

**FACULTATEA DE MEDICINĂ  
NUTRIȚIE ȘI DIETETICĂ ANUL I  
ȘEF LUCRĂRI DR. FELICIA SFRIJAN**  
[sfrijan.felicia@umft.ro](mailto:sfrijan.felicia@umft.ro)

**BIOCHIMIE  
LUCRAREA PRACTICĂ NR. 4**

**Determinarea hemoglobinei glicozilate (HbA<sub>1c</sub>)**

**Introducere**

În încercările de monitorizare cât mai eficientă a echilibrului metabolismului glucidic, cu posibilitatea aprecierii cât mai corecte a scăderii toleranței la glucoză, un rol important revine determinării hemoglobinei glicozilate.

*HbA<sub>1c</sub> rezultă printr-o reacție de glicozilare lentă, neenzimatică între glucoza care pătrunde cu ușurință în eritrocit și aminoacidul valină de la capătul N-terminal al lanțurilor β ale hemoglobinei.* Nivelul HbA<sub>1c</sub> din sânge se corelează atât cu timpul de înjumătățire al hemoglobinei, cât și cu nivelul mediu al glucozei sangvine pe perioada duratei de viață a hemoglobinei. Astfel, creșterea HbA<sub>1c</sub> este proporțională cu nivelul mediu al glucozei sangvine (glicemia medie) în cursul ultimelor 2-3 luni anterioare testării (corespunzătoare duratei medii de viață a eritrocitelor).

eAG = estimated average glucose = glicemia medie estimată

$$\text{eAG (mg/dL)} = 28.7 \times \text{HbA}_{1c} - 46,7$$

În evaluarea nivelului mediu al glicemiei pe o perioadă de 2-3 luni, se efectuează determinarea HbA<sub>1c</sub> și pe baza relației de mai sus se calculează valoarea medie a glicemiei pe perioada respectivă. În acest mod se stabilește gradul de compensare al hiperglicemiei în perioada urmărită.

HbA <sub>1c</sub>	eAG	
	mg/dL	mmol/L
6	126	7
6,5	140	7,8
7	154	8,6
7,5	169	9,4
8	183	10,1
8,5	197	10,9
9	212	11,8
9,5	226	12,6
10	240	13,4
11	269	14,9
12	298	16,5

Determinarea HbA1c constituie un test de evaluare și monitorizare pe termen lung a controlului glicemic la pacienții cu diabet zaharat. Are un rol predictiv în ceea ce privește riscul complicațiilor diabetului: cetoacidoza, nefropatia, retinopatia.

Frecvența testării HbA1c depinde de tipul de diabet și de stabilitatea controlului glicemic:

- la 3-4 luni, pentru pacienții cu diabet zaharat tip I sub tratament convențional;
- la 1-2 luni, pentru pacienții cu diabet zaharat tip I sub tratament intensiv;
- la 6 luni, pentru pacienții cu diabet zaharat de tip II cu un control glicemic stabil;
- la fiecare 1-2 luni pentru gravidele cu diabet zaharat;
- la fiecare 1-2 luni pentru pacientele cu diabet gestațional.

În stabilirea acestei decizii au fost luate în considerare **avantajele** pe care le prezintă determinarea HbA1c față de glicemie:

- Nu sunt necesare condițiile “a jeun”;
- Stabilitate preanalitică mai mare;
- Variație biologică individuală ↓ în comparație cu glicemia;
- Variații ↓ în condiții de stres și afecțiuni intercurrente.

Pe de altă parte, există și unele **dezavantaje** ale HbA1c:

- Cost mai ridicat/analiză;
- Lipsa de disponibilitate a testului în unele laboratoare;
- Lipsa de corelație a HbA1c cu glicemia medie la unele persoane (cu obezitate, hipotiroidism, anemie hemolitică, neoplasme, etc);
- HbA1c nu este relevantă la pacienții cu *turn-over eritrocitar anormal* (anemii hemolitice, anemii feriprive); în aceste situații diagnosticul diabetului trebuie să se bazeze exclusiv pe valorile glicemiei.

### **Interpretarea rezultatelor**

- creșterea HbA1c indică prezența unei hiperglicemii în ultimele 2-3 luni;
- valorile sunt crescute la persoanele cu diabet zaharat controlat deficitar sau nou diagnosticat;
- diabetul zaharat este controlat adecvat când se obțin valori sub 7%;
- nivelul Hb A1c poate crește până la 20% în cazul unui control glicemic deficitar;
- scăderea HbA1c are loc treptat, pe durata mai multor luni, pe măsură ce hematiile cu hemoglobină glicozilată normală le înlocuiesc pe cele cu niveluri crescute.

Există mai multe metode de determinare a concentrației hemoglobinei glicozilate: cromatografia pe coloană cu rășini schimbătoare de ioni, cromatografia de lichide de înaltă presiune (HPLC), cromatografia de afinitate, metode electroforetice, metode fotometrice bazate pe reacția de culoare cu acidul tiobarbituric și metode imunologice.

### **Aplicație practică**

**Determinarea hemoglobinei glicozilate (HbA<sub>1c</sub>) prin metoda cu schimbători de ioni (Micro Coloane)**

#### **Principiul**

După pregătirea preparatului hemolizat, de unde fracția labilă a fost eliminată, hemoglobinele sunt reținute prin rașina schimbătoare de ioni, hemoglobina A1c este eluată specific după înlăturarea prin spalare a celorlalte fracții HbA1a+b, și este cuantificată prin citire fotometrică directă la 415nm.

#### **Reactivi**

1. Reactiv 1 (R1): conține Ftalat de potasiu (50 mmol/l), Azida de sodiu (0.95 g/l), Detergent (5 g/l);
2. Reactiv 2 (R2): conține Tampon fosfat pH 6.5 (30 mmol/l), Azida de sodiu (0.95 g/l);
3. Reactiv 3 (R3): conține Tampon fosfat pH 6.5 (72 mmol/l), Azida de sodiu 0.95 g/l;

*Atenție!!!: Reactivii conțin azidă de sodiu. Evitați contactul cu pielea și mucoasele!*

4. Material biologic: sânge recoltat pe EDTA, stabil o săptămână la frigider.

#### **Mod de lucru:**

##### **A. Pregătirea hemolizatului și eliminarea fracției labile:**

1. Aduceți reactivii și coloanele la temperatura camerei (21-26°C).
2. Pipetați 50 μl sânge și 200 μl reactiv 1 (**R1**) într-un tub pentru testare și agitați bine. Lăsați apoi pentru 10-15 minute. Acest preparat hemolizat se va utiliza în pașii 5 și 10.

*!!! (Acest hemolizat de probă sânge este gata preparat în sala de lucrări).*

##### **B. Pregătirea coloanelor:**

3. Înlăturați capacul coloanei, apoi rupeți vârful de la capătul inferior al coloanei.
4. Cu ajutorul unei pipete cu terminație plată, împingeți discul până la suprafața rășinei, având grijă să nu o compresăți. Lăsați coloana să se scurgă complet.

##### **C. Separarea HbA1c:**

5. Pipetați 50 μl de hemolizat în filtrul superior și lăsați coloana să se scurgă în totalitate, pentru a se scurge orice reziduu de probă rămas deasupra discului.
6. Adăugați 200 μl reactiv 2 (**R2**) și lăsați coloana să se scurgă complet.
7. Pipetați apoi 2 ml reactiv 2 (**R2**) și lăsați coloana să se scurgă în totalitate.
8. Plasați coloana deasupra unui nou tub de testare (eprubetă), adăugați 4 ml de reactiv 3 (R3) și colectați eluatul (*fracția HbA1c*).
9. Agitați bine și citiți absorbanta (A) fracției HbA1C la 415 nm față de apa distilată (AHbA1c). Absorbanta este stabilă pentru cel puțin 1 oră.

##### **D. Citirea Hb Total:**

10. Pipetați 12 ml reactiv 3 (**R3**) și 50 μl hemolizat într-o eprubetă.
11. Agitați bine și citiți absorbanta (*A<sub>total</sub>*) față de apa distilată. Absorbanta este stabilă pentru cel puțin 1 oră.

#### **CALCUL:**

$$\% \text{ HbA1c} = (\Delta A \text{ HbA1c} / \Delta A \text{ Hb Total}) \times (V \text{ HbA1c} / V \text{ Hb Total}) \times 100$$

Volumul HbA1c (V<sub>HbA1c</sub>) este de 4 ml, volumul Hb total (V<sub>HbTotal</sub>) este de 12 ml.

Urmatoarea formula este redusa pentru calcularea concentratiei:

$$\frac{\Delta A \text{ HbA1c}}{\Delta A \text{ Hb Total}} \times \frac{100}{3} = \% \text{ HbA1c}$$

Rezultatele obținute prin metoda prezentă pot fi echivalate cu cele obținute printr-o metoda standardizată certificată (NGSP) sau echivalată cu metoda standardizată a 'Internaional Federation of Clinical Chemistry' (IFCC), utilizând formulele de mai jos:

$$\% \text{HbA1c-NGSP} = 0.86 \times \% \text{HbA1c-Fortress} + 0.24$$

$$\% \text{HbA1c-IFCC} = 0.94 \times \% \text{HbA1c-Fortress} - 2.09$$

**Valori normale**

**Nediabetici:** 4-6% din valoarea hemoglobinei totale

**Diabet zaharat controlat:** 6,5-7% din valoarea hemoglobinei totale.