

HbA1c

Определение HbA1c методом капиллярного электрофореза

Новое поколение систем оценки
гликогемоглобина

Прямое определение стабильного HbA1c

Сертификация IFCC и NGSP

Наилучший баланс точности, надежности и
быстроты

Введение

Постоянно растущее число больных диабетом, среди которых все чаще встречаются пациенты с разнообразными гемоглинопатиями, наряду с выходом нового диагностического регламента, обуславливают необходимость поиска усовершенствованного метода оценки HbA1c.

Принимая во внимание утвержденные в 2011 году международные рекомендации по стандартизации методов оценки HbA1c и учитывая обширный список физиологических и патологических состояний, способных оказывать влияние на точность количественного определения гликогемоглобина (гемоглинопатии, беременность, анемии, заболевания почек и пр.), SEBIA разработала технологию, представляющую собой новое поколение разделительных методов оценки HbA1c.

Обладая 10-летним опытом производства систем капиллярного электрофореза, SEBIA адаптировала этот точный и надежный разделительный метод для количественной оценки HbA1c, сделав его доступным каждой лаборатории для повседневного использования.

Технология HbA1c производства SEBIA сертифицирована в системах IFCC и NGSP и успешно дополняет перечень классических ЭФ тестов анализатора CAPILLARYS 2 Flex Piercing, пользователями которых являются свыше 3 000 лабораторий по всему миру.

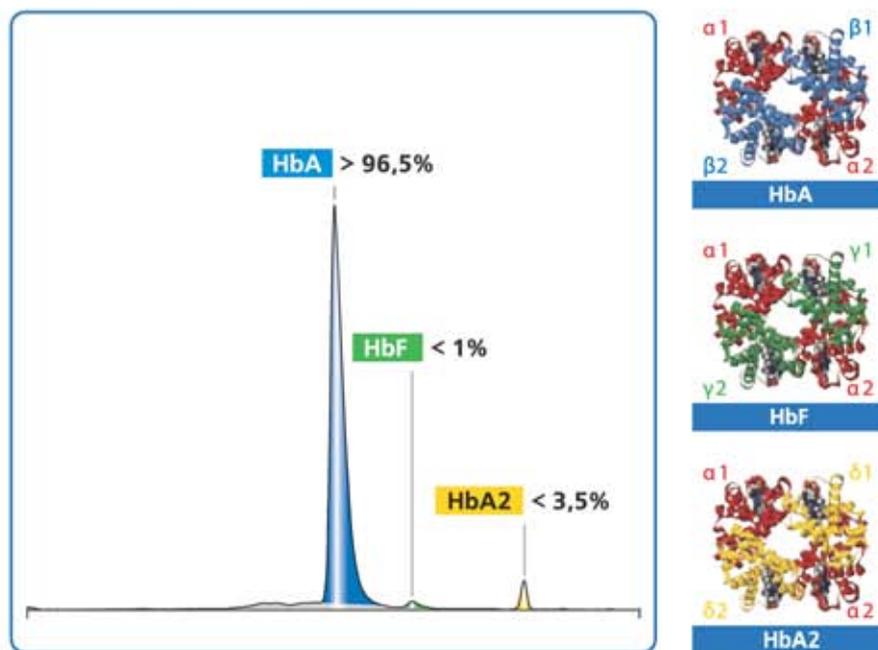
Гемоглобин	2
Гемоглобин А1с	3
Наиболее распространенные виды аналитической интерференции	4
Что должно быть измерено?	6
Что измеряет технология SEBIA?	7
Система CAPILLARYS 2 Flex Piercing	
• Аналитические характеристики метода оценки HbA1c	8
• Отсутствие интерференций	10
• Характеристики анализатора	12
• Принцип капиллярного электрофореза	13
• Программное обеспечение Phoresis SQL Клиент/Сервер	14
• Набор реагентов для определения HbA1c	15
• Меню тестов	16
• Наилучший баланс точности, надежности и скорости	17

Физиологические варианты гемоглобина (Hb)

Разделение физиологических вариантов гемоглобина методом капиллярного электрофореза

В норме у взрослого человека гемоглобин представлен тремя основными вариантами:

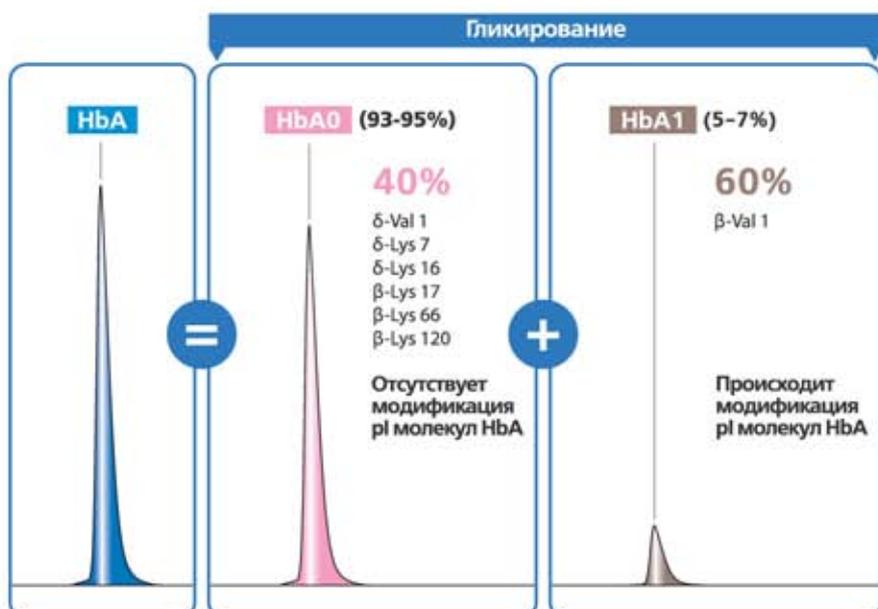
- гемоглобин А ($\alpha_2\beta_2$) > 96,5%;
- гемоглобин А₂ ($\alpha_2\delta_2$) < 3,5%;
- гемоглобин F ($\alpha_2\gamma_2$) < 1%.



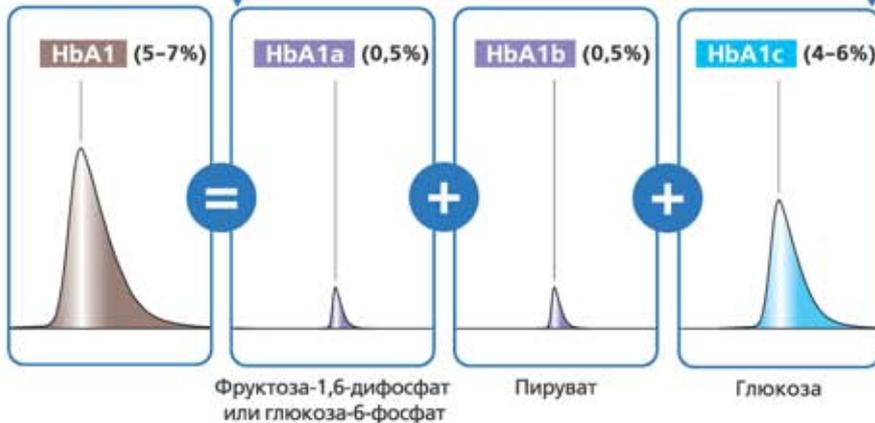
Гликирование гемоглобина А

HbA0 – это негликированный HbA и HbA, гликированный без модификации изоэлектрической точки (pI) молекул.

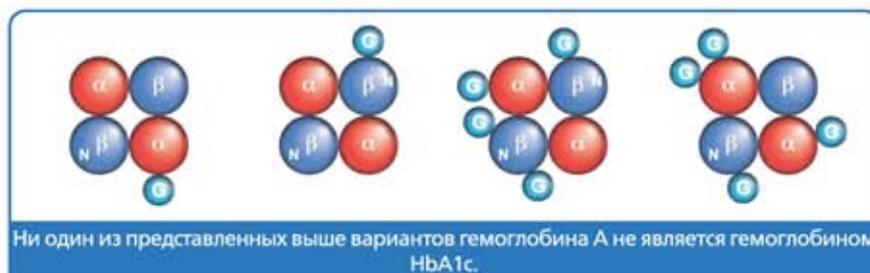
HbA1 – это гликированный гемоглобин А по одному или двум N-концевым валинам β -цепей.



Присоединение сахара к N-концевому валину β-цепей гемоглобина А



Представленный вариант является гемоглибином HbA1c, т.к. имеет соединение глюкозы хотя бы по одному N-концевому валину β-цепей.



Нет ни одной молекулы глюкозы, присоединенной по N-концевым валинам β-цепей.

Гликирование N-концевого валина β-цепей гемоглобина А

Гликированный гемоглобин HbA1 составляет около 5-7 % от общего гемоглобина А.

HbA1 разделяется на подгруппы в зависимости от того, какой сахар он связывает:

- HbA1a связывает фруктоза-1,6-дифосфат (HbA1a1) или глюкоза-6-фосфат (HbA1a2);
- HbA1b связывает пируват;
- **HbA1c связывает глюкозу.**

HbA1a и HbA1b называются минорными гликированными фракциями.

Количественно преобладает фракция HbA1c, поэтому она дает более тесную корреляцию со степенью выраженности сахарного диабета.

Гемоглобин А1с

HbA1c – это продукт стабильного неэнзиматического соединения глюкозы с N-терминальным валином β-цепей гемоглобина А.

Гемоглобин А1с и другие гликированные гемоглобины

Гемоглобин А, не имеющий соединения глюкозы с N-терминальным валином β-цепей, **НЕ ЯВЛЯЕТСЯ** гемоглибином HbA1c.

Наиболее распространенные виды аналитической интерференции

Лабильный HbA1c, или пре-HbA1c (LA1c)

Формирование лабильного HbA1c происходит в постпрандиальной (после приема пищи) фазе. Помимо этого уровень лабильного HbA1c повышается у пациентов с диабетом при плохом контроле уровня гликемии.

Концентрация лабильного HbA1c существенно варьирует от пациента к пациенту.

Карбамилированный гемоглобин (CNb)

Карбамилирование гемоглобина – это нормальный физиологический процесс, однако у пациентов с почечной недостаточностью наблюдается существенное повышение уровня карбамилированного гемоглобина.

Анемии

Анемия – состояние, встречающееся по данным ВОЗ примерно у 30% мирового населения, может принимать разнообразные формы (гемолитическая, железодефицитная, эритроцитарная, интраэритроцитарная и пр.)



Формирование промежуточной **обратимой** формы HbA1c:

- Нестабильное присоединение глюкозы к N-терминальному валину одной или двух цепей β-глобина гемоглобина А.
- Большая часть лабильного А1с превращается обратно в HbA0 после высвобождения глюкозы.

➔ Использование методов, не разделяющих или частично разделяющих **лабильный А1с** от стабильного А1с, **может приводить к неправильной оценке HbA1c.**
(Ann Biol Clin 2011; 69(1): 63-9)



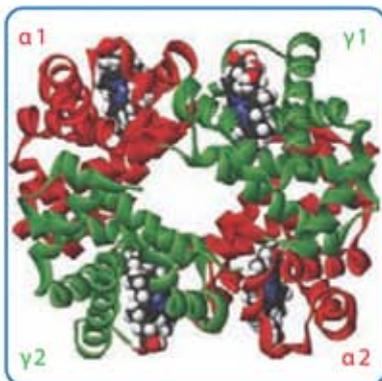
Присоединение молекулы изоциановой кислоты, являющейся продуктом распада мочевины, к N-терминальному валину цепи β-глобина гемоглобина А.

➔ Использование методов, не разделяющих или частично разделяющих **CNb** от HbA1c, **может приводить к неправильной оценке HbA1c.**
(Clin Chem Lab Med 2009; 47(5): 612-613; Ann Biol Clin 2011; 69(1) 63-9)

У многих пациентов, которым требуется измерение HbA1c, концентрация общего гемоглобина может иметь существенное отклонение от нормальных значений.

Такие случаи требуют особенного внимания при оценке HbA1c.

➔ Необходимо, чтобы методы оценки HbA1c обладали высокой линейностью по отношению к концентрации общего гемоглобина, чтобы избежать необходимости повторного анализа с ручной пробоподготовкой.



- HbF = фетальный гемоглобин ($\alpha_2\gamma_2$).
- Составляет до **85%** общего гемоглобина у новорожденных.
- С возрастом замещается на гемоглобин А ($\alpha_2\beta_2$).
- В норме у взрослых количество HbF не превышает **1%**.

➔ Необходимо **полностью отделять** фракцию HbF, чтобы свести к минимуму возможную интерференцию на количественную оценку HbA1c, и таким образом, гарантировать надежный и точный результат.
(Am J Clin Pathol 2008; 129:811-814)



Варианты гемоглобинов и их гликированные формы могут влиять на количественную оценку HbA1c. В зависимости от механизма, лежащего в основе того или иного метода, причинами интерференции могут быть:

- Неправильное распознавание варианта гемоглобина и его гликированной формы,
- Неправильное разделение варианта гемоглобина и его гликированной формы.

➔ Крайне важно, чтобы используемая методика обеспечивала детекцию и точное разделение вариантов гемоглобина от пиков HbA1c и HbA0.

➔ **Исключение** аномальных гемоглобинов из количественной оценки HbA1c является **гарантией надежного и точного результата.**

Фетальный гемоглобин (HbF)

В ряде случаев (β -талассемия, серповидно-клеточная и другие анемии, беременность, лейкемия, инсулино-зависимый диабет, гипертиреоз, наследственная гемоглинопатия по HbF) наблюдается **аномальное повышение уровня фетального гемоглобина.**

Гемоглинопатии

Некоторые **наследственные аномалии гемоглобина**, такие как **талассемии** или **варианты гемоглобинов** (см. стр. 10) могут приводить к **неправильной оценке HbA1c.**

Распространенность больных с аутомно-рецессивным типом наследования аномальных вариантов гемоглобина достаточно велика.

Свыше 5% мирового населения страдают теми или иными формами наследственных гемоглинопатий, и более 7% женского населения является носителями мутантных генов гемоглобина.
(Источник: Бюллетень ВОЗ 2008, том 86)

На сегодняшний день описано свыше 1000 вариантов гемоглинонов, из которых наиболее распространенными являются HbS, HbC, HbD, HbE.

Что должно быть измерено?

Международная стандартизация методов оценки HbA1c, вступившая в силу 1 января 2011 г.

С целью гармонизации аналитических методов рабочая группа IFCC по стандартизации методов оценки HbA1c опубликовала рекомендации, направленные на снижение расхождений результатов, полученных различными методами, в пробах, лишенных интерференций.

Справа приведена цитата из публикации (*Clin Chem Lab Med 2002; 40(1): 78-89*), в которой дано определение HbA1c и его расчетная формула, позволяющая выражать результаты как в % NGSP, так и в ммоль/моль.

Декларация Консенсуса 2010 по стандартизации измерений HbA1c на международном уровне (*Clin Chem Lab Med 2010; 48(6): 775-776*) акцентирует, что результаты измерения HbA1c должны содержать:

- Один знак после запятой для выражения в % NGSP,
- Отсутствие знаков после запятой для выражения в единицах СИ (ммоль/моль).

Референсный метод измерения HbA1c в цельной крови человека, одобренный IFCC

*Clin Chem Lab Med 2002; 40(1): 78-89 © 2002
Walter de Gruyter, Berlin, New York*

Международная Федерация Клинической Химии и
Лабораторной Медицины (IFCC), Научное Подразделение

Рабочая Группа по Стандартизации методов оценки HbA1c и
Сеть Референсных Лабораторий по определению HbA1c

Подготовлено к публикации группой авторов: Jan-Olof Jeppsson, Uwe Kobold, John Barr, Andreas Finke, Wieland Hoelzel, Tadao Hoshino, Kor Miedema, Andrea Mosca, Pierligi Mauri, Rita Paroni, Linda Thienpont, Masao Umemoto, Cas Weykamp

HbA1c измеряется как отношение между гликированными и негликированными гексапептидами.

В исследовании используются калибраторы, состоящие из смеси высокоочищенного HbA1c и HbA0.

$x = [\text{HbA1c}]$ = концентрация HbA1c в образце

$y = [\text{HbA0}]$ = концентрация HbA0 в образце

Hb общ.: = общая концентрация $[\text{HbA1c}] + [\text{HbA0}]$

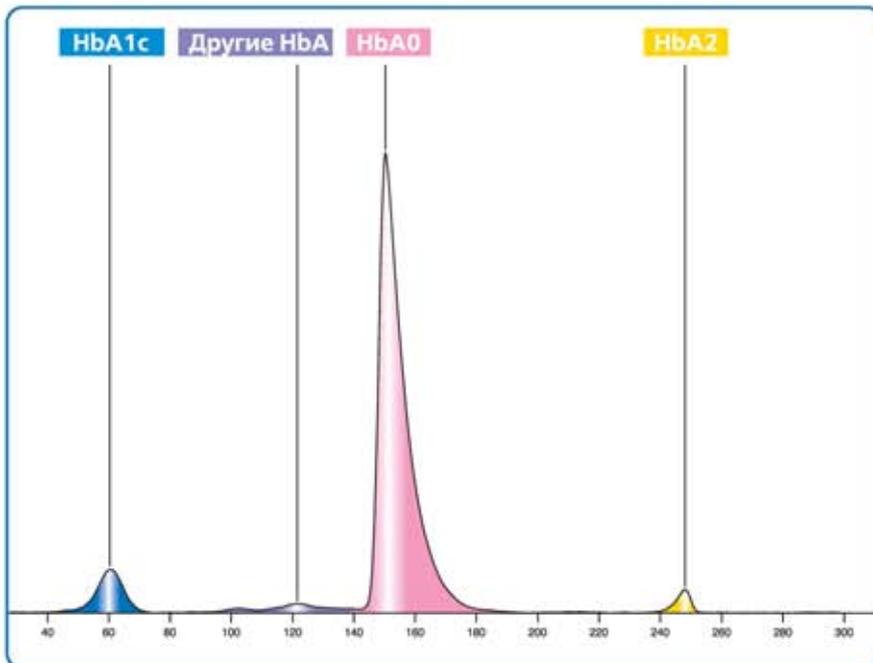
Z конц.: = процент HbA1c в образце

$$Z_{\text{конц.}} = \frac{100x}{x + y} = \frac{100x}{\text{Hb общ.}}, \quad \text{Hb общ.} = x + y.$$

Членами Международной Федерации Клинической Химии и Лабораторной Медицины был одобрен новый референсный метод, который ляжет в основу будущей универсальной процедуры стандартизации методов HbA1c, предназначенных для проведения рутинных исследований гликогемоглобина по всему миру.



Что измеряет технология Sebia?



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

- ➔ Высокая разрешающая способность технологии CAPILLARYS 2 Flex Piercing обеспечивает:
- **Высокую точность результата** за счет прямого измерения HbA1c;
 - **Высокую достоверность результата** за счет отсутствия интерференций.

Выбор Sebia

Выбор технологии Sebia основан на полном соответствии рекомендациям IFCC:

- соответствие расчетной формуле IFCC;
- соответствие процедуры калибровки с выражением результатов оценки HbA1c в ммоль/моль;
- сокращение числа знаков после запятой в представляемых результатах.

CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Аналитические характеристики метода оценки HbA1c

Отличная воспроизводимость в пределах одного цикла и между циклами

Оценка воспроизводимости осуществлялась в соответствии с международным протоколом NCCLS EP5-A2 «Оценка точности методов количественного анализа».

	Протокол CLSI-EP05							
	Проба №1	Проба №2	Проба №3	Проба №4	Контроль №1	Контроль №2	Калибратор №1	Калибратор №2
Среднее значение HbA1c	5,0%	6,0%	8,0%	9,9%	5,5%	8,4%	5,5%	10,1%
Общий CV	1,78	1,14	1,06	1,16	1,60	1,29	1,14	1,02

➔ Средний CV составил менее 1,3% (8 капилляров / 3 инструмента / 3 лота).

	Протокол CLSI-EP05							
	Проба №1	Проба №2	Проба №3	Проба №4	Контроль №1	Контроль №2	Калибратор №1	Калибратор №2
Среднее значение HbA1c	5,0%	6,0%	8,0%	9,9%	5,5%	8,4%	5,5%	10,1%
Общий CV	1,89	1,57	1,23	1,27	1,41	1,27	1,61	1,07

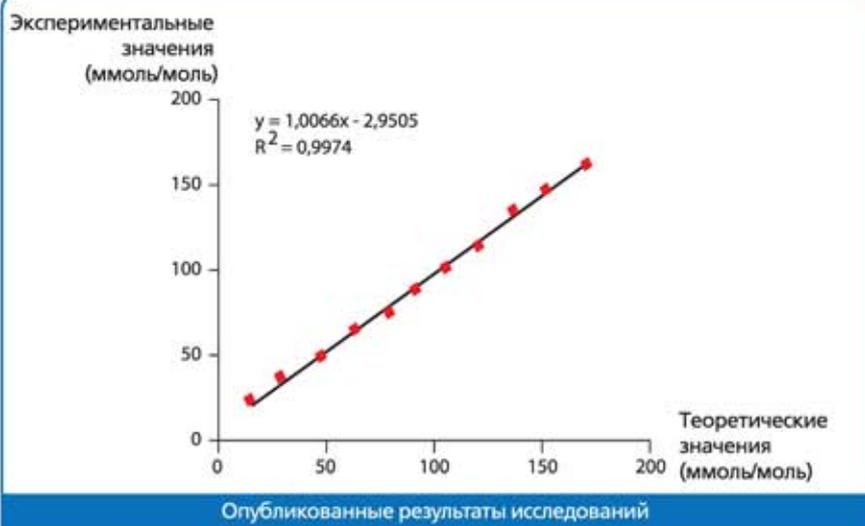
➔ Средний CV составил менее 1,5% (8 капилляров / 1 инструмент / 1 лот).

Высокая точность измерений

Оценка точности осуществлялась на 10 образцах, предоставленных Европейской референсной лабораторией в рамках образовательной программы по гликогемоглобину 2010.

	Опубликованные результаты исследований		
	Целевые значения IFCC (ммоль/моль)	CAPILLARYS 2 (ммоль/моль)	IFCC – CAPILLARYS 2 (ммоль/моль)
№1	45	45	0
№2	63	63	0
№3	41	41	0
№4	72	74	-2
№5	54	54	0
№6	63	63	0
№7	45	46	-1
№8	76	79	-3
№9	32	33	-1
№10	54	54	0

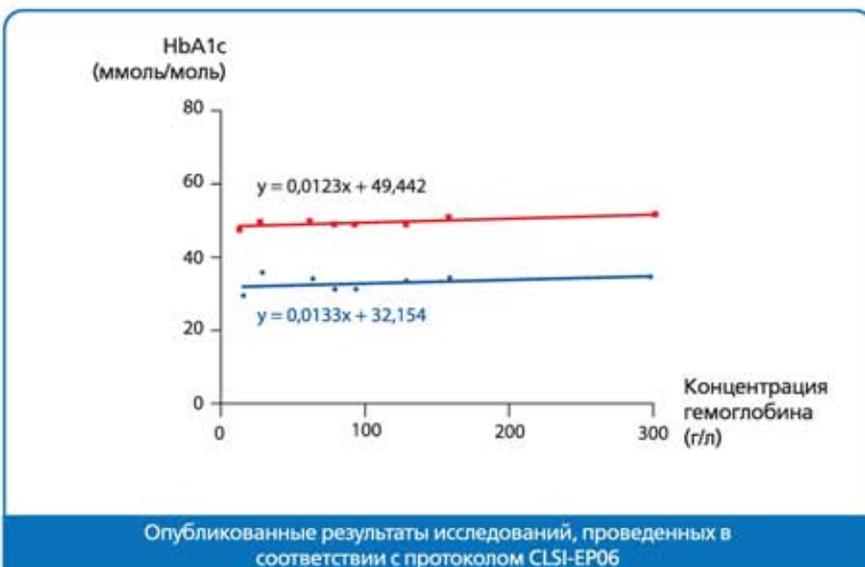
➔ Отсутствие или незначительное отклонение от целевых значений IFCC.



Высокая линейность

Широкий диапазон измерений.

Результаты линейны в диапазоне от 19 до 161 ммоль/моль HbA1c (эквивалентно диапазону 3,9-16,9%).



Отсутствие влияния концентрации общего гемоглобина

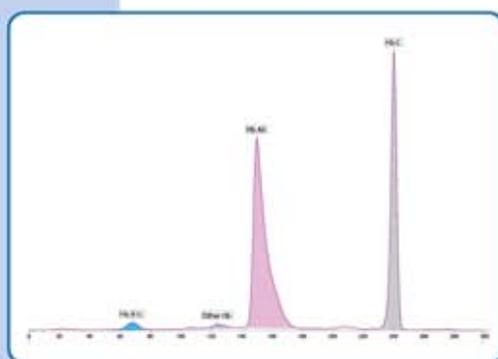
Широкий диапазон измерений.

Результаты линейны в диапазоне от 30 до 300 г/л.

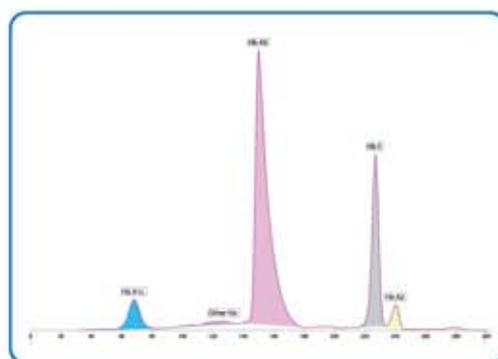
CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Отсутствие интерференций

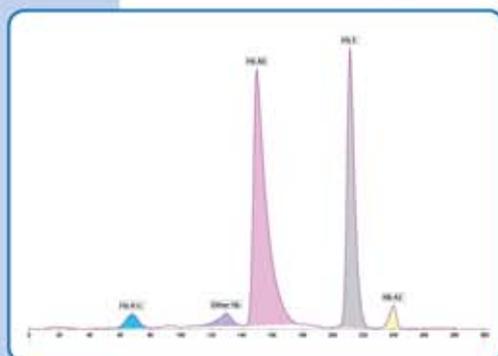
Четкое разделение
наиболее значимых
вариантов гемоглобина



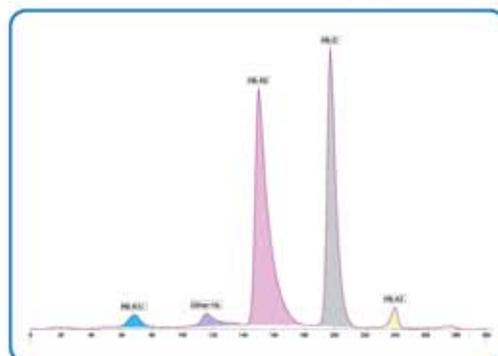
HbC



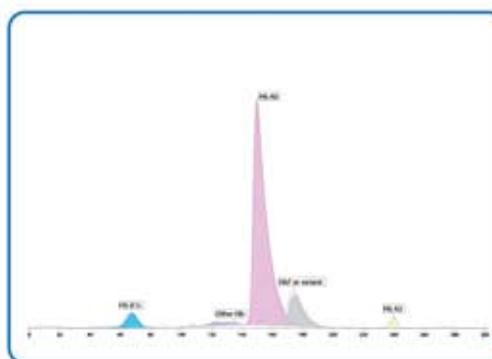
HbE



HbS



HbD

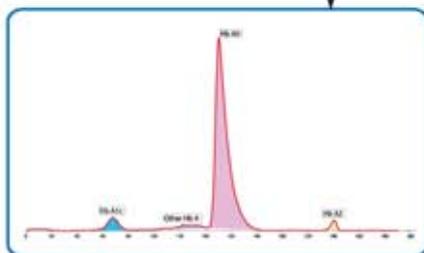
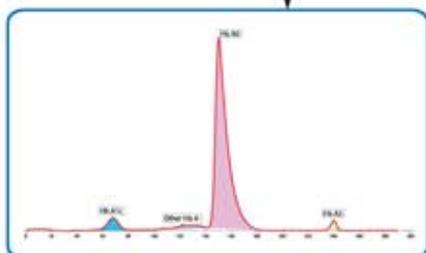


HbF

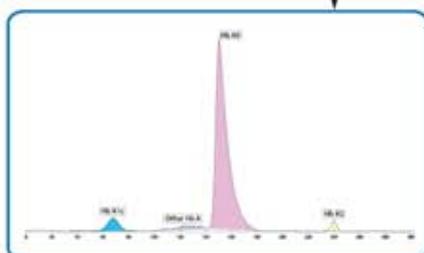
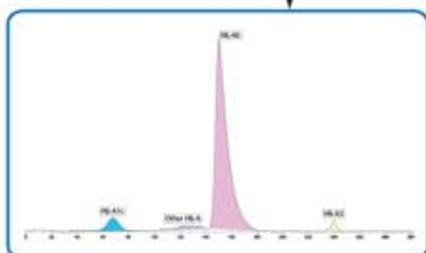
➔ Отсутствие интерференции и влияния на количественную оценку HbA1c в присутствии HbF и других распространенных вариантов гемоглобина (опубликованные результаты исследований):

ССА 15 Декабря 2011 г. / Из письма в редакцию: «Влияние гемоглобинов C, D, E и S на количественную оценку HbA1c, выполняемую шестью различными методами», Randie Little с соавт.: «...CAPILLARYS 2 Flex Piercing демонстрирует отсутствие какой-либо клинически значимой интерференции в присутствии любых вариантов гемоглобина, участвовавших в испытании».

	Инкубация <i>in-vitro</i> с раствором KCNO (ммоль/л) в течение 3 часов при 37° С					
	0	0,12	0,25	0,5	0,75	1
Уровень 1						
СНб (%)	0,8	1,5	2,4	3,9	5,4	6,5
НбА1с (ммоль/моль)	32	33	32	32	33	33
Уровень 2						
СНб (%)	0,9	1,6	2,0	3,8	4,7	5,3
НбА1с (ммоль/моль)	53	53	51	53	51	52
Уровень 3						
СНб (%)	2,0	2,6	3,4	5,4	6,5	8,1
НбА1с (ммоль/моль)	87	86	85	85	85	87



	Инкубация <i>in-vitro</i> с раствором глюкозы (0,5 моль/л) при 37° С					
	0	10 минут	20 минут	30 минут	60 минут	90 минут
Уровень 1						
LA1с (%)	0,8	3,1	4,5	5,7	9,3	10,4
НбА1с (ммоль/моль)	34	34	33	33	33	34
Уровень 2						
LA1с (%)	1,5	3,1	4,7	6,2	9,1	10,5
НбА1с (ммоль/моль)	60	59	60	59	58	58
Уровень 3						
LA1с (%)	1,5	3,2	4,6	5,9	8,4	10,3
НбА1с (ммоль/моль)	99	100	100	97	96	99



Отсутствие влияния карбамелированного гемоглобина (СНб)

Опубликованные результаты исследования:

Инкубация образцов с известной концентрацией НбА1с с раствором KCNO (концентрация до 1 ммоль/л).

- ➔ Отсутствие интерференции при любой концентрации СНб
- ➔ Отсутствие влияния на точность количественной оценки НбА1с
- ➔ Отсутствие искажения ЭФ профиля

Отсутствие влияния лабильного гемоглобина (LA1с)

Опубликованные результаты исследования:

Инкубация образцов с известной концентрацией НбА1с с раствором 0,5 моль/л глюкозы (до 90 минут).

- ➔ Отсутствие интерференции при любой концентрации LA1с
- ➔ Отсутствие влияния на точность количественной оценки НбА1с
- ➔ Отсутствие искажения ЭФ профиля

CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Характеристики анализатора

CAPILLARYS 2 Flex Piercing – система, соответствующая требованиям современной лаборатории

Многофункциональная система:

- Исследование сыворотки, мочи, цельной крови в закрытых пробирках.

Широкое меню тестов:

- Белковые фракции сыворотки крови и мочи, иммунотипирование, анализ HbA1c, фракции гемоглобина, CDT.

Полная автоматизация:

- Прокол крышки, позволяющий оптимизировать технологический процесс и минимизировать риск заражения при работе с биологическими образцами;
- Полностью прослеживаемая история образцов от взятия пробы до формирования отчета

Высокая производительность:

- 90 тестов в час при анализе белковых фракций,
- 40 тестов в час при анализе фракций гемоглобина и HbA1c,
- 38 тестов в час при анализе CDT

Высокая степень автономности:

- Одновременная загрузка 104 образцов
- Непрерывная дозагрузка образцов



Прокол крышки



Экономия времени, биологическая безопасность.

Перемешивание образцов на борту прибора



Оптимизация процесса перемешивания в отсутствии градиента концентрации эритроцитов.

Превосходные аналитические характеристики и воспроизводимость результатов.

CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Принцип капиллярного электрофореза



Принцип метода электрофореза в жидкой среде:

- При миграции в капилляре с малым внутренним диаметром (25 мкм) заряженные молекулы подвергаются воздействию электро-эндоосмотического потока (ЭОП);
- Разделение молекул осуществляется в специальном щелочном буфере за счет разницы их электрофоретической подвижности;
- Миграция осуществляется при высоком напряжении ($\leq 10\,000$ Вольт) и строгом контроле температуры (34°C), выполняемом при помощи системы элементов Пельтье, разработанной и запатентованной Sebia;
- Детекция фракций гемоглобина производится в катодном конце капилляра при длине волны, равной 415 нм.

➔ Капилляр является многократным и служит компонентом пассивного ЭОП. Капилляры в системе CAPILLARYS 2 Flex Piercing являются универсальными и не требуют замены при переходе от методики к методике.

Принцип капиллярного электрофореза

Капиллярный электрофорез – это широко известный метод, обеспечивающий:

- Высокое разрешение и быстрое разделение белковых фракций,
- Высокую аналитическую чувствительность.

CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Программное обеспечение Phoresis
SQL Клиент/Сервер

Быстрая валидация результатов при помощи функции «мозаичный экран»

Одновременная интерпретация
48 результатов.

Автоматическая маркировка
профилей цветом.

Голубой цвет:

Нормальный профиль, уровень
HbA1c в пределах референсных
значений

Оранжевый цвет:

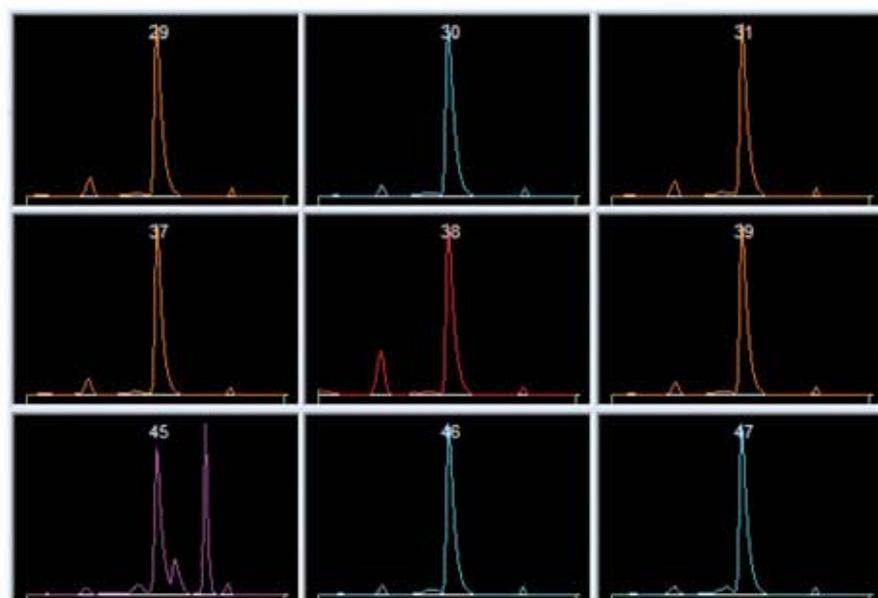
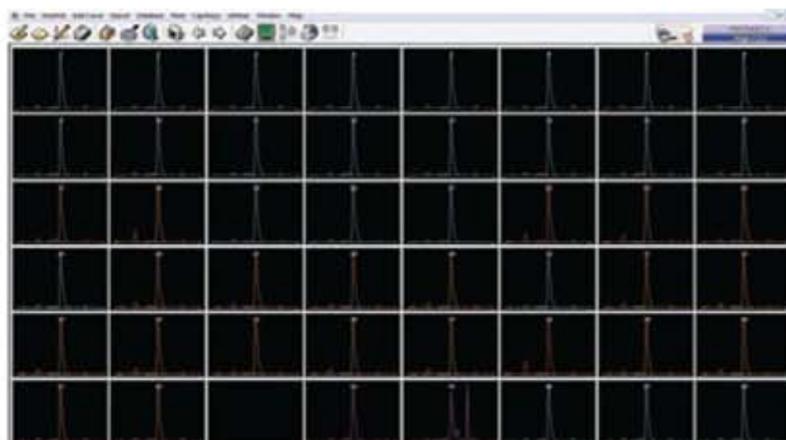
Нормальный профиль,
повышенный уровень HbA1c

Фиолетовый цвет:

Атипичный профиль, оценка
HbA1c должна быть проведена
с учетом особенностей кривой

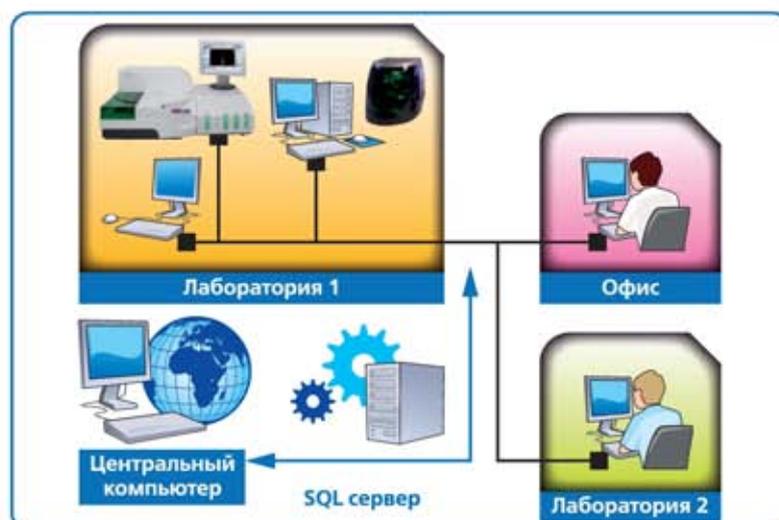
Красный цвет:

Маркировка патологических
образцов, выполненная
оператором



Функция базы данных SQL Клиент/Сервер

- Неограниченная база хранения результатов;
- Легкий доступ к истории пациента;
- Децентрализованная валидация результатов;
- Возможность подключения нескольких анализаторов Sebia к единой сети;
- Передача данных посредством Интернета, по локальной сети.



CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Набор реагентов для определения HbA1c



Каталожный номер	Название набора	Состав
2015	Белковые фракции гемоглобина КАПИЛЛЯРИС (CAPILLARYS HbA1c)	гемолизирующий раствор, буфер, промывающий раствор, сегменты для разведения.
4755	Калибраторы для электрофореза HbA1c (HbA1c Calibrators)	2 флакона с калибраторами I и II уровней.
4774	Контрольная сыворотка для электрофореза HbA1c (HbA1c Controls)	2 флакона с контролями I и II уровней, сегменты для разведения.

Реагенты, калибраторы и контроли HbA1c

- Сертификация CE
- Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФСЗ 2009/05453 от 25 ноября 2009 г.
- Высокие сроки годности
- Калибраторы и контроли поставляются в лиофилизированном виде



Сертификация

Технология HbA1c производства Sebia стандартизована и имеет сертификаты NGSP и IFCC, подтверждающие высокие аналитические характеристики метода.

Сертификаты могут быть высланы по запросу через hba1c@sebia.com

CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Меню тестов

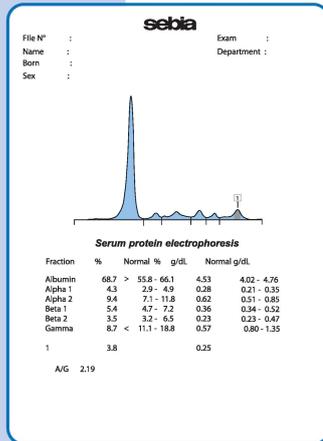
Многофункциональная система

Анализ HbA1c – полная автоматизация, включая пробоподготовку

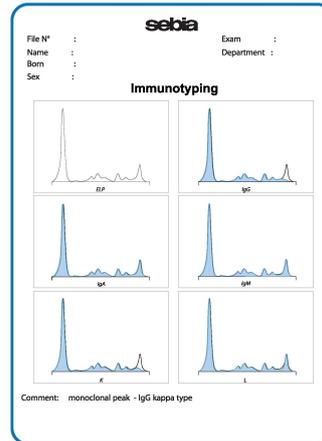
Широкое меню классических ЭФ тестов

Низкая себестоимость исследования

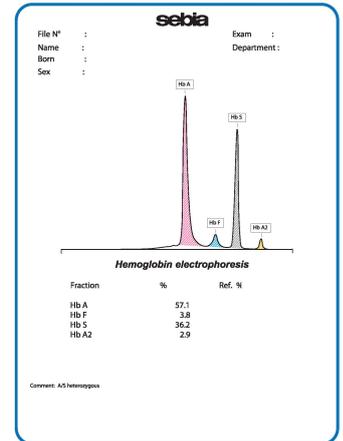
Быстрое переключение с методики на методику



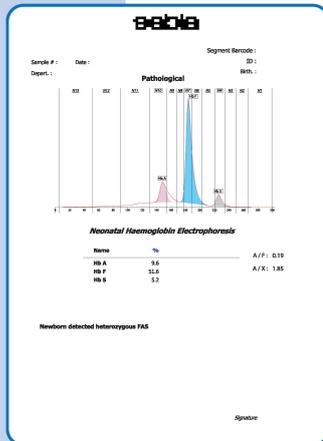
Белковые фракции сыворотки крови



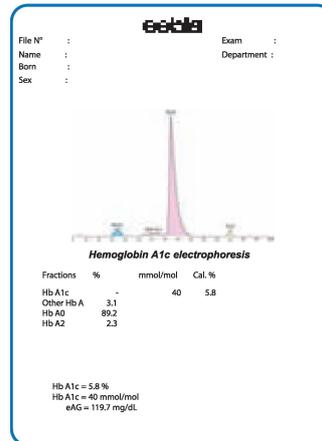
Иммунотипирование сыворотки крови



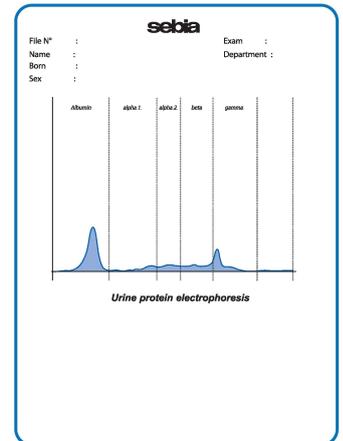
Фракции гемоглобина



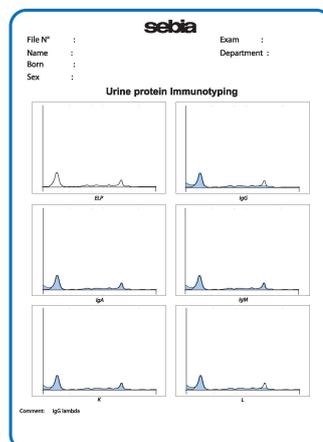
Неонатальный Hb



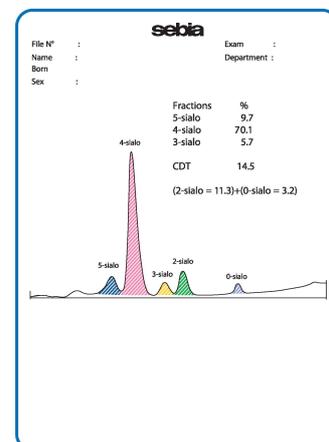
HbA1c



Белковые фракции мочи



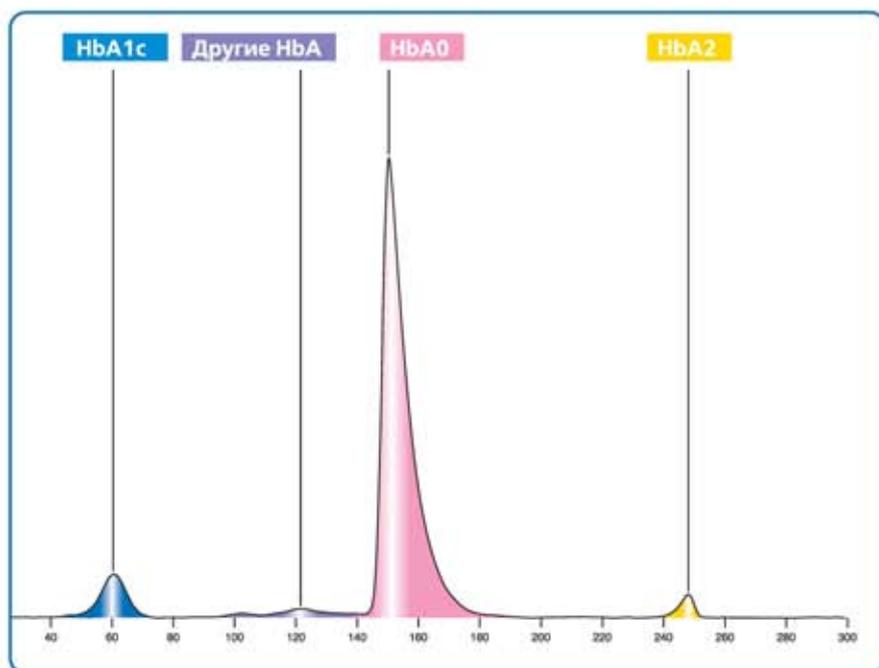
Иммунотипирование мочи



CDT

CAPILLARYS 2 Flex Piercing

Наилучший баланс точности, надежности
и скорости



- Новое поколение систем оценки HbA1c
- Высокое разрешение метода капиллярного электрофореза
- Высокая производственная мощность
- Прямое определение стабильного HbA1c в соответствии с рекомендациями IFCC
- Отсутствие интерференции и искажения результатов
- CV < 1,5%
- Многофункциональность
- Быстрая валидация результатов при помощи мозаичного отображения результатов
- Неограниченная по размерам база данных с возможностью их передачи по сети

За дополнительной информацией обращайтесь к эксклюзивному дистрибьютору продукции Sebia на территории Российской Федерации – ЗАО «ФИРМА ГАЛЕН».

➔ Тел.: +7(495) 925 5675
Факс: +7(495) 925 5675
e-mail: galen@galen.ru



ЗАО «ФИРМА ГАЛЕН»
Россия, 125353, г. Москва
ул. Василия Петушкова, д. 25
Тел/Факс: (495) 925 56 75
e-mail: galen@galen.ru
www.galen.ru