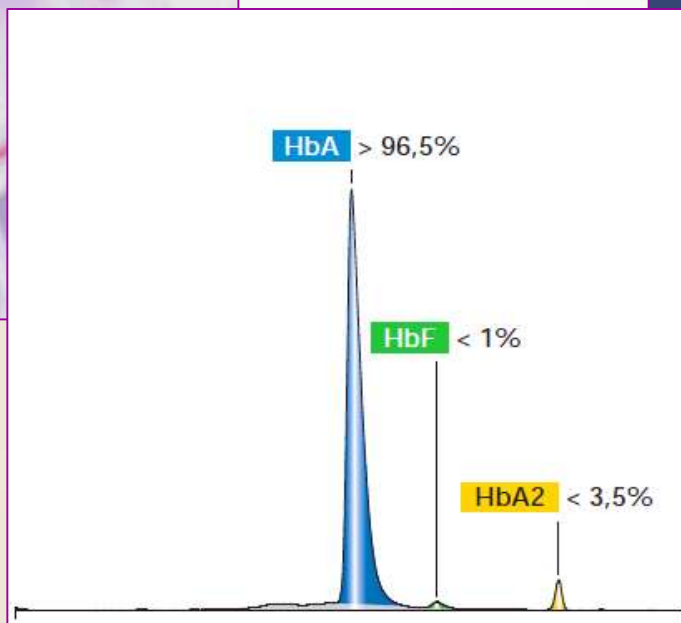


Determinación de HbA1c por Electroforesis Capilar...

Mucho más que un resultado



Dra. Carla A. Lucarelli
Depto de Química Clínica
IACA LABORATORIOS
10 de diciembre del 2020

Rol del Laboratorio



VENTAJAS

- No requiere ayuno
- Mayor estabilidad preanalítica
- Menor alteración por estrés y enfermedad

DESVENTAJAS

- Baja sensibilidad en el punto de corte
- Mayor costo
- Limitada disponibilidad
- Falla en la correlación entre A1C y glucosa promedio en ciertos individuos

Table 2
FPG ≥ 1

2-h PG
equiv

A1C ≥ 6
to the

Table 2.5—Crite

FPG 100 mg/dL (5

2-h PG during 75-

A1C 5.7–6.4% (39

FPG, fasting plasm
oral glucose toler

e for at

OR

performe

OR

atory us

OR

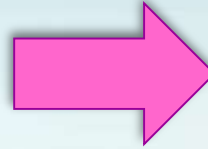
ol/L) (IC

se tolera
risk is

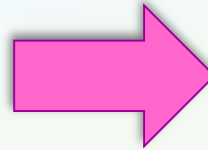
A1C

Recommendations

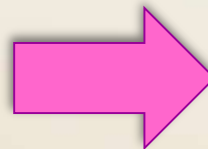
- 2.1** To avoid misdiagnosis or missed diagnosis, the A1C test should be performed using a method that is certified by the NGSP and standardized to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) assay. **B**
- 2.2** Marked discordance between measured A1C and plasma glucose levels should raise the possibility of A1C assay interference due to hemoglobin variants (i.e., hemoglobinopathies) and consideration of using an assay without interference or plasma blood glucose criteria to diagnose diabetes. **B**
- 2.3** In conditions associated with an altered relationship between A1C and glycemia, such as sickle cell disease, pregnancy (second and third trimesters and the postpartum period), glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, HIV, hemodialysis, recent blood loss or transfusion, or erythropoietin therapy, only plasma blood glucose criteria should be used to diagnose diabetes. **B**



Método certificado por el NGSP y estandarizado para el estudio del control y complicaciones de la Diabetes (DCCT)



Usar un ensayo sin interferencia por hemoglobinopatías



En condiciones asociadas a una relación alterada entre A1C y glucemia, no debe ser usada como criterio de diagnóstico



Precision medicine in diabetes: a Consensus Report from the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD)

Wendy K. Chung^{1,2} • Karel Erion³ • Jose C. Florez^{4,5,6,7,8} • Andrew T. Hattersley⁹ • Marie-France Hivert^{5,10} • Christine G. Lee¹¹ • Mark I. McCarthy^{12,13,14} • John J. Nolan¹⁵ • Jill M. Norris¹⁶ • Ewan R. Pearson¹⁷ • Louis Philipson^{18,19} • Allison T. McElvaine²⁰ • William T. Cefalu¹¹ • Stephen S. Rich^{21,22} • Paul W. Franks^{23,24}

Precision diagnosis in clinical practice

Interpreting HbA_{1c} in diagnosis and monitoring Data and outcomes from the widespread use of HbA_{1c}, rather than blood glucose levels, for diagnosis has led to a precision approach for the diagnosis of diabetes. The level of HbA_{1c} will depend on factors that impact haemoglobin and red cell stability as well as average glucose values [10]. Genetic testing can reveal unsuspected variants that alter HbA_{1c}. Thus, knowledge of the patient's ancestry and specific genetic information can guide interpretation of assay results for diagnosis and the monitoring of blood glucose.

El nivel de HbA1c dependerá de los factores que afectan a la hemoglobina

El conocimiento de variantes de hemoglobina no conocidas o antecedentes genéticos pueden guiar en la interpretación de los resultados

Guía de Práctica Clínica Nacional sobre Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la **Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)** 2019

Dirección Nacional de Abordaje Integral de Enfermedades No Transmisibles



Ministerio de Salud Argentina

Rastreo y diagnóstico

Los criterios **diagnósticos de diabetes** son:

- **Glucemia plasmática en ayunas (GPA):** dos determinaciones con valores iguales o mayores a 126 mg/dl, realizadas en 2 días distintos.
- **Glucemia medida al azar:** una determinación de glucemia plasmática con valor mayor o igual a 200 mg/dl más la presencia de síntomas cardinales de diabetes (pérdida de peso, poliuria, polidipsia, polifagia).
- **Prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG75):** dos determinaciones de glucemia plasmática dos horas después de una carga oral con 75 grs de glucosa anhidra disueltos en 375 ml de agua, igual o mayor a 200 mg/dl realizadas en dos días distintos.
- **Hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) estandarizada:** dos determinaciones con valores iguales o mayores a 6,5% realizadas en dos días distintos.

Condicional

Calidad de evidencia

moderada

2

en
contra

La hemoglobina A1c (HbA1c) presenta baja sensibilidad como prueba de diagnóstico de DM2, asociada a mayor costo, menor disponibilidad y falta de estandarización en la mayor parte de los efectores de nuestro medio.

Se sugiere no utilizar la HbA1c como prueba inicial para la detección de DM2.

Marco GRADE-EtD R2

Conclusion del panel: el panel acordó con la valoración de la evidencia realizada y consideró que la HbA1c no aporta beneficio comparado con glucemia plasmática en ayunas (GPA), la cual presenta sensibilidad similar usando como método de referencia la PTOG75 (se superponen los intervalos de confianza-IC95%-): GPA 126 mg/dl: S=56% (IC95% 36,6 a 73,8); HbA1c 6,5%: S=68,4% (IC95% 46,6 a 84,3). A su vez la glucemia plasmática es más reconocible por los pacientes; está ampliamente disponible y es de bajo costo. El panel alcanzó consenso en definir la fuerza y dirección de la recomendación como condicional en contra.

¿Qué es la HbA1c?

96% HbA
< 3,0% HbA2
< 1% HbF

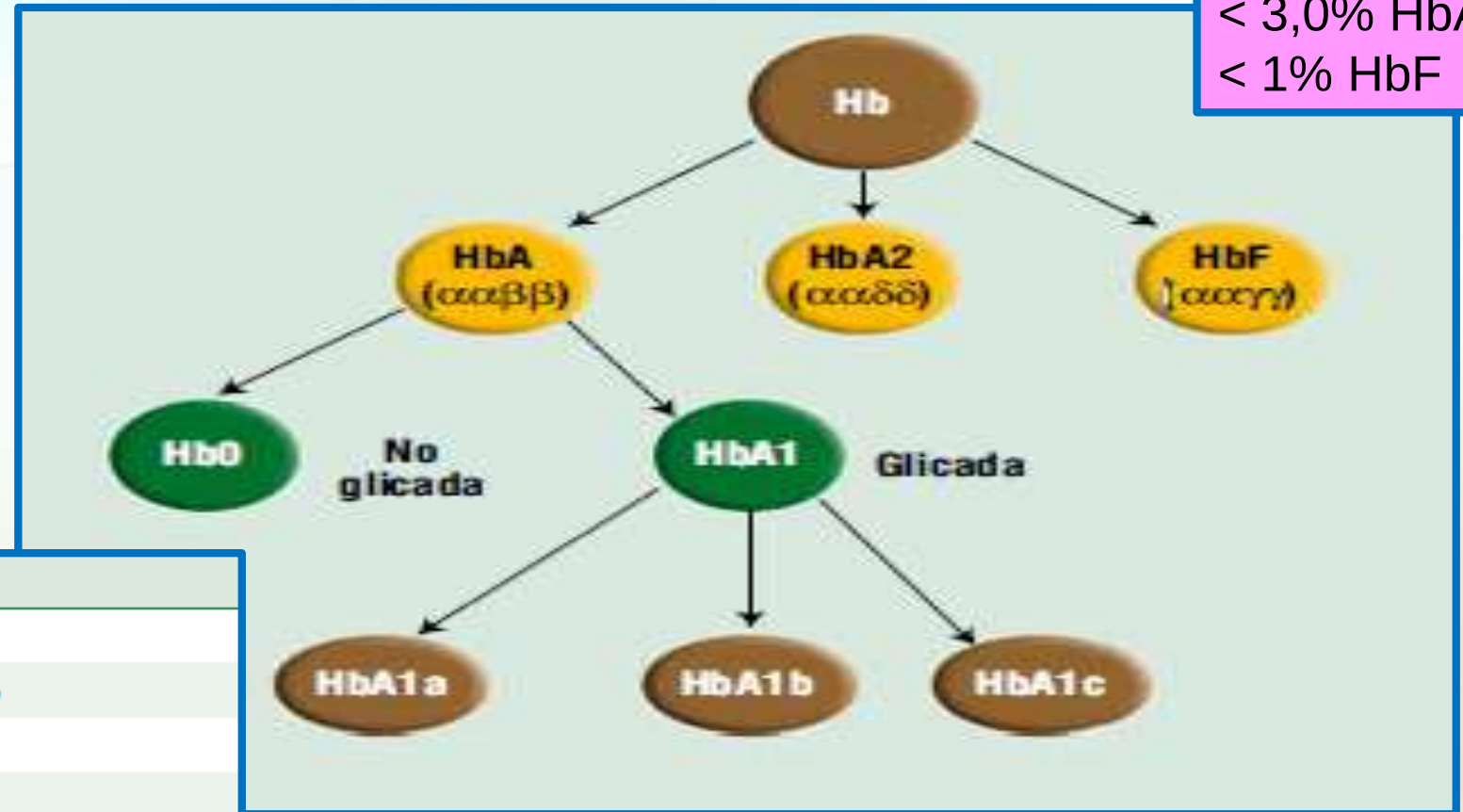


Tabla 1. Tipos de hemoglobinas glicadas

Producto final	Reacción
HbA1a1	Glicación con fructuosa 1, bifosfato
HbA1a2	Glicación con glucosa 6 fosfato
HbA1b	Glicación con ácido pirúvico
HbA1c	Glicación con glucosa
L HbA1c	Denota la fracción lábil de la HbA1c, o la fracción aldimina
S HbA1c	Denota la fracción estable de la HbA1c, o la fracción cetoamina

¿Cuál es el método de referencia?

Haemolysate
↓
Enzyme

Pasos:
Separación y
análisis de los
componentes
HbA1c

No se realizan en
laboratorios de rutina

Figura 1. HbA1c-peptide

Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser . . .

concentration of HbA1c in the sample
[HbA_{1c}] = concentration of HbA1c in the sample
[HbA₀] = concentration of HbA0 in the sample
Hb_{tot} := total concentration [HbA_{1c}] + [HbA₀]
z_{conc} := percent HbA_{1c} in the sample
$$z_{\text{conc}} = \frac{100 \cdot x}{x + y} = \frac{100 \cdot x}{\text{Hb}_{\text{tot}}} \quad \text{Hb}_{\text{tot}} = x + y.$$

Clin Chem Lab Med 2002; 40(1):78–89

Métodos de Rutina

Diferencias en las
moléculas de la
hemoglobina glicada y
la hemoglobina
no-glicada

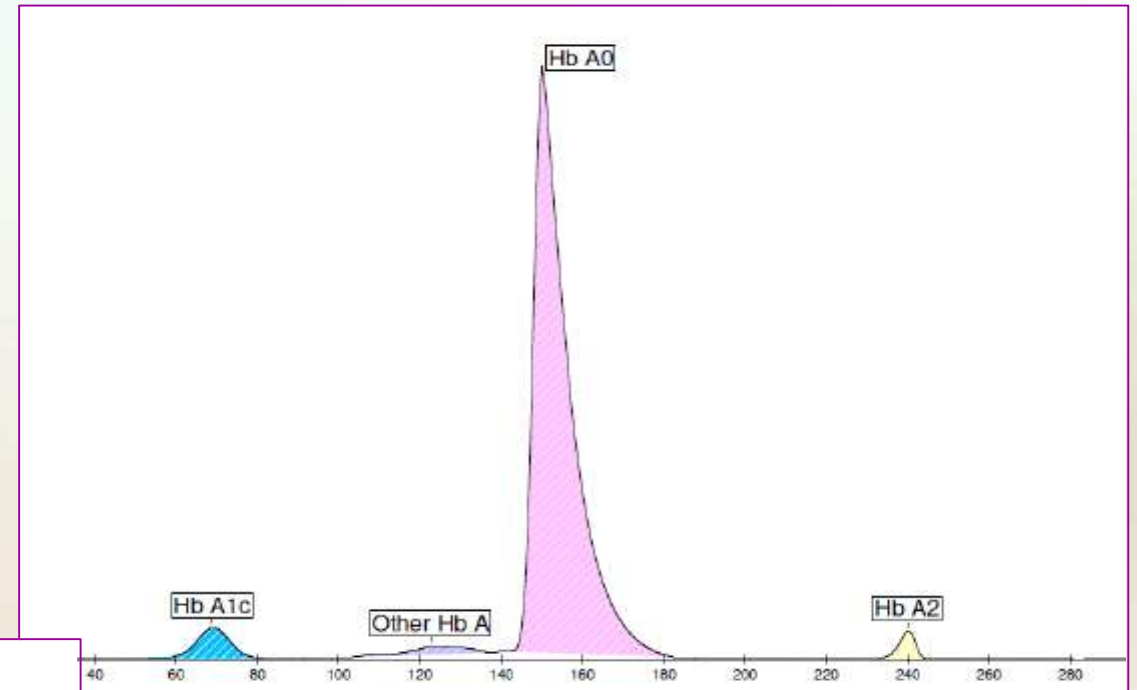
HPLC con
intercambio de iones

Ensayos
enzimáticos

ESTANDARIZACIÓN DE LA IFCC

Electroforesis Capilar

- Separación de moléculas cargadas en función de su movilidad electroforética
- Permite una cuantificación precisa de la fracción HbA1c de la hemoglobina



$$\%HbA1c = 100 \times \left[\frac{\text{HbA1c area}}{\text{HbA1c area} + \text{HbA0 area}} \right]$$

Elección de un método

- Exactitud
- Método certificado por el NGSP y estandarizado para el estudio del control y complicaciones de la Diabetes (DCCT)
- Evite y detecte interferencias analíticas y clínicas
- Valor agregado en el informe emitido



- Velocidad de proceso
- Cumplimiento de promesa de resultados
- Volumen de muestra
- Conexión con el SIL
- Costo

Exactitud

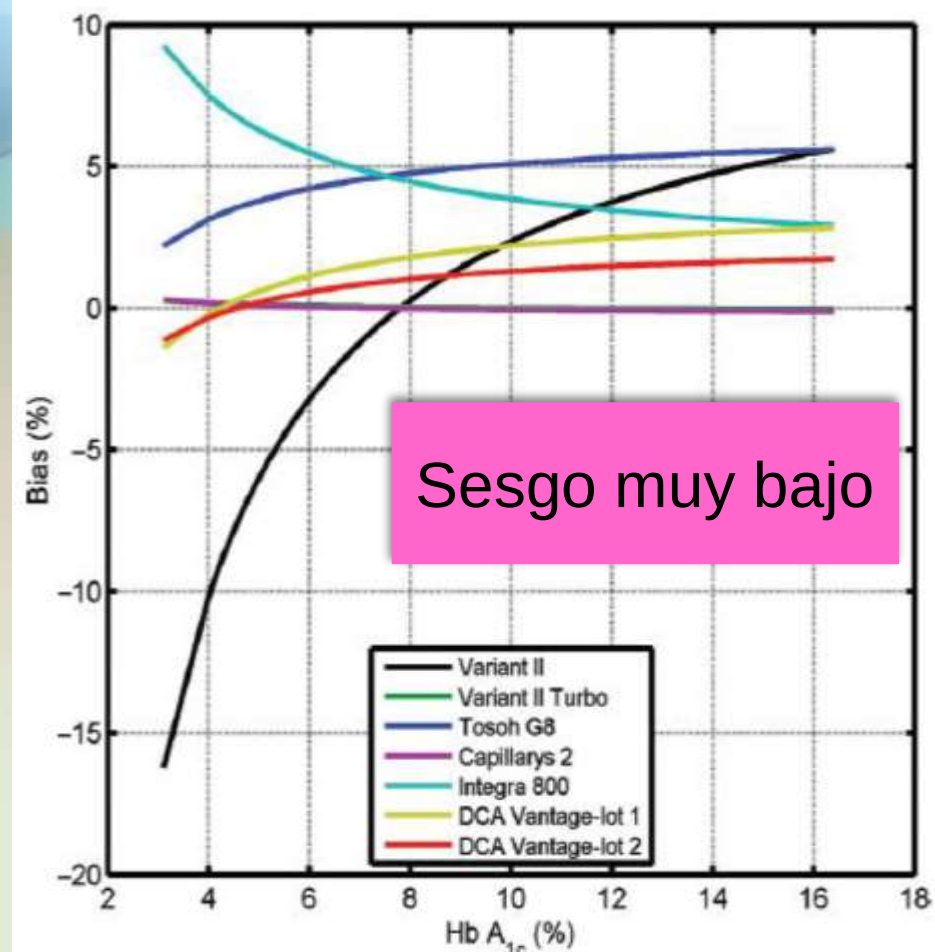


Table 1. Assay performance characteristics across platforms/sites: imprecision and bias across 2 QC levels.

Assay platform	Low QC			High QC			Linear regression ^c	r^2
	Mean	% Bias ^a	% CV ^b	Mean	% Bias	% CV		
Variant II	5.09	-4.99	1.43	9.74	2.00	1.33	$1.107x - 0.834$	0.991
Variant II Turbo	5.18	-0.08	2.97	10.07	0.10	1.81	$0.999x + 0.012$	0.999
Tosoh G8	5.75	3.99	1.28	9.60	4.98	0.80	$1.064x - 0.130$	0.999
Capillars 2	5.24	-0.33	1.66	7.93	-0.01	1.33	$0.998x + 0.016$	0.999
Integra 800	5.61	5.76	2.40	9.90	4.07	1.18	$1.014x + 0.242$	0.997
DCA Vantage-lot 1	5.31	-0.34	1.88	10.31	2.72	2.65	$1.038x - 0.161$	0.989
DCA Vantage-lot 2	5.23	-0.37	1.93	10.49	1.73	1.81	$1.024x - 0.109$	0.991

^a % Bias = $100 \times (\text{observed mean} - \text{assigned value}) / \text{assigned value}$.

^b Precision calculations follow CLSI EP-5A.

^c Linear regression of assay results compared to NGSP results measured on a Tosoh HPLC.

Cv < 2%

Utilization of assay performance characteristics to estimate hemoglobin A_{1c} result reliability. Clin Chem. 2014 Aug;60(8):1073-9.

➤ Cambio clínicamente significativo : 0,5%

➤ Valor de referencia para el cambio

VRC%

CVa% = Coeficiente de
variación analítico.

CVi = Coeficiente de
variación intra individuo

estadístico

Asegura que el cambio de
0,5% es estadísticamente
significativo y no debido a la
variación analítica

CVi HbA_{1c}
CVa del método

7,64%

HbA_{1c} 7,0% +/-0,4

+/-0,5

Elección de un método

- Exactitud
- Método certificado por el NGSP y estandarizado para el estudio del control y complicaciones de la Diabetes (DCCT)
- Evite y detecte interferencias analíticas y clínicas
- Valor agregado en el informe emitido



- Velocidad de proceso
- Cumplimiento de promesa de resultados
- Volumen de muestra
- Conexión con el SIL
- Costo

Método Certificado por NGSP-IFCC

List of NGSP Certified Methods (Updated 12/20, listed by date certified)								
Manufacturer	Method/ Instrument	Method Type	Date Certified	Reagent Lot	Calibrator Lot	Calibrator Assigned Value	Column Lot	Secondary Reference Laboratory
Sebia	Capillarys HbA1c on Capillarys 2 Flex Piercing %NGSP=0.0914 8 x [IFCC] (mmol/mol) + 2.152	Capillary Electro- phoresis	June '20	26097/01, 31108/01, 02058/01	06029/01, 07029/01	36.5, 86.9 mmol/mol	-	European Reference Lab ESRL#10

Elección de un método

- Exactitud
- Método certificado por el NGSP y estandarizado para el estudio del control y complicaciones de la Diabetes (DCCT)
- Evite y detecte interferencias analíticas y clínicas
- Valor agregado en el informe emitido



- Velocidad de proceso
- Cumplimiento de promesa de resultados
- Volumen de muestra
- Conexión con el SIL
- Costo

Interferencias Clínicas

Interferencia negativa

Situaciones que acorten la vida media del eritrocito

Alteración de la glicación

Tratamiento con antirretrovirales e hipertrigliceridemia

Interferencia positiva

Situaciones que prolonguen la vida media del eritrocito

Interferencias Analíticas

➤ HbA1c Lábil

- se forma
- en

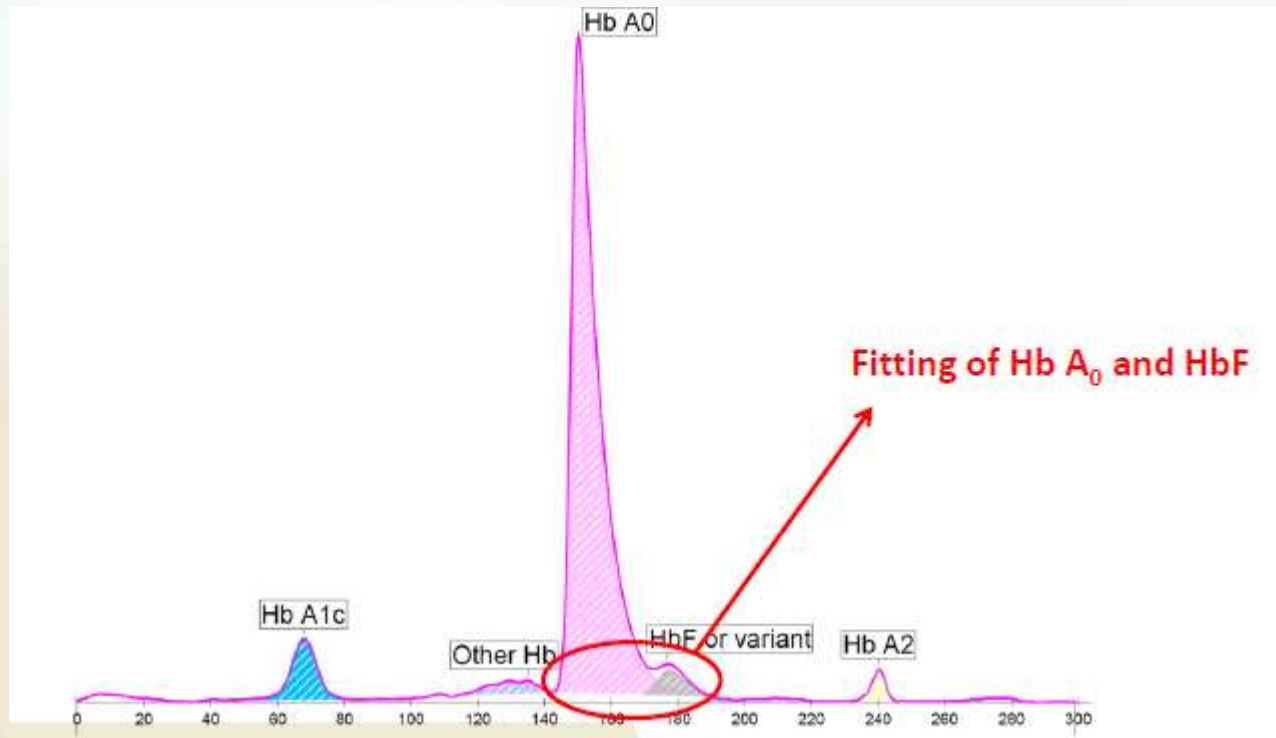
No se observa pico adicional y no hay modificación en la áreas de los picos HbA0 y HbA1c



- El ácido
- El ácido úrico en suero se une a la valina N-terminal de la globina de la HbA

- Hemoglobina Fetal

Puede observarse en casos de b-talasemia, enfermedad de células falciformes, embarazo, anemia, leucemia, diabetes insulino dependiente, hipertiroidismo, persistencia hereditaria de HbF.



Fácil de
visualizar.
No interfiere
hasta 23%

Hemoglobinopatías

Modificación de la secuencia de aminoácidos de las cadenas de globina que generan hemoglobina anormal

Las variantes de hemoglobina y sus formas glicadas pueden interferir con la

medición de la HbA1c a través de

**Interferencia
clínica**

Alteración de la vida media del GR

los mecanismos de la técnica utilizada

**Interferencia
analítica**

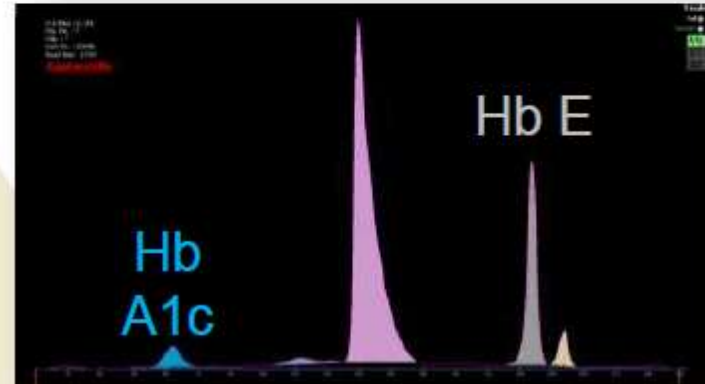
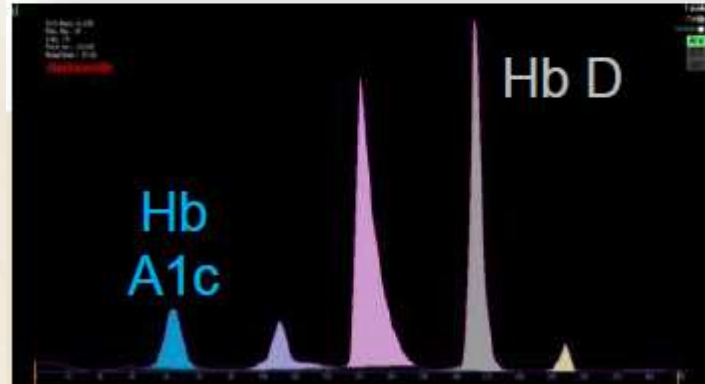
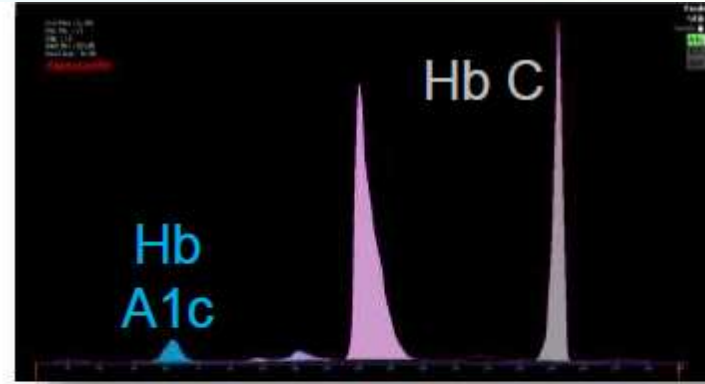
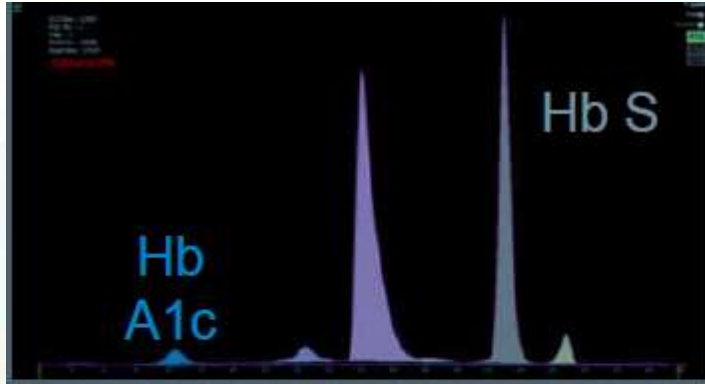
Desempeño del método

Interferencia clínica

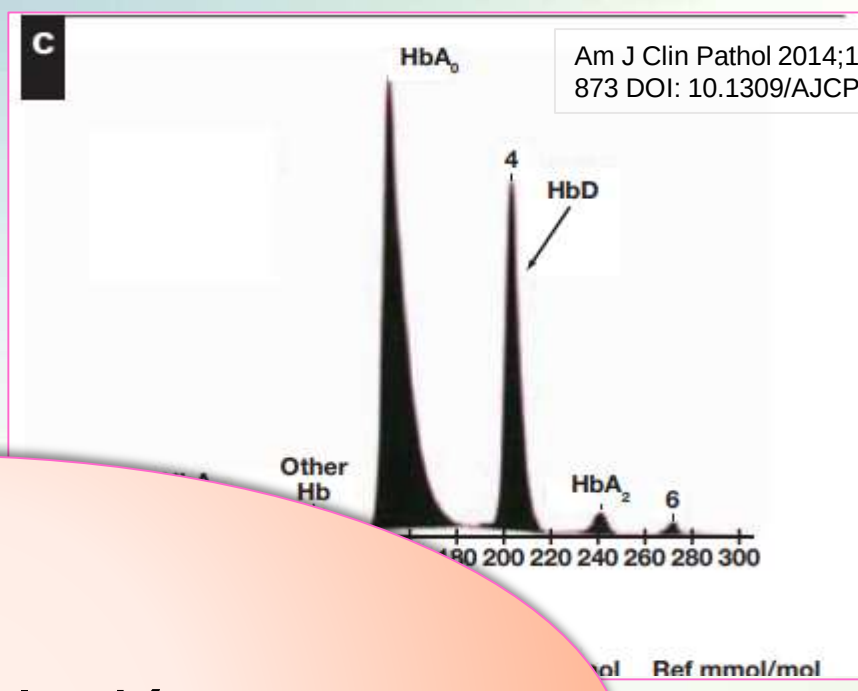
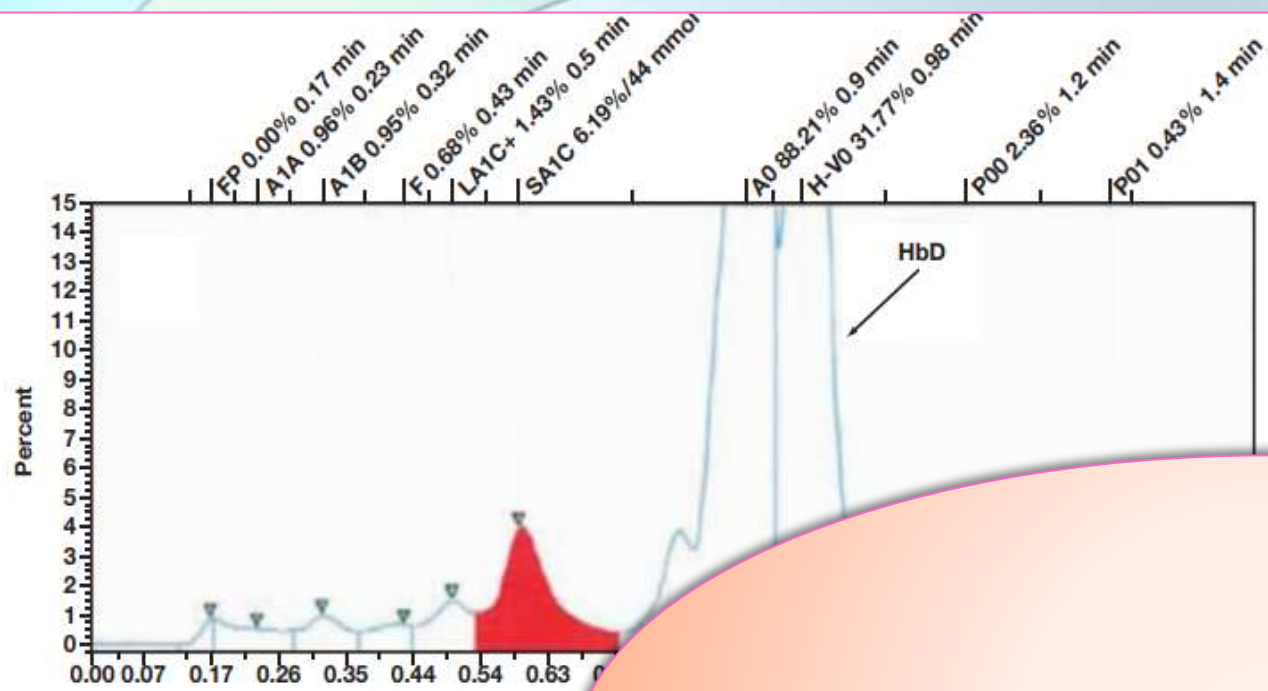
Hb	Average RBC Lifespan in Days (n)
Hb A	120
Hb S	93 (3) ²⁰
Hb E	No Data
Hb C	87 (6) ¹⁸
Hb D	115 (3) ¹⁹

Puede inducir
a una mala
interpretación

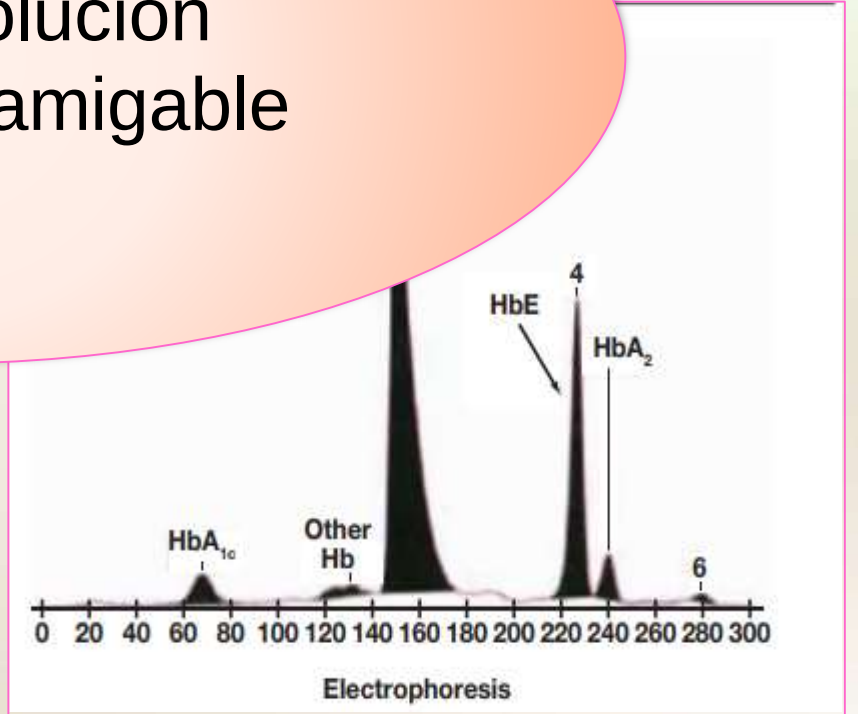
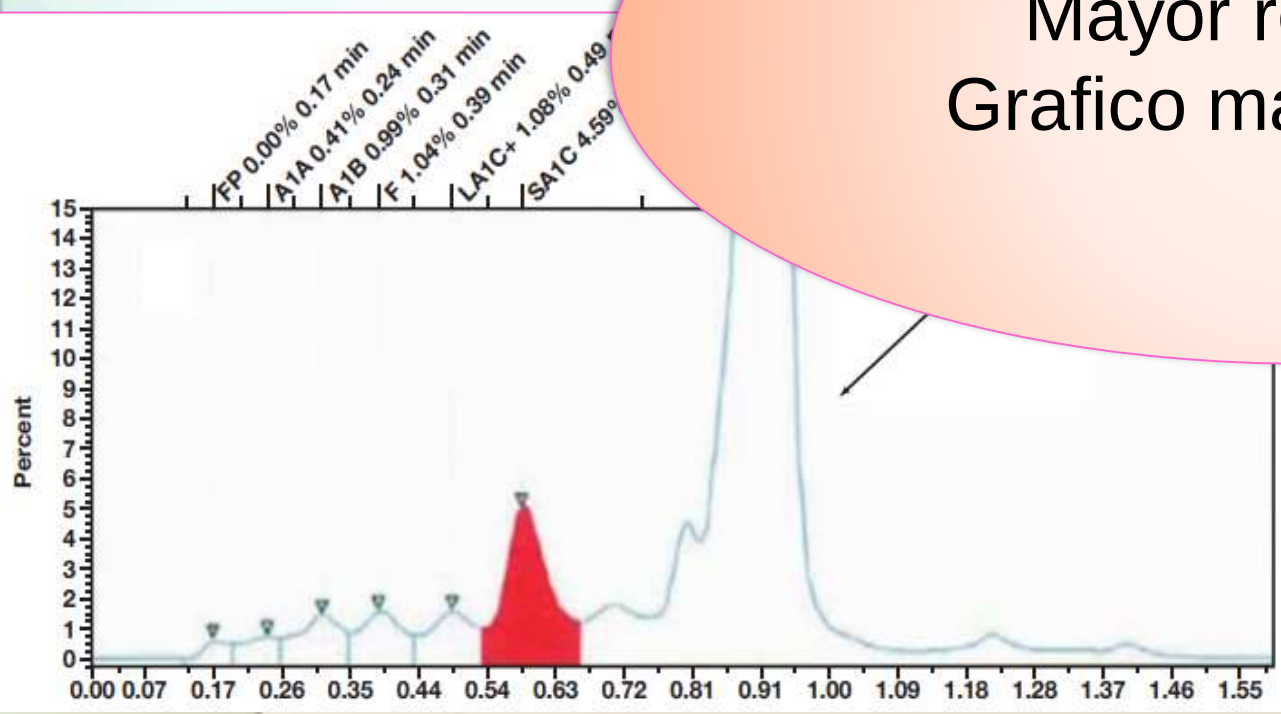
Interferencia analítica



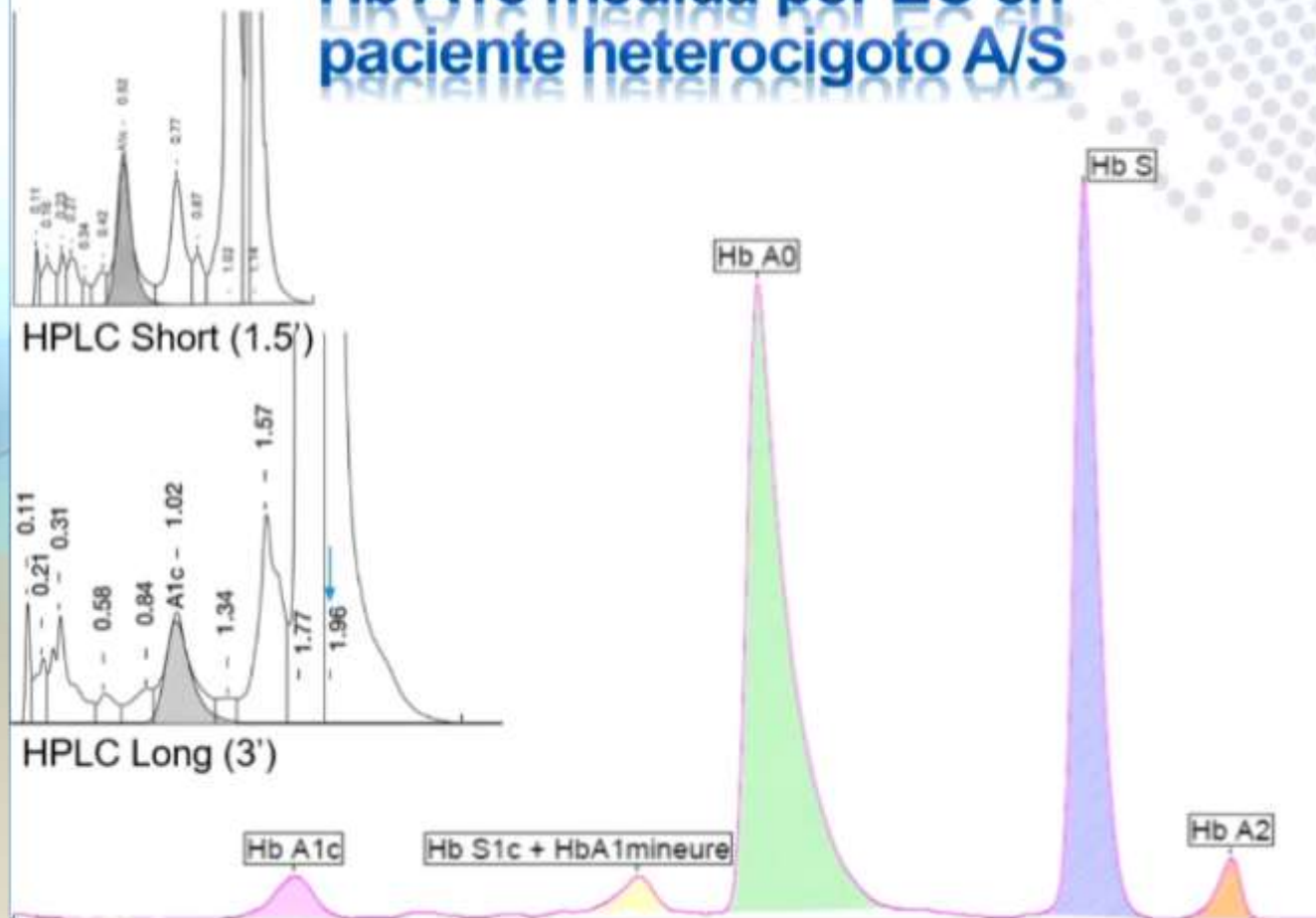
La alta resolución de la electroforesis capilar permite una separación perfecta de las variantes de hemoglobina más comunes de la HbA1c y de HbA0.



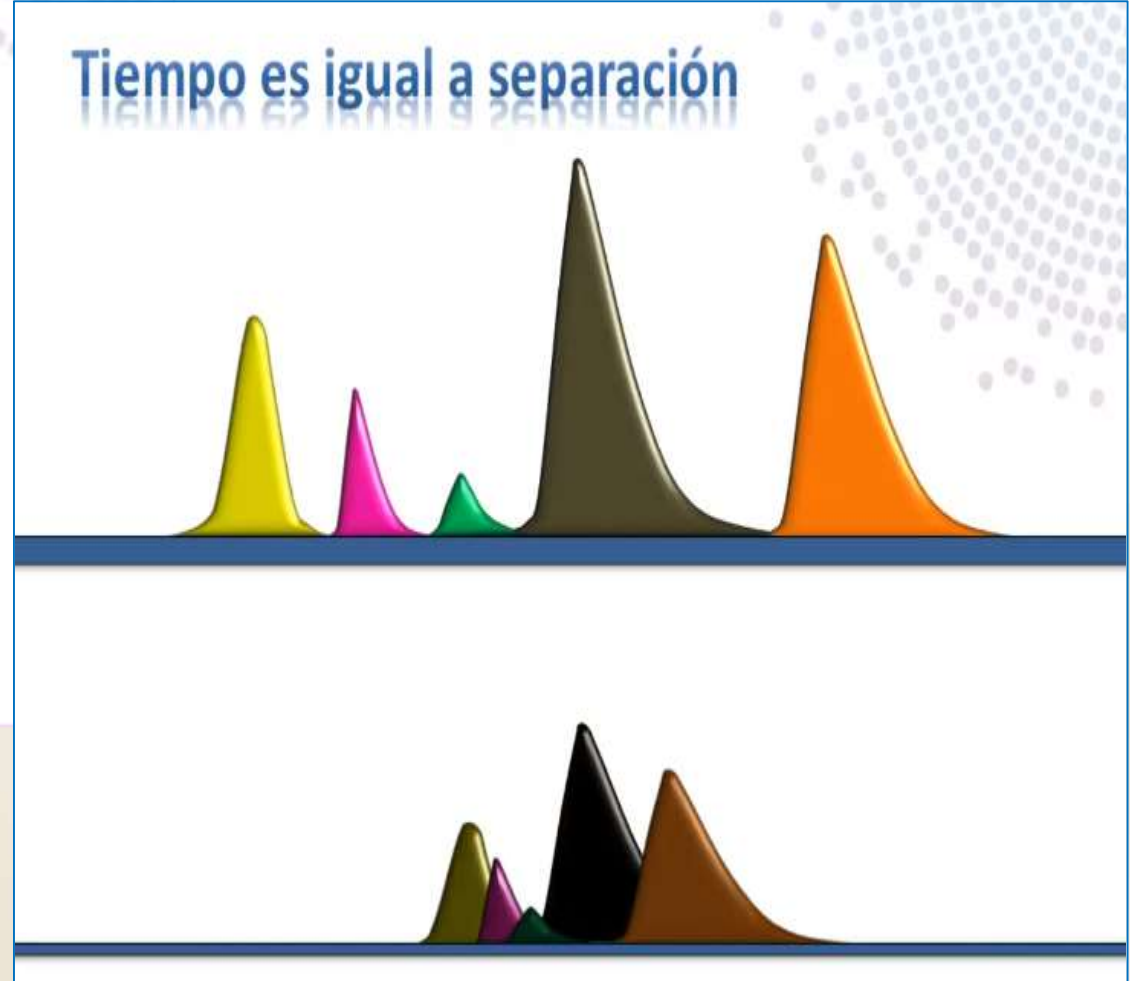
Mayor resolución
Grafico más amigable



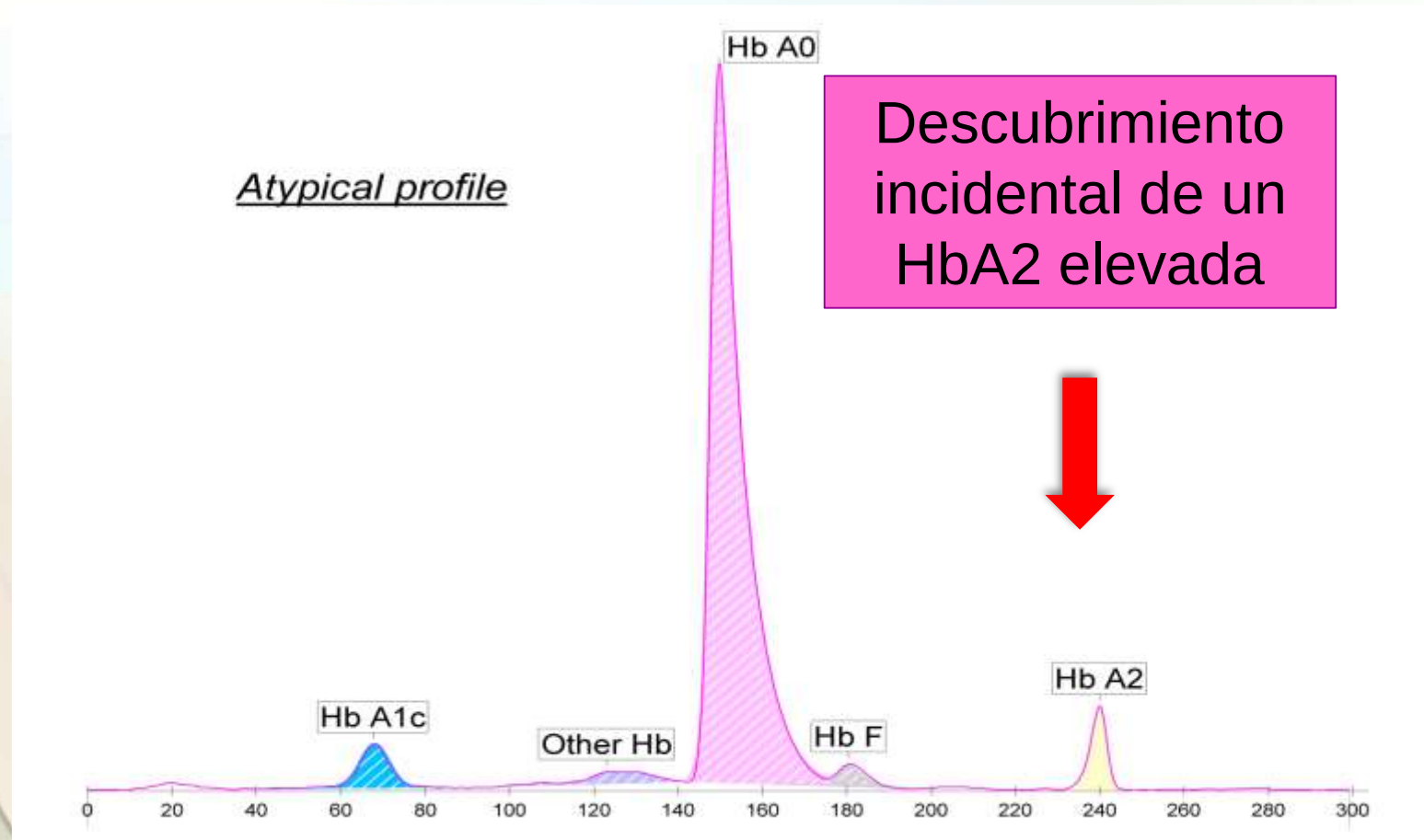
Hb A1c medida por EC en paciente heterocigoto A/S



Tiempo es igual a separación



HbA1c y β Talasemia

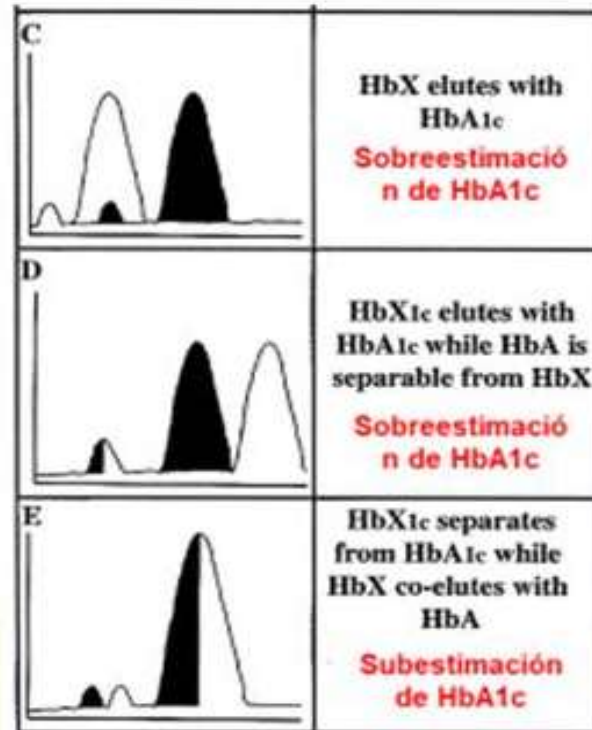
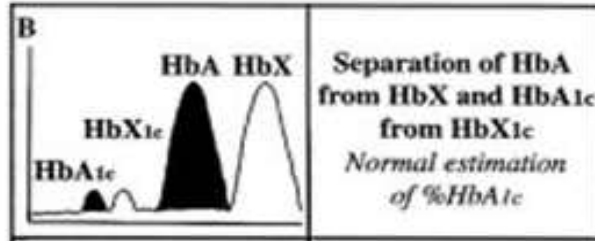


Presencia de variantes de Hb

(interferencia analítica)

Con impacto directo de la variante de Hb en la cuantificación de HbA1c

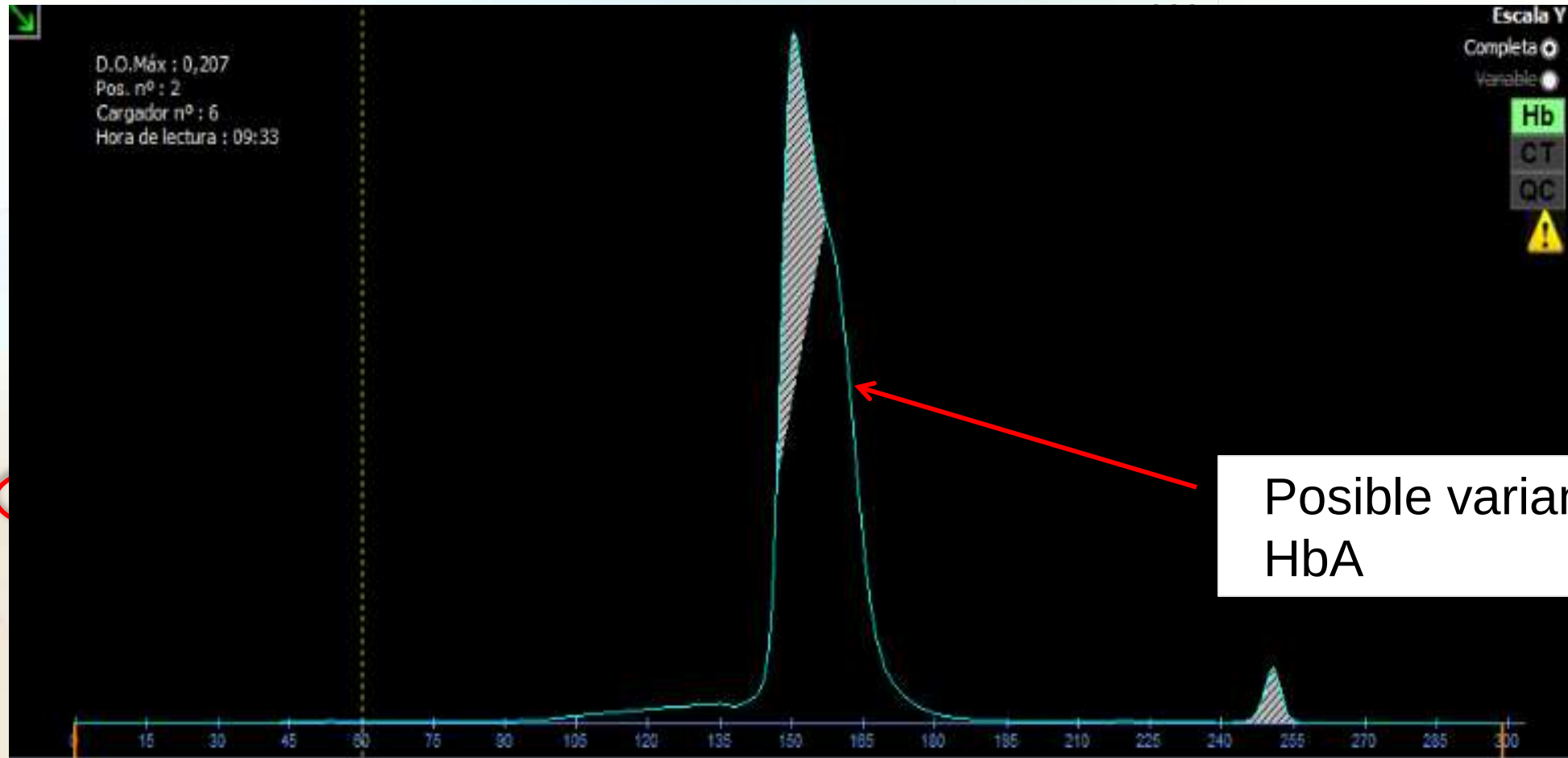
Sin impacto de la variante de Hb en la cuantificación de HbA1c



¿Antes que pasaba?



Casos atípicos



Valores Fracciones

Nombres	%
Hb A	74,6 <
Hb F or Hb	21,6 >
Hb A2	3,8 >

LOTE:	CAD.:
02108/80	2021/10
23108/01	2021/10
30036/80	2019/03

Ratio 1	Ratio 2
1,00	1,00

Gestión Mínimos



Variante de
 hemoglobina que
 migra en zona de
 hemoglobina fetal

del 05/12/2020

Valores Fracciones

Nombres	%
(A1c)	10,8
Otra Hb	2,0
Hb A0	85,0
Hb A2	2,2

bA1c

mmol/mol % cal

LOTE:	CAD.:
13010/01	2023/01
03079/01	2022/07
05030/01	2023/03

Ratio 1

1,00

Ratio 2

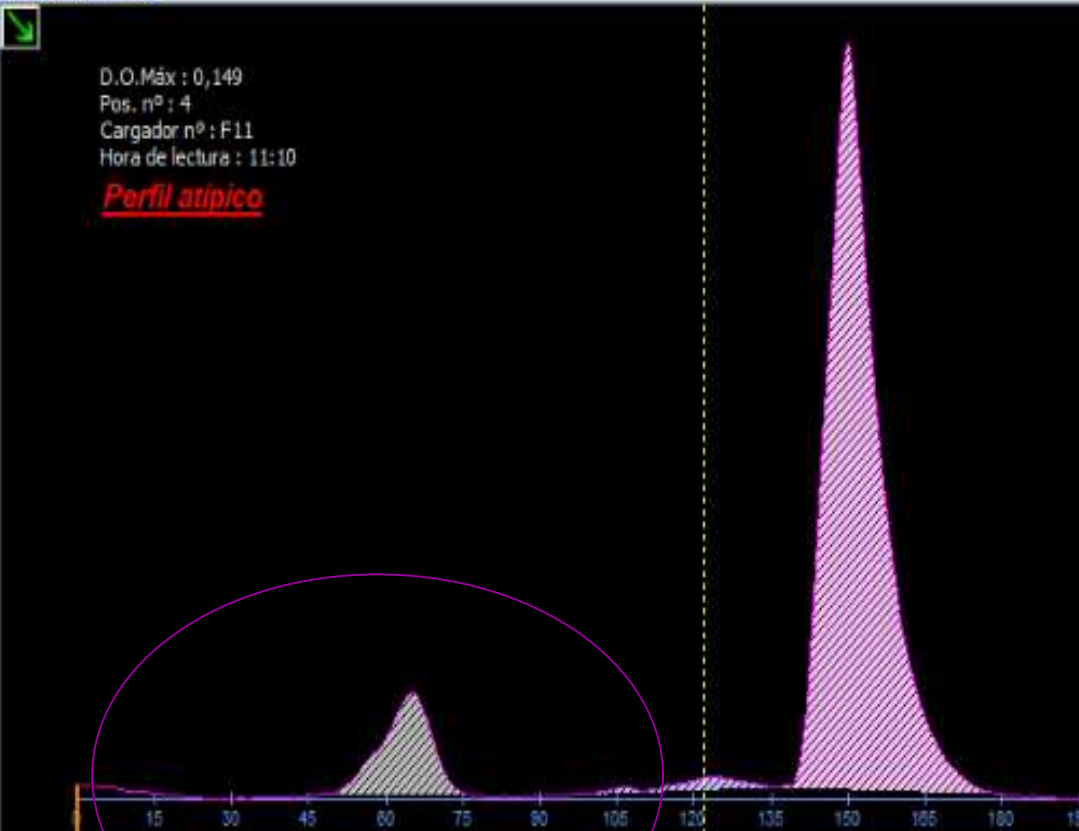
1,00

Gestión Mínimos

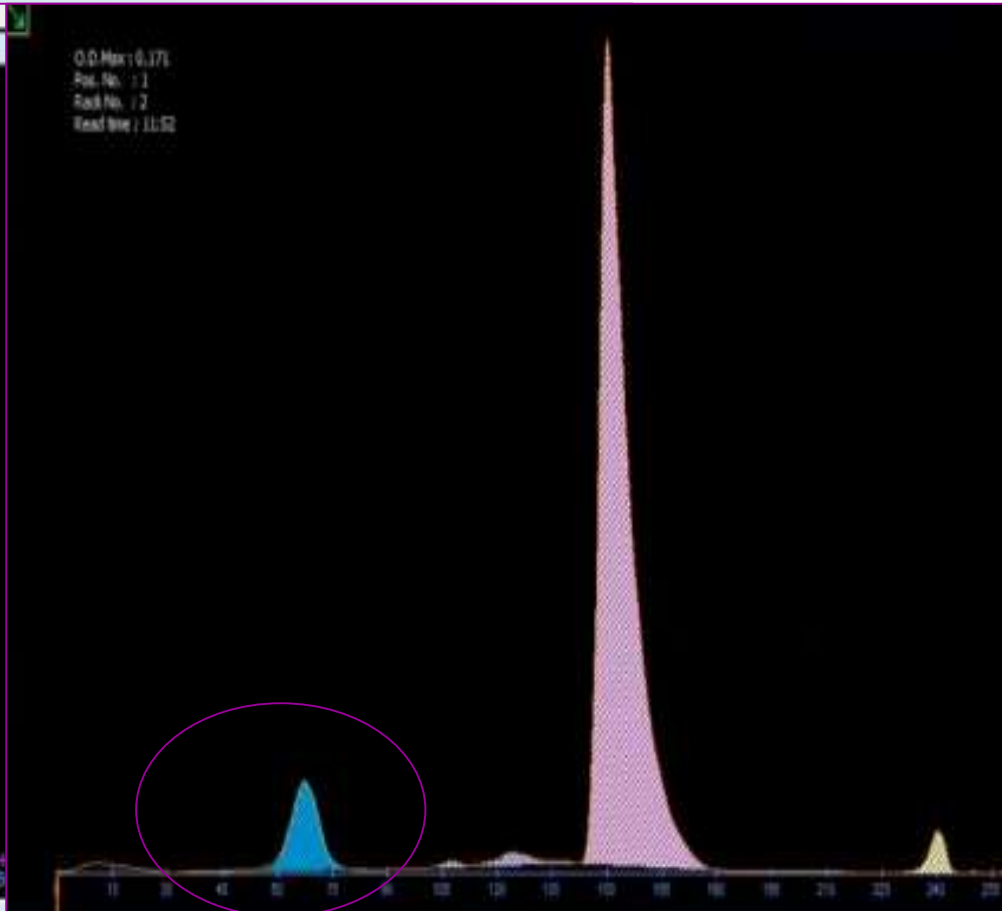


D.O. Máx : 0,149
Pos. nº : 4
Cargador nº : F11
Hora de lectura : 11:10

Perfil atípico



O.D. Máx : 0,171
Pos. No. : 1
Rad. No. : 12
Read time : 11:52



Verdecchia, G; Ruiz Díaz, MS; Lucarelli C

IACA Laboratorios, San Martín 68, Bahía Blanca, Argentina, CP 8000, quimicaclinica@iaca.com.ar

Introducción

La Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) es de gran importancia en el seguimiento y diagnóstico de la Diabetes Mellitus, por lo que es esencial que su medida sea exacta y precisa. Esta puede ser afectada por diversas situaciones clínicas, entre ellas la presencia de hemoglobinopatías. Estos trastornos son desórdenes hereditarios autosómicos recesivos, generalmente asintomáticos o con síntomas leves. Cada año nacen en el mundo más de 300.000 niños con hemoglobinopatías graves. Nuestro laboratorio recibe muestras de todo el país para realizar la determinación de HbA1c, utilizando la metodología Electroforesis Capilar. Dentro de los resultados obtenidos, se observan perfiles atípicos.

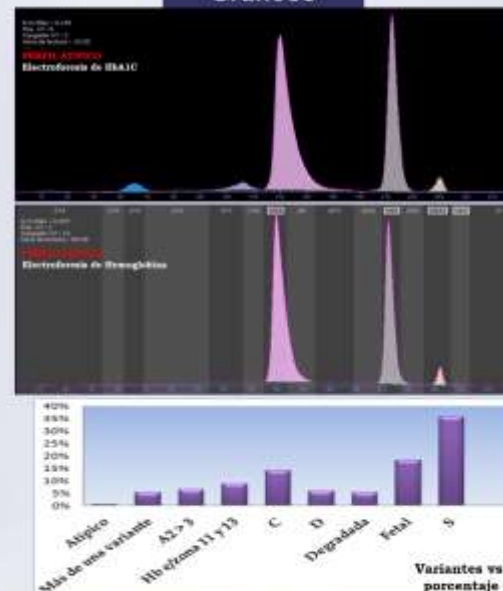
Objetivo

Establecer la proporción de las diferentes variantes de hemoglobina halladas previa confirmación por electroforesis capilar de hemoglobina.

Materiales y métodos

A partir de 61200 muestras de sangre entera anticoagulada con EDTA con solicitud de HbA1c se trabajó con 171 muestras con perfil atípico (0,3%) que fueron obtenidas desde noviembre del 2016 hasta abril del 2018. Las muestras fueron procesadas para ambas determinaciones por Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia).

Gráficos



Resultados

De las muestras analizadas 55% corresponden a sexo femenino, 44% a sexo masculino y un 1% desconocido. Las variantes halladas fueron: 35,7% HbS; 18,1% Hb Fetal; 14,0% HbC; 8,8% hemoglobinas entre zona 11 a 13; 6,4% Hb A2> 3; 5,8% HbD; 5,3% más de una variante presente; 5,3 % muestras deterioradas y 0,6 % no identificadas.

Conclusiones

El hallazgo casual de las diferentes variantes de hemoglobina, en pacientes con solicitud de HbA1c, pone de manifiesto el valor agregado de la metodología utilizada, electroforesis capilar y justifica la advertencia al médico solicitante mediante su informe.

Referencias

- Westheral DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. Blood 2010; 115(22):4331-4336.
- Organización Mundial de la Salud. Drepanocitosis y otras hemoglobinopatías. Nota descriptiva No.308, enero 2011.
- Randie R. Little, Curt L. Rohlfing, David B. Sacks. Status of Hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care

¿Cuándo sospechar su presencia?

- Discordancia entre la medición de glucosa de autocontrol del paciente y el valor de A1c
- Resultado de A1c > 15% o < 4%
- Resultado A1c notablemente diferente en comparación con el valor anterior cuando se usa un método diferente para medir
- Presencia de anemia con índices anormales de glóbulos rojos en un hemograma completo

Paciente

Seguimiento



Diagnóstico

¿Cómo informamos?

HEMOGLOBINA GLICOSILADA

Material: sangre EDTA

Método: electroforesis capilar

N.G.S.P

5.6 %

I.F.C.C

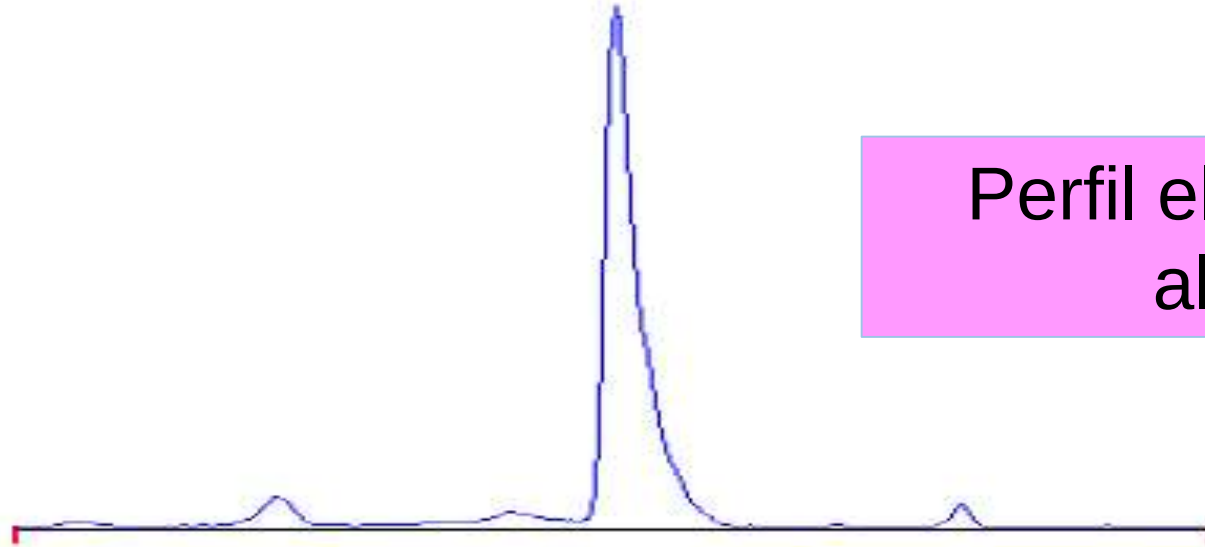
38 mmol/mol

Intervalo de referencia:

N.G.S.P: < = 6,0 %

I.F.C.C: < = 42 mmol/mol

Gráfico:



Perfil electroforético sin alteraciones

Observaciones: Perfil electroforético sin alteraciones

NOTA: Si el resultado de HbA1c es <4,0 % ó >15 % se sugiere confirmar con nueva muestra y descartar presencia de interferencias clínicas como anemia, variantes de hemoglobina, entre otras.

HEMOGLOBINA GLICOSILADA

Material: sangre EDTA

Método: electroforesis capilar

N.G.S.P

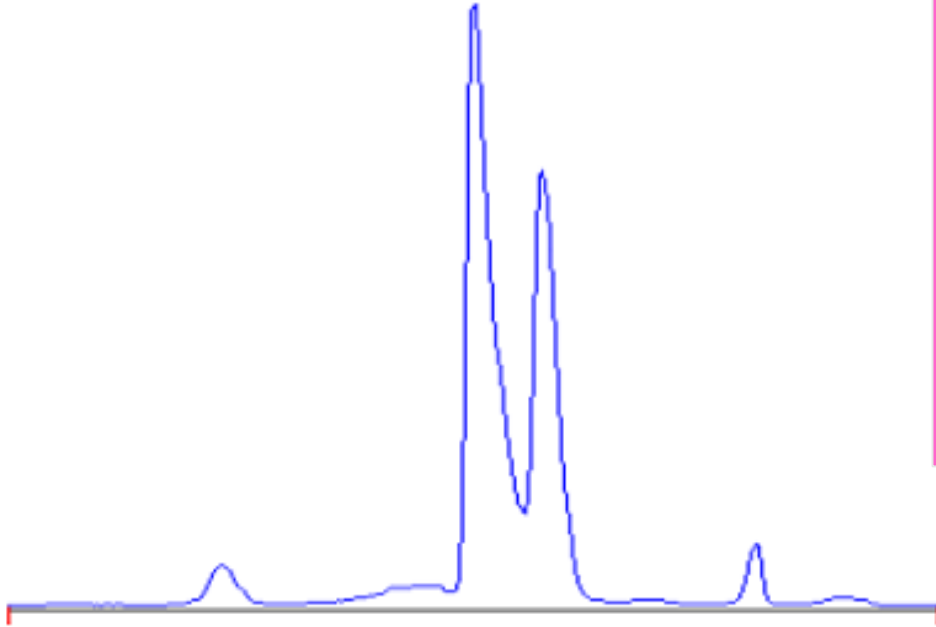
I.F.C.C

Intervalo de referencia:

N.G.S.P: < = 6,0 %

I.F.C.C: < = 42 mmol/mol

Gráfico:



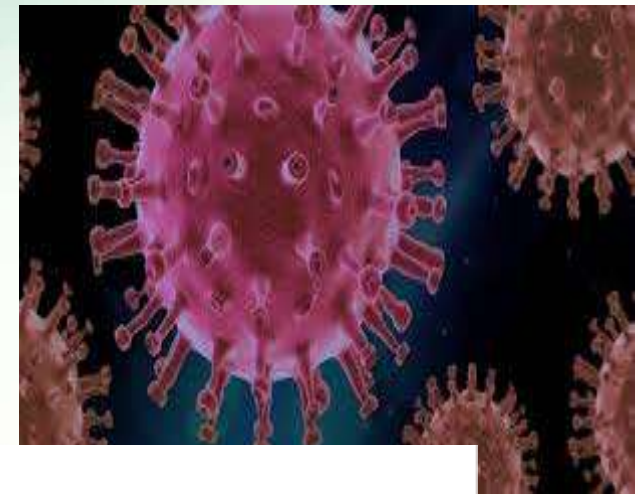
Perfil atípico con
interferencia
analítica en el
resultado

Observaciones:

Se observa un perfil atípico con posible presencia de una variante de hemoglobina, que interfiere en la obtención del resultado.

Se sugiere solicitar electroforesis capilar de hemoglobina y utilizar otro analito para el monitoreo del paciente.

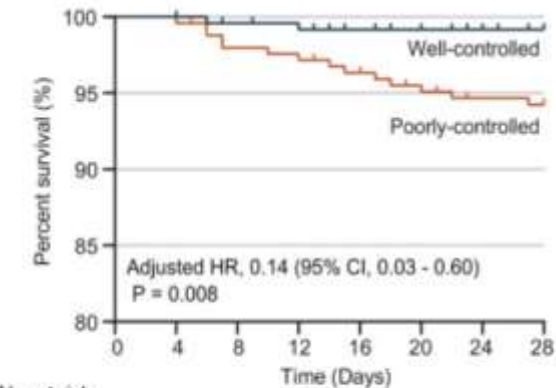
HbA1c vs SARS-CoV-2



La prueba de HbA1c es necesaria para el manejo de pacientes. Es un factor de riesgo independiente

is a predictor of COVID-19 severity in patients

Miriam Shpigelman, Shlomo Vinker, Itamar Raz, Avivit Golan-Cohen,



No. at risk								
Well-controlled	250	249	242	241	232	228	223	222
Poorly-controlled	250	248	240	239	223	217	214	211

Desafíos

- Consenso en los modelos de informe
- Feedback con los médicos solicitantes



Muchas gracias!!!