

40^{ème} Colloque National des Biologistes des Hôpitaux, Angers, 26-30 septembre 2011

Atelier « HbA_{1c} par électrophorèse capillaire : la technique de séparation adaptée aux enjeux du futur »

Evaluation du Capillarys 2 Flex Piercing[®] (SEBIA) en tant que nouvel automate pour le dosage de l'HbA_{1c}

S. Jaisson, Julie Meurice, N. Leroy, et P. Gillery

Laboratoire de Biologie et de Recherche Pédiatriques
Pôle de Biologie Médicale - CHU de Reims - France
E-mail: sjaisson@chu-reims.fr

HbA_{1c} : marqueur de référence pour le suivi du patient diabétique

- **Glycation de l'hémoglobine (Hb) : fixation non enzymatique d'oses sur les groupements aminés**
- **HbA_{1c} : glycation par le glucose sur les valines N-terminales des chaînes β**
- **Processus spontané, cumulatif et irréversible dépendant de la durée de vie des globules rouges et de la glycémie**

↪ **La mesure du taux d'HbA_{1c} offre une information rétrospective (6 à 8 semaines) sur l'équilibre glycémique du patient**

- **Relation entre HbA_{1c} élevée et complications dégénératives du diabète**
- **Valeurs de référence : 20 - 42 mmol/mol Hb (unités IFCC) ou 4 - 6 % de l'Hb totale (unités NGSP)**

Bon équilibre glycémique : < 53 mmol/mol Hb (< 7 %)



Méthodes disponibles pour le dosage de l'HbA_{1c}

■ La glycation entraîne des modifications physico-chimiques et immunologiques de l'Hb

↳ Développement de méthodes analytiques spécifiques

**Méthode de
référence
IFCC**

- HPLC - Spectrométrie de masse/Electrophorèse capillaire
(*Hexapeptide N-terminal des chaînes β*)

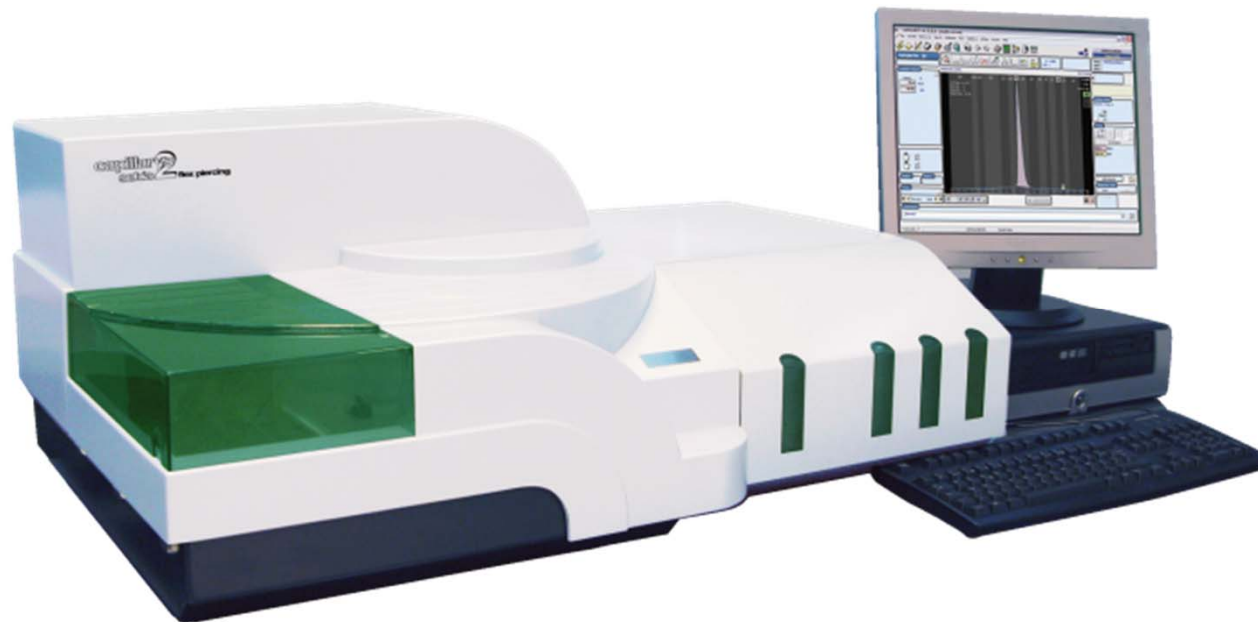
**Méthodes
de routine**

- HPLC (échange cationique)
- Chromatographie d'affinité (boronate)
- Tests immunologiques

....

[Electrophorèse capillaire \(Capillarys 2 Flex Piercing - SEBIA\)](#)

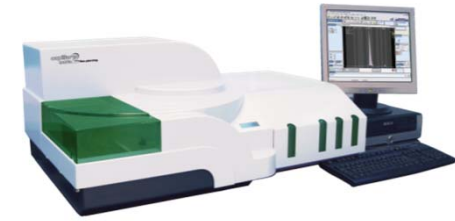
Capillarys 2 Flex Piercing®



**Automate multi-paramétrique : électrophorèse des protéines (sérum et urine*),
immunotypage, hémoglobine, CDT....et HbA_{1c} (méthode certifiée NGSP et IFCC)**

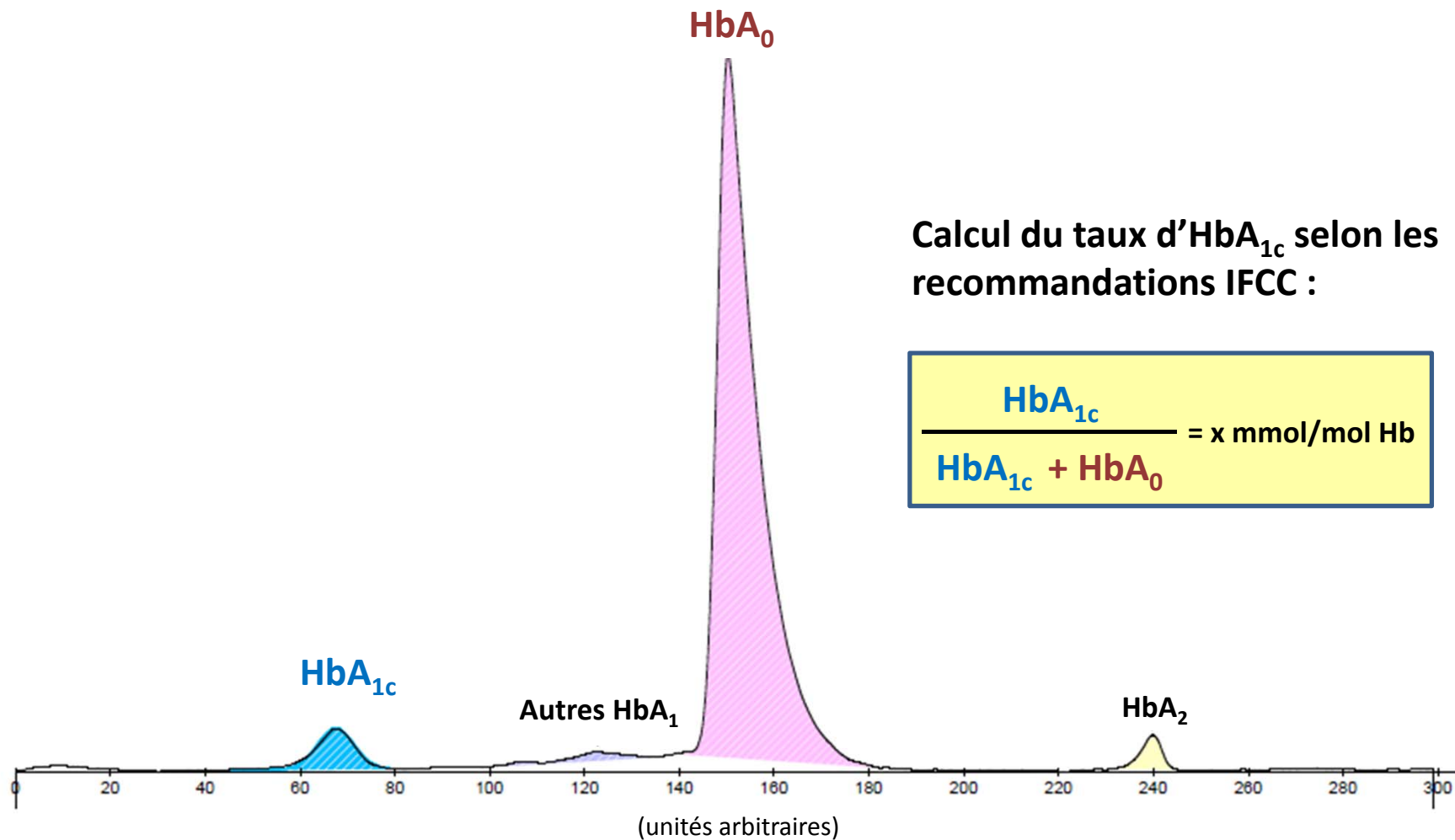
*** Bientôt disponible**

Capillarys 2 Flex Piercing[®] : kit HbA_{1c}



- ❑ Complètement automatisé
- ❑ Séparation de toutes les fractions de l'Hb par électrophorèse capillaire avec quantification par spectrophotométrie (415 nm)
- ❑ Résultats d'HbA_{1c} exprimés en unités IFCC (mmol/mol) et/ou unités NGSP (%)
- ❑ Affichage optionnel de la glycémie moyenne estimée (eAG, en mg/dL)
- ❑ Echantillons : tubes primaires bouchés (vol. min. 1 ml) ou tubes coniques spécifiques (vol. min. 100 µL)
- ❑ 8 capillaires disposés en parallèle (analyse simultanée de 8 échantillons)
- ❑ Débit : 40 échantillons à l'heure
- ❑ Automate piloté par le logiciel Phoresis[®] disposant d'une capacité de stockage illimitée

Profil électrophorétique

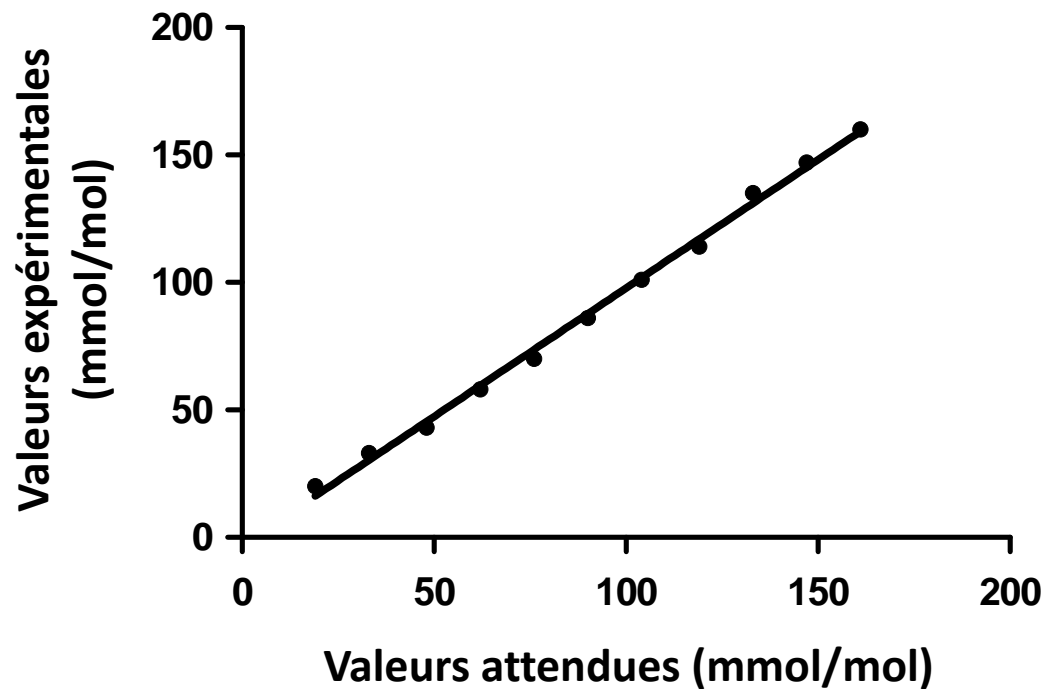


Protocole d'évaluation

- ↳ Linéarité
- ↳ Précision
- ↳ Corrélation avec une méthode HPLC (Variant II kit NU - BioRad)
- ↳ Exactitude
- ↳ Influence de la concentration d'hémoglobine
- ↳ Interférences analytiques :
 - *HbA_{1c} labile*
 - *Hb carbamylée*
 - *Bilirubine*
 - *Triglycérides*
- ↳ Hb fœtale et Hb anormales (Hb S, D, C, E)

Linéarité

- ↳ Dilutions en série de deux échantillons présentant des taux d'HbA_{1c} bas et élevé
- ↳ Evaluation de la linéarité entre 19 et 161 mmol/mol (3,9 et 16,9 % d'HbA_{1c})



$$y = 1,0066x - 2,9505$$
$$r = 0,999$$

Précision

Etude réalisée sur 8 systèmes
de séparation différents
(8 capillaires)

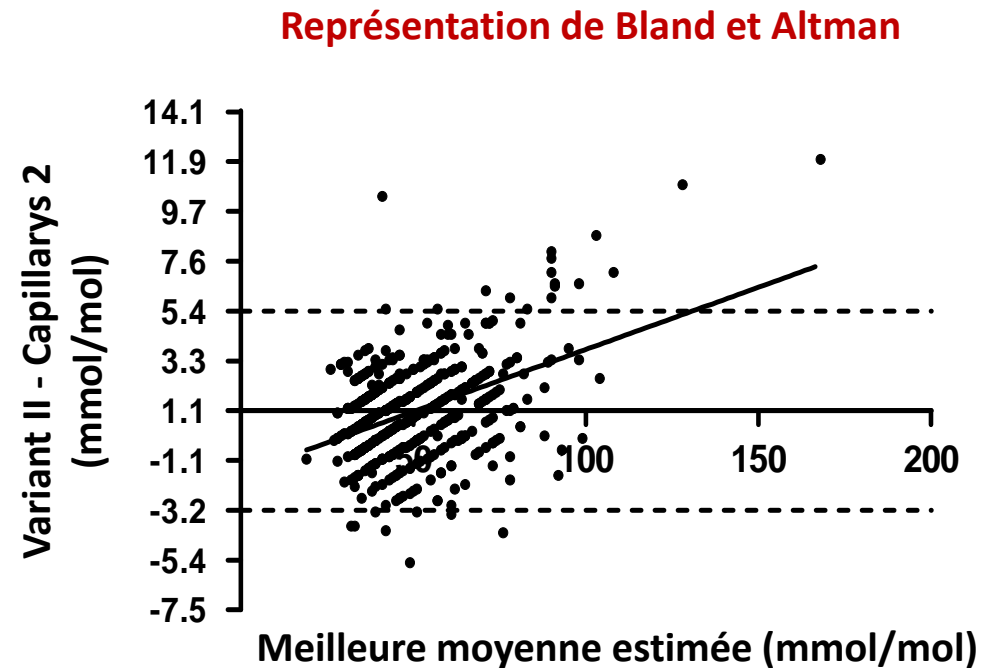
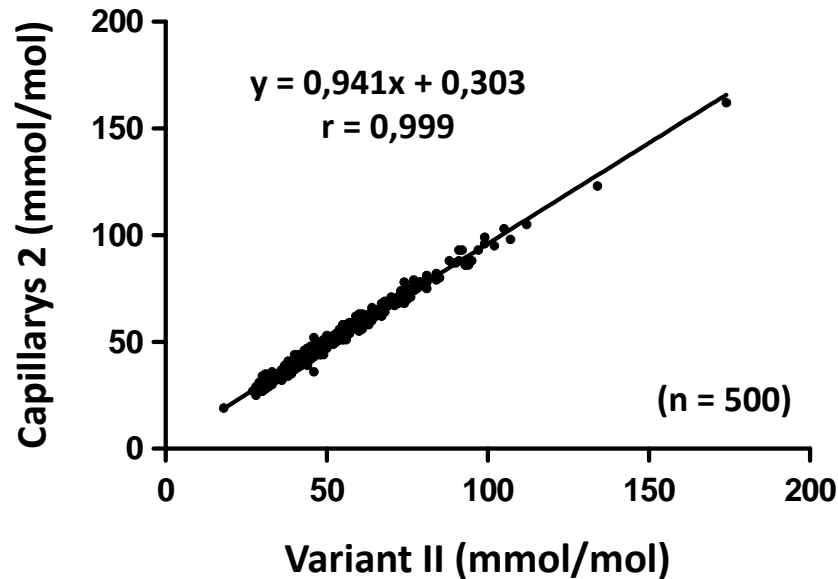
■ Répétabilité (n = 20)

HbA _{1c} (%)	Moyenne (ET)	CV (%)
Faible	5,04 (0,10)	1,98
Intermédiaire	7,48 (0,11)	1,47
Elevé	11,22 (0,17)	1,51

■ Reproductibilité (n = 20)

HbA _{1c} (%)	Moyenne (ET)	CV (%)
Faible	5,22 (0,14)	2,68
Intermédiaire	6,93 (0,09)	1,30
Elevé	11,44 (0,26)	2,27
CQ (niveau bas)	5,16 (0,10)	1,94
CQ (niveau haut)	10,73 (0,18)	1,68

Corrélation avec une méthode HPLC (Variant II kit NU, BioRad) sur des échantillons ne présentant pas d'Hb anormales



↪ Bonne corrélation entre le Capillary 2 et le Variant II (HPLC)

- Valeurs d'HbA_{1c} plus élevées sur le Variant II sur la partie haute du domaine de mesure (> 86 mmol/mol)
- 3,4% de valeurs discordantes selon la représentation de Bland et Altman
- Impossible de conclure car pas de comparaison à la méthode de référence

Exactitude

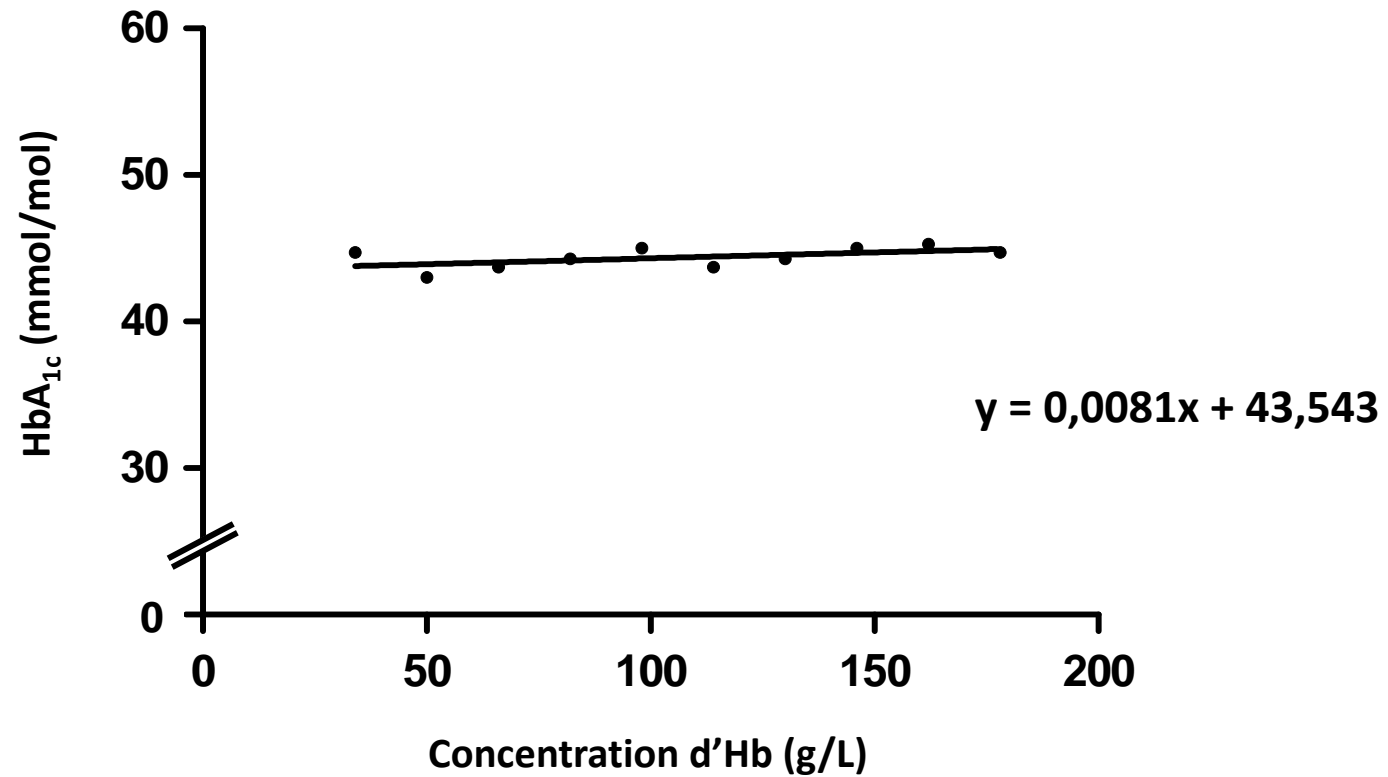
↳ Echantillons d'évaluation externe de la qualité (European Reference Laboratory for Glycohemoglobin Educational Programme 2010)

↳ Comparaison aux cibles IFCC

	Cible IFCC (mmol/mol)	Capillarys 2 (mmol/mol)	IFCC - Capillarys 2 (mmol/mol)
Echantillon 1	45	45	0
Echantillon 2	63	63	0
Echantillon 3	41	41	0
Echantillon 4	72	74	-2
Echantillon 5	54	54	0
Echantillon 6	63	63	0
Echantillon 7	45	46	-1
Echantillon 8	76	79	-3
Echantillon 9	32	33	-1
Echantillon 10	54	54	0

Influence de la concentration d'Hb

- ↳ Dilution de sang total par du NaCl 0,15 M (concentrations finales d'Hb : de 34 à 178 g/L)
- ↳ Mesure de l'HbA_{1c} (triplicate)

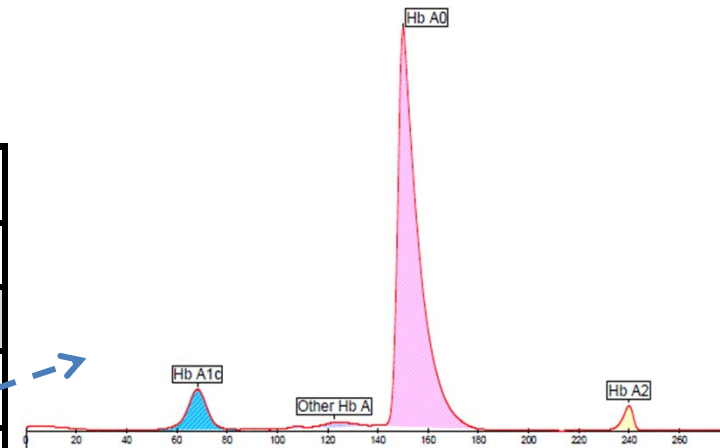


Interférences analytiques

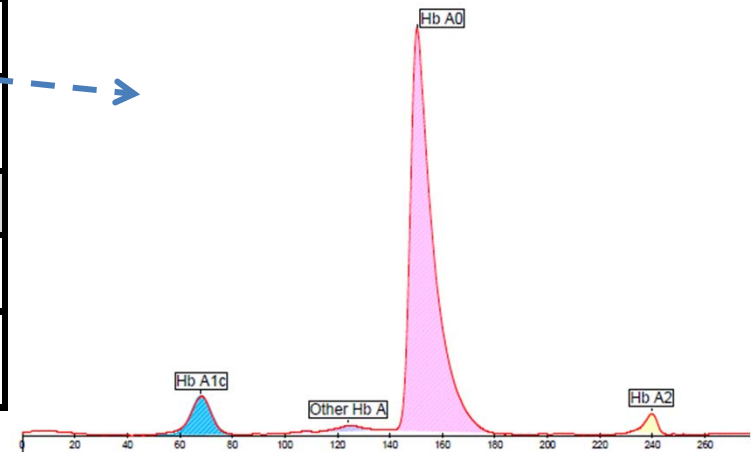
HbA_{1c} labile

	Incubation à 37°C avec 0,5 mol/L Glucose (min)					
	0	10	20	30	60	90
	Niveau 1					
HbA _{1c} labile (%) *	0,8	3,1	4,5	5,7	9,3	10,4
HbA _{1c} (mmol/mol)	34	34	33	33	33	34
	Niveau 2					
HbA _{1c} labile (%)	1,5	3,1	4,7	6,2	9,1	10,5
HbA _{1c} (mmol/mol)	60	59	60	59	58	58
	Niveau 3					
HbA _{1c} labile (%)	1,5	3,2	4,6	5,9	8,4	10,3
HbA _{1c} (mmol/mol)	99	100	100	97	96	99

* Valeur estimée à partir de la méthode HPLC (Variant II - BioRad)



Profil non modifié



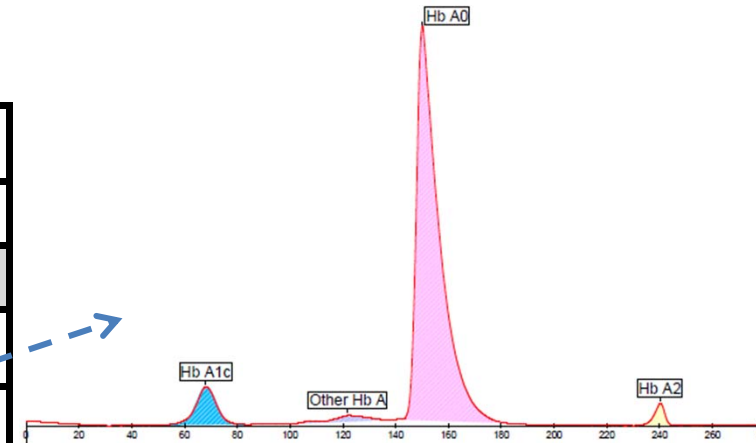
→ Pas d'interférence de la fraction labile de l'HbA_{1c}

Interférences analytiques

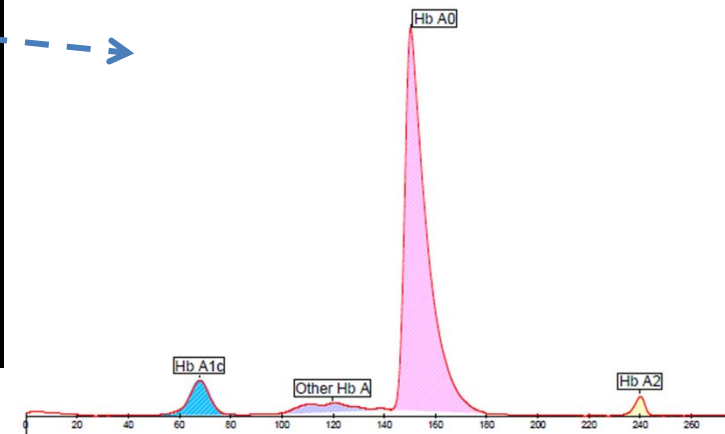
Hb carbamylée

	Incubation 3 h à 37°C avec du KCNO (mmol/L)					
	0	0,12	0,25	0,5	0,75	1
	Niveau 1					
cHb (%) *	0,8	1,5	2,4	3,9	5,4	6,5
HbA _{1c} (mmol/mol)	32	33	32	32	33	33
	Niveau 2					
cHb (%)	0,9	1,6	2,0	3,8	4,7	5,3
HbA _{1c} (mmol/mol)	53	53	51	53	51	52
	Niveau 3					
cHb (%)	2,0	2,6	3,4	5,4	6,5	8,1
HbA _{1c} (mmol/mol)	87	86	85	85	85	87

* Valeur estimée à partir de la méthode HPLC (Variant II - BioRad)



Profil non modifié

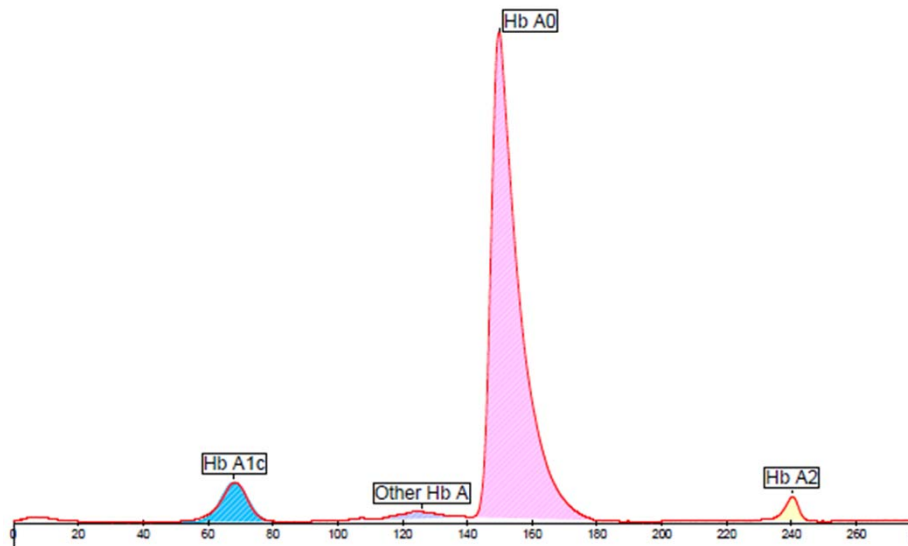


→ Pas d'interférence de l'Hb carbamylée

Interférences analytiques

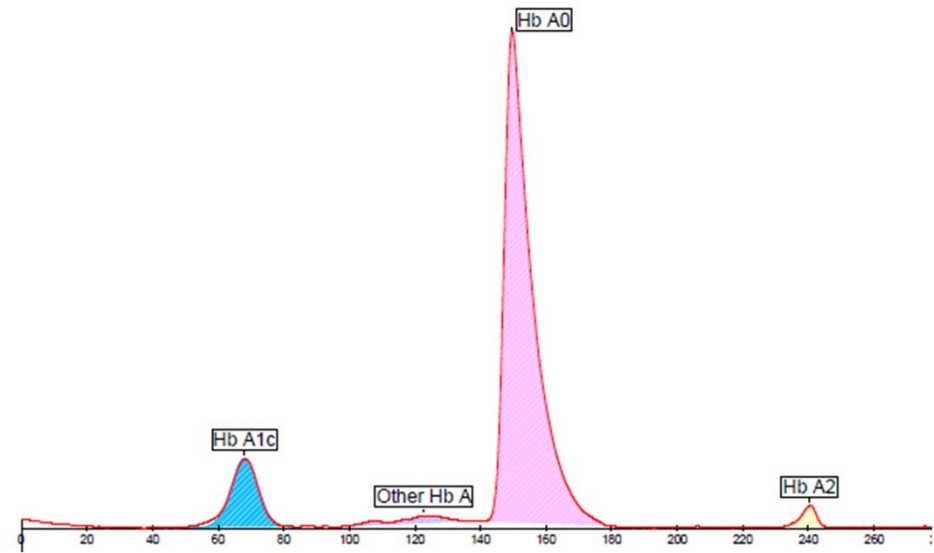
Triglycérides

Echantillon contenant 13 mmol/L TG



Bilirubine

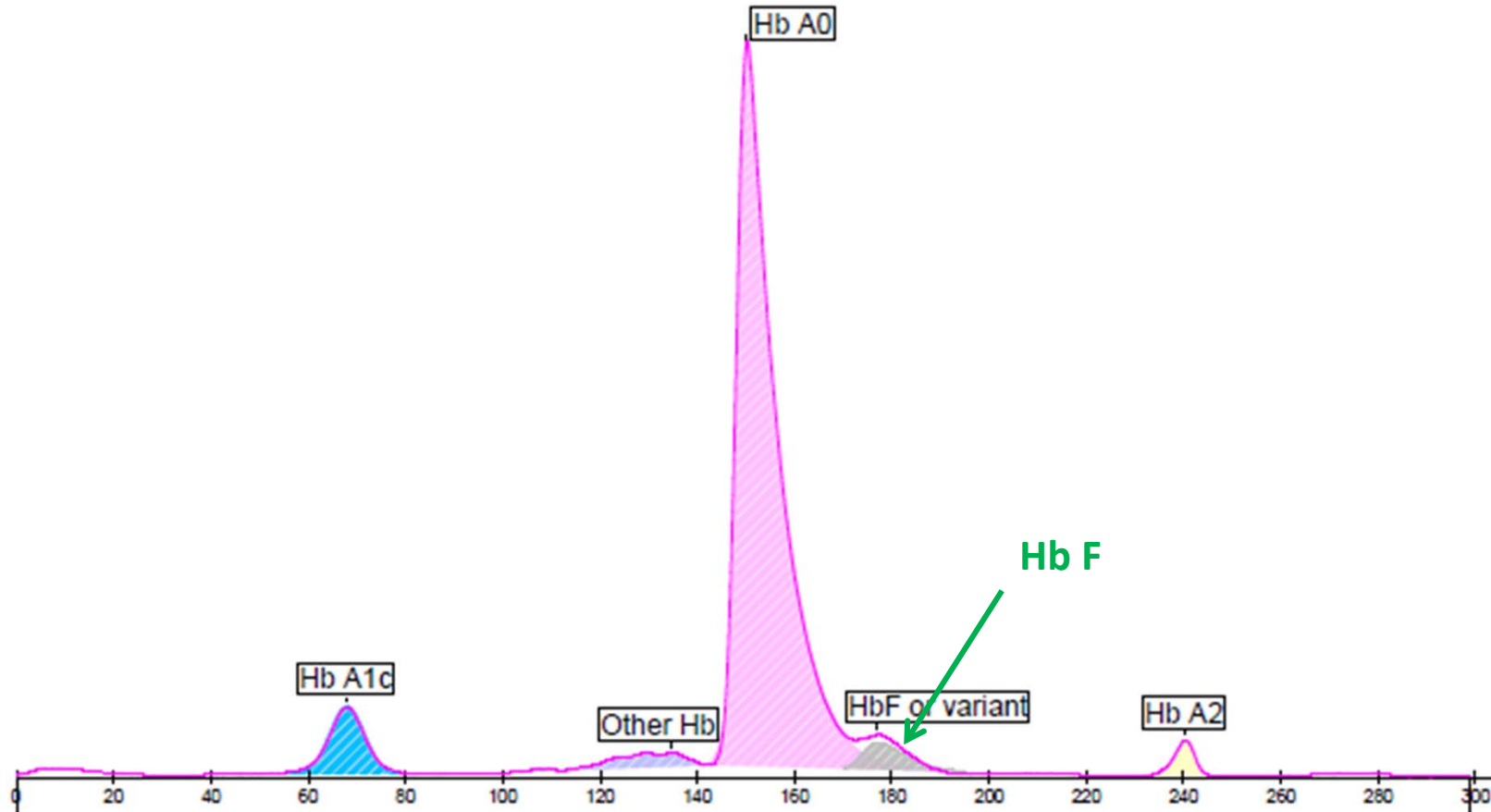
Echantillon contenant 300 µmol/L de bilirubine



→ Pas d'interférence des triglycérides et de la bilirubine

Hb foetale

■ Hémoglobine F



↳ Pas d'interférence sur l'intégration des pics d'HbA_{1c} et d'HbA₀ car le logiciel réalise un « fitting » spécifique des courbes

Hb foetale

📌 Hémoglobine F

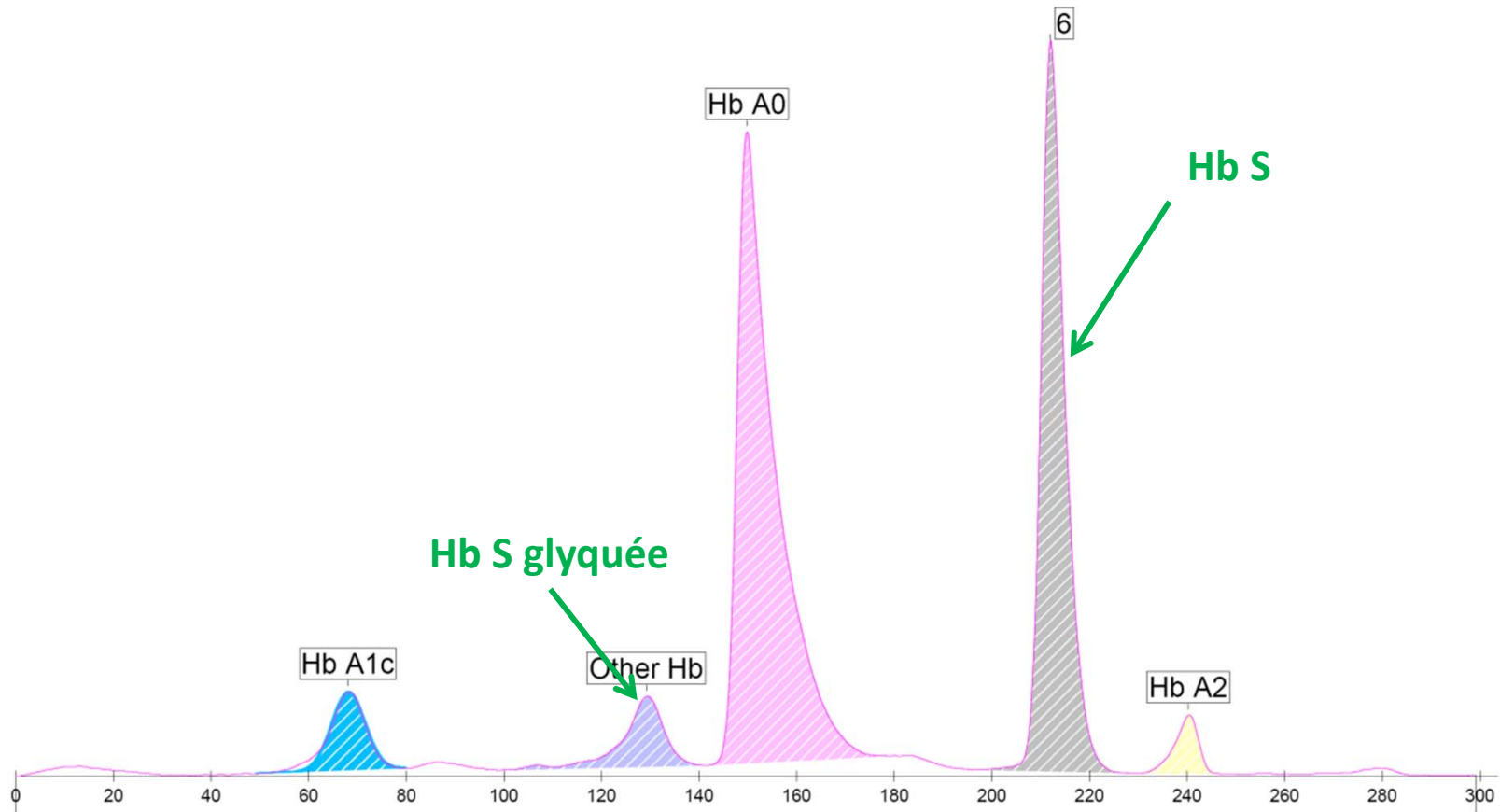
	% Hb F après addition de sang de cordon						
	0	3,5	4,7	8,1	10,8	13,4	17,7
	Niveau 1						
HbA _{1c} (mmol/mol)	36	37	36	35	35	36	34

	% Hb F après addition de sang de cordon						
	0	2,9	4,6	7,5	9,9	13,5	16,3
	Niveau 2						
HbA _{1c} (mmol/mol)	67	69	67	68	67	68	65

↪ Pas d'interférence jusqu'à 16 % d'HbF

Hb anormales

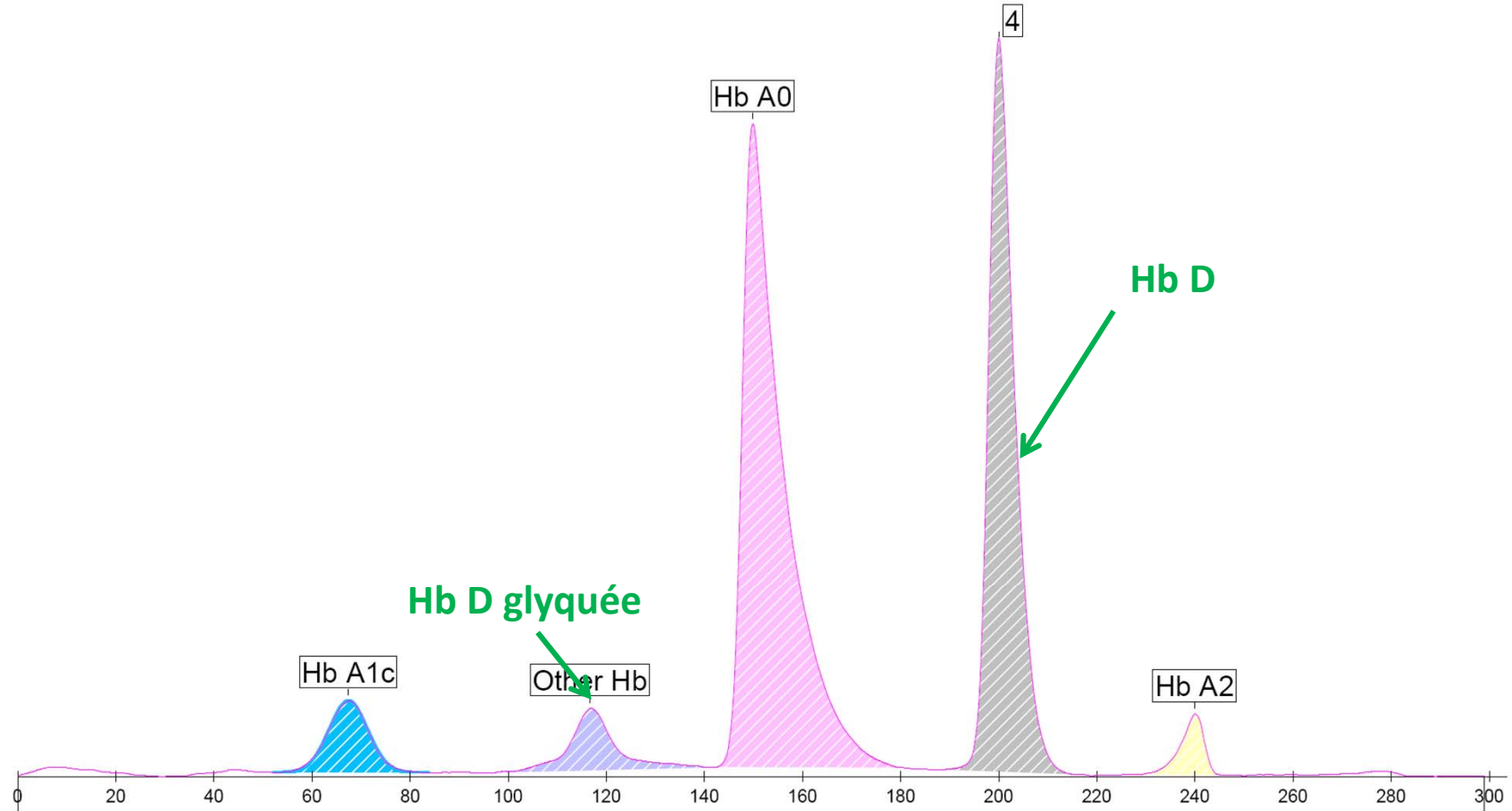
Hémoglobine S



↳ Pas d'interférence sur l'intégration des pics d'HbA_{1c} et d'HbA₀

Hb anormales

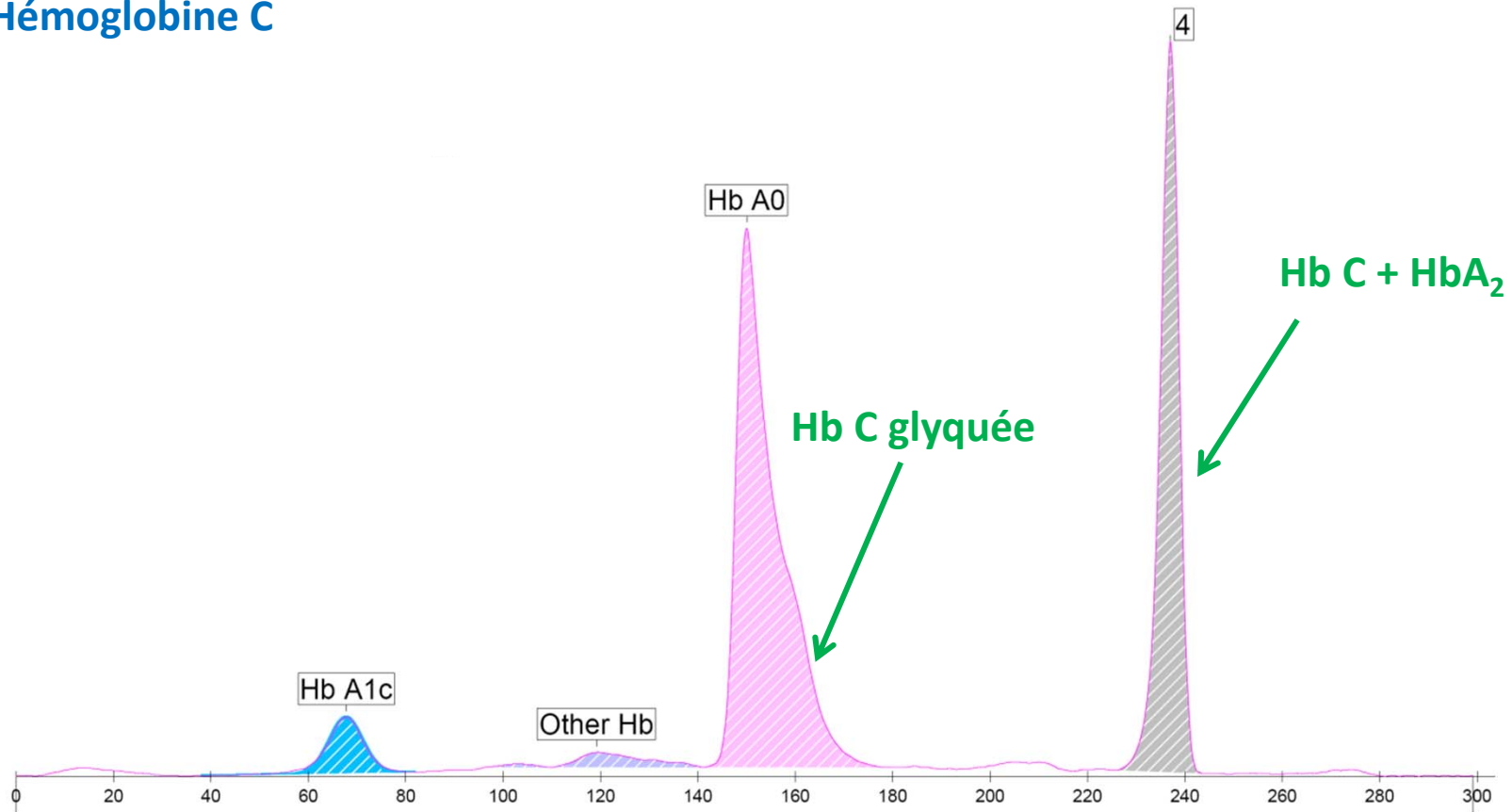
📄 Hémoglobine D



➔ Pas d'interférence sur l'intégration des pics d'HbA_{1c} et d'HbA₀

Hb anormales

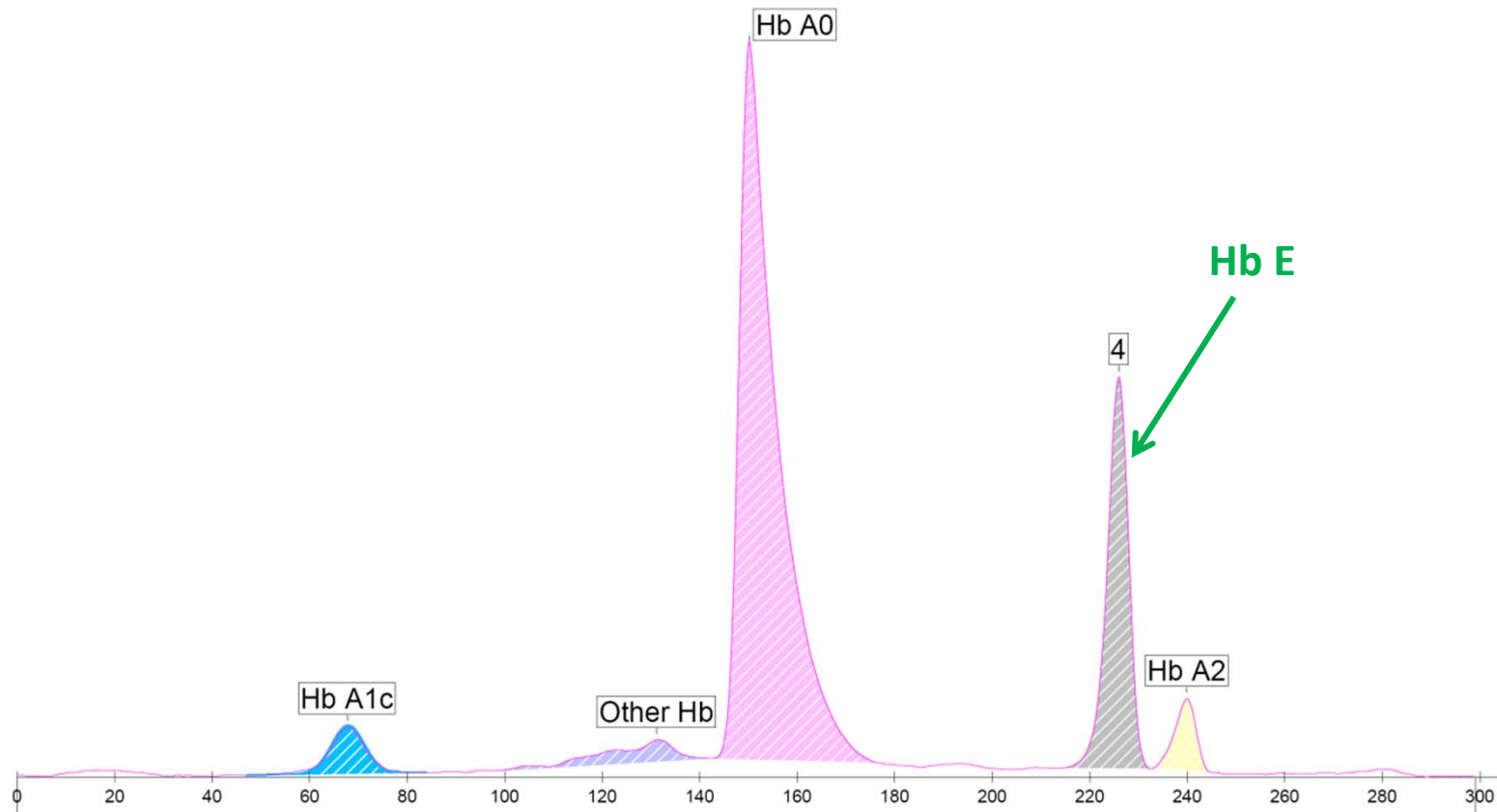
📄 Hémoglobine C



➔ Formation d'un épaulement sur le pic d'HbA₀ mais la quantification de l'HbA_{1c} est possible par soustraction (réalisée automatiquement par le logiciel) de l'aire estimée de l'HbC glyquée à l'aire du pic d'HbA₀

Hb anormales

Hémoglobine E

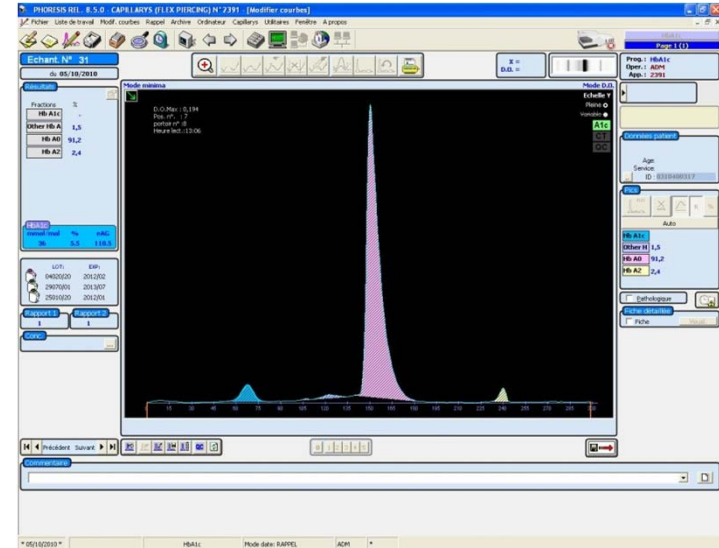


➔ Pas d'interférence sur l'intégration du pic d'HbA_{1c}*

* Influence de l'HbE glyquée sur le calcul de l'HbA_{1c} actuellement à l'étude (comparaison avec la méthode de référence IFCC (LC-MS))

Praticabilité et ergonomie

- ❑ Simple d'utilisation
- ❑ Maintenance simple à réaliser
- ❑ Logiciel convivial (Phoresis)
- ❑ Etape de validation rapide :
 - Mosaïque d'écrans permettant l'affichage simultané de 48 résultats
 - Identification rapide (basée sur des codes couleur) des différents profils (normal, pathologique et atypique)
- ❑ Affichage des résultats et impression **personnalisables** :
 - HbA_{1c} en mmol/mol et/ou %
 - Estimation de la glycémie moyenne (mg/dL)
- ❑ Débit élevé (8 capillaires disposés en parallèle) : 40 échantillons à l'heure
- ❑ Bonne traçabilité des réactifs et des données



Conclusion

- ▣ **Nouvelle méthode de séparation** de l'HbA_{1c}
- ▣ Première fois que l'électrophorèse capillaire est utilisée en routine pour le dosage de l'HbA_{1c}
- ▣ **Très bonnes performances analytiques** à un débit élevé
- ▣ **Pas d'influence des interférences analytiques** les plus fréquentes (HbA_{1c} labile, Hb carbamylée, triglycérides et bilirubine)
- ▣ La quantification d'HbA_{1c} est possible **en présence des principales Hb anormales**

↳ Les performances analytiques du kit de dosage de l'HbA_{1c} sur Capillarys 2 Flex Piercing® sont conformes aux critères de qualité requis pour son utilisation en routine au sein d'un laboratoire de biologie médicale