

Standardisation du dosage de l'HbA_{1c} : le point de la question

D. Maisin, M. Philippe¹

Depuis juin 2011, les laboratoires de Biologie Clinique belges transmettent les résultats de l'HbA_{1c} en unités internationales (mmol/mol Hb). Ce changement d'unités permet aux laboratoires de se conformer aux directives européennes et d'améliorer la standardisation du dosage de l'HbA_{1c}.

INTRODUCTION

Suite aux directives de l'Institut de Santé publique (ISP), depuis le 1^{er} juin 2011, tous les laboratoires de biologie clinique belges transmettent les valeurs de l'HbA_{1c} en mmol/mol d'hémoglobine en parallèle avec les résultats exprimés en %.

Ce changement d'unités est lié à l'amélioration de la standardisation du dosage de l'HbA_{1c}. L'*International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)* a développé un matériau de référence purifié, dédié au dosage de l'HbA_{1c}, reconnu et approuvé par la communauté scientifique internationale. Il existe une relation linéaire (un master équation) entre les normes IFCC (mmol/mol Hb) et les normes DCCT en % (*Diabetes Control and Complications Trial*). Pour bien comprendre l'évolution de ce changement d'unités, il faut parcourir l'historique du dosage de l'HbA_{1c}.

STANDARDISATION ET CALIBRATION

Tout dosage en chimie clinique doit être standardisé c'est-à-dire uniformisé. Ce processus permet d'assurer que toutes les méthodes utilisées pour doser une même substance donnent le même résultat. L'importance de la standardisation est souvent sous-estimée, elle est pourtant primordiale pour permettre la commuabilité des résultats entre laboratoires et la communication entre cliniciens et la progression scientifique.

D'autre part la calibration en chimie clinique est le processus qui attribue une valeur à un échantillon inconnu en utilisant une référence, appelée un standard. L'idéal est de disposer d'un matériau de référence purifié, un standard international, pour calibrer toute méthode utilisée en chimie clinique. À partir de ces standards, l'appareil de mesure établit une courbe de calibration, qui permettra de doser les échantillons de routine.

Une méthode définitive, est une méthode qui a fait l'objet d'une analyse approfondie, elle est considérée comme exacte, précise et appropriée pour calibrer toutes les autres méthodes de dosage utilisées en routine clinique. Une méthode définitive n'est en général pas adaptée pour les laboratoires de routine. Une méthode de référence est une méthode subsidiaire calibrée à partir de la méthode définitive, utilisée pour calibrer les méthodes des différents analyseurs de laboratoire. Qu'en est-il du dosage de l'HbA_{1c} ?

LES HÉMOGLOBINES GLYQUÉES ET L'HbA_{1c}

L'hétérogénéité de la molécule d'hémoglobine est connue depuis très longtemps. C'est en 1955 que Kunkel et Wallenius utilisant une technique de chromatographie liquide échangeuse d'ions de haute performance (HPLC) ont établi la présence de composants mineurs de l'hémoglobine. Ces sous-fractions de l'hémoglobine, produits de la réaction non enzymatique entre un sucre et une chaîne, alpha ou bêta de l'hémoglobine, A1a, A1b, A1c (HbA_{1c}), A1d,... aussi appelées hémoglobines rapides, sont séparées de l'hémoglobine A0 sur base de la différence de charge de la molécule.

En 1971 Trivelli a été le premier à suggérer la présence d'une relation entre ces hémoglobines rapides, la concentration moyenne du glucose et les complications à long terme du

MOTS-CLEFS

Hémoglobine glycatée, calibration, standardisation, méthode de référence, IFCC.



diabète. Il s'en est suivi un engouement et un développement de techniques variées dans les laboratoires de biologie clinique. (HPLC, chromatographie d'affinité, immunodosages, dosages enzymatiques).

En 1993, aux Etats-Unis, l'étude DCCT a mis en évidence une relation quantitative entre le taux d'HbA_{1c} et les risques de complications liées aux diabètes de type I.

La formation de l'HbA_{1c} est un processus lent, irréversible, consistant en la fixation non enzymatique du glucose sur la valine N-terminale de la chaîne bêta de l'hémoglobine.

Il y a d'abord formation d'un aldime (base de Schiff ou HbA_{1c} labile) qui subit ensuite un réarrangement d'Amadori pour former une cétoamine stable. (HbA_{1c})

Cette réaction se produit également sur une dizaine d'autres sites de la molécule d'hémoglobine pour former d'autres hémoglobines glyquées, l'HbA_{1c} constituant 60% de celles-ci. La valeur de l'HbA_{1c} est exprimée comme un pourcentage de l'hémoglobine totale (HbA₀).

La valeur de l'HbA_{1c} renseigne le clinicien sur la concentration moyenne du glucose sanguin durant les huit à douze semaines qui précèdent le dosage. Les valeurs normales sont établies pour des patients dont la demi-vie des globules rouges est de 120 jours en moyenne et qui ne présentent pas d'anomalies de l'hémoglobine pouvant interférer avec le dosage (1).

STANDARDISATION NGSP/DCCT

Dès l'apparition du dosage de l'HbA_{1c} en routine clinique, il fut rapidement évident qu'il y avait des différences notoires entre les résultats issus des multiples laboratoires. La plupart de ces laboratoires utilisaient des techniques variées, caractérisées par un défaut de spécificité quant à la molécule à doser. Certains dosaient l'HbA_{1c}, d'autres l'Hb1 (A1a, A1b, A1c) avec des interférences plus ou moins importantes de l'HbF, de l'hémoglobine carbamylée, de l'hémoglobine A1c labile ou des variants génétiques de l'hémoglobine.

Il n'y avait pas de technique de référence ni de matériau de référence.

En 1996, le NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) fut fondé aux Etats-Unis par l'AACC (*American Association for Clinical Chemistry*) afin d'harmoniser les méthodes de routine sur base de la méthode utilisée durant l'étude DCCT (2).

Le NGSP a standardisé le dosage de l'HbA_{1c} en utilisant son propre matériau de référence, un mélange non purifié d'HbA_{1c} et d'HbA₀ et une méthode arbitraire de purification (Biorex 70 HPLC) ce qui a donné naissance aux normes DCCT.

Le NGSP fonctionne comme un réseau de laboratoires de référence utilisé pour calibrer et standardiser les méthodes commerciales de dosage d'HbA_{1c}. Il se compose d'un laboratoire central primaire de référence (CPRL) qui prépare et détermine la valeur d'un calibrateur par la méthode DCCT (Biorex 70 HPLC). Il existe des laboratoires de références primaires (PRL) qui suppléent le CPRL et des laboratoires secondaires de référence (SRL) travaillant avec les firmes pour les aider à standardiser leurs méthodes commerciales versus la méthode de référence NGSP, ceci afin d'obtenir une certification. Le certificat doit être renouvelé chaque année. Le NGSP a également travaillé avec

le Collège des pathologistes Américains (CAP) pour créer un contrôle de qualité externe, le CAP GH2, dont les critères et les exigences sont chaque année plus restrictifs.

Suite à ces efforts pour harmoniser le dosage de l'HbA_{1c}, on a assisté à une diminution progressive des coefficients de variation inter-laboratoires.

Parallèlement, d'autres pays comme le Japon, la Suède ont développé leur propre standardisation.

Ces différents programmes de standardisation utilisent tous une méthode HPLC arbitraire pour obtenir un matériau de référence et ainsi harmoniser les résultats du dosage de l'HbA_{1c} dans une région déterminée du globe, le standard NGSP étant le moins spécifique.

Aucune de ces méthodes n'utilise un matériau de référence purifié.

STANDARDISATION IFCC

Pour surmonter ce problème et pour se conformer aux directives européennes (3) qui exigent, pour tout dosage, une traçabilité des étalons ou standards, l'*International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) a créé en 1995 un groupe de travail chargé de mettre au point un matériau de référence purifié pour le dosage de l'HbA_{1c}.

Ce matériau de référence a été obtenu et approuvé en 2001(4).

Il se compose d'un hexapeptide glycaté de la chaîne bêta de l'hémoglobine, obtenu après clivage enzymatique (endoprotéinase Glu-C) de l'hémoglobine. Cet hexapeptide glycaté est ensuite séparé des hexapeptides non glycatés et purifié par une méthode HPLC couplée soit à la spectrométrie de masse ou à l'électrophorèse capillaire.

Un réseau international de laboratoires de référence s'est constitué en Amérique, Asie et en Europe pour valider l'exactitude des valeurs IFCC et assurer la traçabilité des calibrateurs et matériaux de contrôle vis-à-vis du standard officiel.

Les méthodes développées par l'IFCC pour purifier l'HbA_{1c} sont plus sensibles et plus spécifiques que la méthode NGSP/DCCT.

Ce matériau de référence IFCC hautement purifié corrèle avec les normes NGSP/DCCT mais il y a un biais.

Les valeurs IFCC, exprimées en % sont inférieures (de 1,5 à 2%) par rapport à celles obtenues avec la standardisation DCCT.

Pour éviter toute confusion, les experts ont décidé d'exprimer les valeurs d'HbA_{1c} en mmol/mol d'hémoglobine.

Ce biais a été traduit par la master équation :
IFCC (mmol/mol) = [10.93 DCCT/NGSP (%)] - 23.50 ou DCCT/NGSP (%) = [0.09148 X IFCC (mmol/mol)] + 2.152 acceptée en 2007 par l'*American Diabetes Association* (ADA), *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) et par l'*International Diabetes Federation* (IDF) (5,6).

IFCC ET INSTITUT DE SANTÉ PUBLIQUE

De nombreuses associations de patients diabétiques (*American Diabetes Association* (ADA), *European Asso-*

ciation for the Study of Diabetes (EASD), International Diabetes Federation (IDF), IFCC (International Federation of Clinical Chemistry), International Society for Paediatric and Adolescent Diabetes (ISPAD) ont approuvé les guidelines suivantes lors d'un consensus obtenu en 2009 (7) :

- IFCC est la référence pour le dosage de l'HbA_{1c} ;
- transmission des résultats dans les 2 unités : NGSP (%) - avec une décimale) & IFCC (mmol/mol Hb – sans décimale) ;
- des tables de conversion doivent être disponibles ;
- pas d'utilisation de la concentration moyenne du glucose sanguin pour le suivi du diabète (eAG, estimated average glucose) ;
- évaluation en décembre 2011 au congrès de la Fédération Internationale du Diabète à Dubai.

Presque tous les pays européens ont décidé de ne rapporter les résultats de l'HbA_{1c} qu'en unité IFCC après une période de transition où les deux unités seront associées dans les protocoles.

Les nouvelles normes IFCC sont d'application en Belgique depuis le 1^{er} juin 2011.

Un groupe de travail, coordonné par l'ISP s'est constitué en automne 2010 pour mettre en application ces nouvelles directives.

CONCLUSIONS

L'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) a développé un matériau de référence purifié pour le dosage de l'HbA_{1c},

accepté internationalement et qui permet une traçabilité métrologique du matériau de référence comme recommandé par les directives de l'Union Européenne (1998).

Le NGSP a par ailleurs mis sur pied un réseau de laboratoires qui certifient la standardisation du dosage de l'HbA_{1c}. Il existe une master équation, qui permet de passer, sans difficulté, d'un système métrique à un autre. La validité de cette équation est surveillée en permanence. Les comparaisons entre les réseaux des laboratoires NGSP et IFCC sont constantes. Les approches de l'IFCC et NGSP sont complémentaires, elles participent toutes deux à une amélioration de la standardisation de l'HbA_{1c} (8,9).

CORRESPONDANCE :

Diane Maisin

Cliniques universitaires Saint-Luc
Service de Biochimie médicale
Département de Biologie Clinique
Tour Rosalind Franklin
Avenue E. Mounier
B-1200 Brussels, Belgium
Phone +32-(0)2-7646715, Fax +32-(0)2-7646930
Email: diane.maisin@uclouvain.be

¹ Service de Biochimie médicale, Cliniques universitaires Saint-Luc, 1200 Bruxelles, Belgique

SUMMARY

Since January 2011, the Belgian clinical laboratories have to reply HbA_{1c} results using international units (mmol/mol Hb). This change of units allows laboratories to comply with EU recommendations and to improve the standardization of HbA_{1c}.

KEY WORDS:

Glycated haemoglobin, calibration, standardisation, reference method, IFCC.

Références

1. Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W. Interference of carbamylated hemoglobin and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immuno assay. *Clin Chem* 1993 ; 39: 138-42.
2. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB, Goldstein DE. The National Glycohemoglobin Standardization Program : a five-year progress report. *Clin Chem* 2001; 47: 1985-92.
3. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *OJ L* 1998;331:1-37.
4. 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.
5. Panteghini M, John WG. Implementation of haemoglobin A1c results traceable to the IFCC reference system: the way forward. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 942-4.
6. Sacks DB, ADA/EASD/IDF Working Group of the HbA_{1c} Assay. Global harmonization of hemoglobin A1c. *Clin Chem* 2005; 51: 681-3.
7. Hanas R, John WG. Consensus Statement on the worldwide Standardization of the Hemoglobin A1C Measurement. *Clin Chem* 2010; 56: 1362-4.
8. Little R, Rohlfing C, Sacks D. Status of Hemoglobin A1c Measurement and Goals for Improvement: From Chaos to Order for Improving Diabetes Care. *Clinical Chemistry* 2011; 57 (2): 205-214.
9. Weykamp CW, John WG, Mosca A. A review of the challenge in Measuring Hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 439-445.