

Laboratóriumi eljárások a glikozilált hemoglobin meghatározására: összehasonlító elemzés

Nemes-Nagy Enikő¹, Al-Aissa Zahra oh., Kirizs Róbert oh., Szócs Katalin², Mareş-Ferencz Gizella¹,
Jákó Zsuzsanna oh., Dobreanu Minodora³, Reid Deborah⁴, Higgins Trefor⁴

Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetem, ¹Orvosi Biokémia Tanszék, ²2. sz. Belgyógyászati Klinika,

³Klinikai Biokémia és Laboratórium Tanszék, ⁴DynaLifeDx (előzőleg Dynacare-Kasper Medical Laboratories), Edmonton, Kanada

Metode de laborator utilizate pentru dozarea hemoglobinei glicate: studiu comparativ

Introducere: Hemoglobina glicată (HbA1c) este un parametru important în urmărirea pacienților diabetici. În vederea obținerii unor rezultate reale, este esențială utilizarea unei metode adecvate. Scopul lucrării este prezentarea comparativă a patru metode de dozare a HbA1c. Material și metodă: Majoritatea dozărilor de HbA1c s-au efectuat la Laboratorul Central al Spitalului Județean de Urgență Mureș cu aparatul Variant Hemoglobin Testing System (Bio-Rad), numeroase rezultate provin de la o nouă generație a acestui analizor, Variant II (Edmonton, Canada), am prelucrat probe cu setul de reactivi Biomidi utilizând o metodă cromatografică manuală, respectiv am efectuat analize și cu aparatul Micromat II (Bio-Rad). Rezultate: Valorile obținute prin diferitele metode au arătat o corelație bună ($r > 0,9$), cu excepția probelor cu hemoglobinopatii și a celor păstrate inadecvat. Metodele automate prezintă o serie de avantaje comparativ cu cele manuale. Concluzii: Dozarea hemoglobinei glicate arată fidel echilibrul metabolic al pacienților diabetici utilizând oricare dintre cele patru procedee, și oferă informații utile în vederea deciziei terapeutice.

Cuvinte cheie: hemoglobină glicată, diabet zaharat

Laboratory methods used to measure glycated hemoglobin: comparison study

Introduction: Glycated hemoglobin (HbA1c) is an important parameter in monitoring diabetic patients. Using adequate methods is essential to obtain reliable results. The aim of the study is to compare four methods used to measure HbA1c. Material and methods: The majority of the samples were analyzed at the Central Laboratory of the County Emergency Hospital in Târgu Mureș using the Variant Hemoglobin Testing System (Bio-Rad). Several results were obtained working on the new generation of this analyzer called Variant II (Edmonton, Canada). We also used the Biomidi reagent kit working with a manual chromatographic method, and some samples were analyzed with Micromat II (Bio-Rad). Results: The values obtained by different methods showed good correlation ($r > 0,9$) except samples of patients presenting hemoglobin variants and those preserved inadequately. Automatic methods exhibit several advantages compared to manual methods. Conclusions: Dosage of glycated hemoglobin results in reliable values regarding carbohydrate metabolic balance in diabetic patients performing any of the methods mentioned, providing useful information concerning therapy.

Keywords: glycated hemoglobin, diabetes mellitus

Orvostudományi Értesítő, 2009, 82 (3): 204-206

www.orvtudert.ro

A glikozilált hemoglobin (HbA1c) a cukorbetegyek követésében használt értékes állapotjelző. A megbízható eredmény érdekében igen fontos egy megfelelő módszer használata [3].

Legtöbb esetben ezen laboratóriumi vizsgálat értéke döntő a kezelés szempontjából, tükrözi az előző 6-8 hét vércukorszintjeit. Cukorbetegyeknél általában 7% alatti HbA1c értékre törekszünk [1, 4, 8, 9, 10].

Egyes hemoglobin variánsok rátevődnek a glikozilált hemoglobin meghatározására különösen a régebbi, nem elég szelektív eljárásoknál, de a magas nyomású folyadékkromatográfiás (HPLC) módszer esetében is találkozunk ilyen természetű problémákkal [2, 6, 7, 5].

Célkitűzés

A glikált hemoglobin meghatározására szolgáló módszerek sokféleségéből kiindulva összehasonlító tanulmányt készítettünk négy eljárásról, felmérve ezek előnyeit és hátrányait, illetve a kapott eredmények közti különbségeket.

Anyag és módszer

A HbA1c meghatározásához a vérpróbákat alvadégtól v vesszük, leginkább EDTA (etiléndiaminotetraacetát) nátrium vagy kálium sójára. A minták leülepedésének meggátolása érdekében a kémcsöveket 4°C-on tartjuk és a módszer függvényében 4, 7 vagy 10 napon belül feldolgozzuk.

A meghatározások zöme ($n = 2540$) a Marosvásárhelyi Megyei Kórház Központi Laboratóriumában történt, a Bio-Rad cég HbA1c reagenskészletével, a VariantTM Hemoglobin Testing System készüléken. Ez egy magas nyomású folyadék kromatográfián alapuló automata analizátor, beépített fotométere két hullámhosszon olvassa le az abszorbancia értékeket: 415 és 690 nm-en, és kromatogram kinyomtatásával zárul a vizsgálat.

Az előző gép újabb generációjával, a számítógépesített Variant II-vel Edmontonban, Kanadában sikerült dolgozni, ezzel a készülékkel 150 vérmintát vizsgáltunk meg, köztük számos hemoglobinopathiás esetet.

A manuális fotometriás módszernél a Biomidi cég reagenskészletével dolgoztunk ($n = 130$) a MOGYE Orvosi Biokémia Tanszékén, az abszorbancia értékeket 425 nm hullámhosszon olvastuk le, százalékban kifejezve a glikált hemoglobin értékét az összhemoglobinhoz viszonyítva. A 130 próba közül 45 volt előzőleg a Variant I készüléken is feldolgozva, ezek között előfordultak különböző anyagcsere egyensúlyban található cukorbetegyek vérmintái, illetve kiválogattunk számos magas HbF-et mutató próbát

Dr. Nemes-Nagy Enikő

540135 Marosvásárhely - Târgu Mureș

Str. Făget 24/8

E-mail: nneniko@gmail.com

(ez utóbbiaknál kapott értékek nem szerepelnek a korrelációt szemléltető ábrán). Az eredmények kiszámításához az alábbi képletet használtuk: $(\text{AHbA1c} \times 100) / (3 \times \text{AösszHb}) = \% \text{HbA1c}$.

Negyedik módszerként kipróbáltuk a Micromat II hordozható készüléket ($n=85$), amely beépített fotométert tartalmaz, és tesztkartusokkal történik a vizsgálat. Ezek közül 16 próbát elvégeztünk a Variant I készüléken is, néhány esetben szándékosan nem tartva be az előírt tárolási hőmérsékletet ($2-8^\circ\text{C}$).

Eredmények

A Variant I módszer előnye a manuális eljárásokkal szemben, hogy egyszerre akár 100 meghatározást végezhetünk. Az újabb generációs, számítógépesített Variant II korlátlan számú kémcső feldolgozására képes, és nincs szükség a próbák hígítására, mint az elődje esetén. A kromatogramokról leolvasható a glikált hemoglobin pontos értéke.

A cukorbetegség többségénél a manuális módszerrel illetve a Variant I készülékkel kapott értékek jó korrelációt mutattak ($r = 0,9643$, $p < 0,05$), viszont a magas főtális hemoglobint tartalmazó próbákból a manuális módszerrel hamisan nagy glikált hemoglobin értékeket kaptunk, mivel a HbA1c-vel egyidőben a HbF is leoldódik az oszlopról. A patológiás hemoglobin származékok jelenléte is befolyásolja az eredményt, mivel a HbA1c-től eltérő frakcióban jelenhet meg pl. a HbS, E, D, C glikozilált formája [7].

A kromatográfiás oszlopokkal történő manuális módszer reprodukibilitási tesztje az alábbi értékeket mutatta: variabilitási együttható 1,45% (képlete $\text{SD}/\text{M} \times 100$) és viszonylagos hibaszázalék 1,02% (képlete $\text{IXi-MI}/\text{M} \times 100$).

A Variant I készülék reprodukibilitási tesztje az alábbi értékeket mutatta: variabilitási együttható 0,9%, viszonylagos hibaszázalék 0,77% (1. ábra).

A Micromat II hordozható készülék előnye a kis méret, kapilláris vérből is lehet rajta dolgozni. Az eredmények jó korrelációt mutatnak a Variant I-en nyert adatokkal ($r = 0,9742$, $p < 0,05$), de megfigyeltük, hogy minden esetben az automata készülékkel némileg magasabb értékeket kaptunk (2. ábra). Ez a szisztémás hiba valószínűleg a készülék gyár-

tásából származik, mivel több különböző Micromat II esetben ugyanezt tudtuk megfigyelni (a külső kontroll adatai alapján). Azoknál a próbáknál, amelyek nem voltak végig hűtőben tárolva, az érték 1,5-2%-al kisebb értéket mutatott a Variant I-el történt méréshez képest. Ezeket a próbákat nem tüntettük fel a korrelációt ábrázoló grafikonon. A Variant I készülék kevésbé érzékeny a próbák tárolására, pár óráig szobahőmérsékleten tartott próbáknál is csupán néhány tizedesnyi eltérést találtunk az eredeti értékekhez képest.

A Variant I és II eredményei között nem tudunk korreláció analízist végezni, mivel a Variant I-el Kanadában történtek a meghatározások, a másik három módszerrel pedig Marosvásárhelyen dolgoztunk.

Következtetések

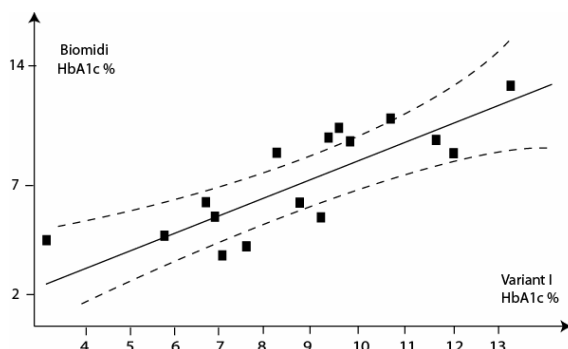
A HPLC készülékkel történő HbA1c meghatározás több szempontból előnyösebb a másik kettőhöz képest, de az eredmények általában nem mutatnak számottevő eltérést. A manuális módszerrel a HbF és HbA1b rátevéődnek a HbA1c frakcióra, ami zavart okozhat egyes cukorbetegség követésében és a diabetes kórisméjének felállításában. A patológiás hemoglobin származékok glükózzal kötött formája más frakcióban jelentkezik, ami szintén problémát jelent a glikált hemoglobin szintjének értékelésében.

A vizsgált négy módszer közül a legkevesbé megfelelő a manuális kromatográfiás eljárás (időigényes, a magas HbF zavarja a meghatározást).

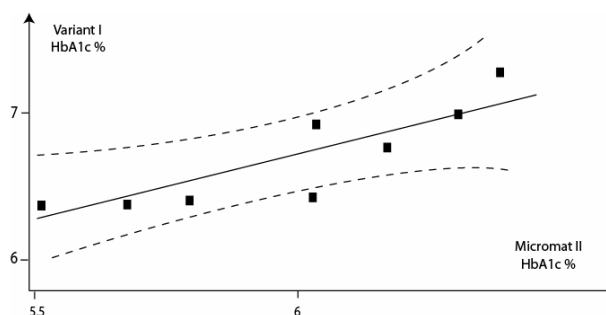
A legmodernebb a Variant II készülék, és ennek elődje, a Variant I. Ideálisak kórházi laboratóriumok számára (magas próbaszám feldolgozható rövid egységidő alatt, alkalmas haemoglobinopathiák diagnosztizálására).

A Micromat II megfelelő kisebb laboratóriumok illetve szakrendelők számára, a készülék hordozható, kapilláris vérből is elvégezhető a meghatározás, az értékek valamivel kisebbek a Variant I-hez képest. Igen lényeges betartani a megfelelő tárolási hőmérsékletet.

A glikált hemoglobin meghatározása bármely felsorolt módszert alkalmazva megfelelően mutatja a cukorbetegség szénhidrát-anyagcsere egyensúlyát, és hasznos információt szolgáltat a terápiás eljárás megállapítása szempontjából.



1. ábra. A manuális eljárás és a Variant I készülék eredményei közötti összefüggés ($n=18$)



2. ábra. A Micromat II és a Variant I készülék eredményeinek összehasonlítása

Irodalom

1. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations, Diabetes Care, 2003, 26 (Suppl. 1), S22.
2. Bry L., Chen P.C., Sacks D.B. - *Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin*, Clin Chem, 2001, 47:153-163.
3. Fonyó A. - *Az orvosi ételtan tankönyve*, Medicina Kiadó, Budapest, 1999, 300-312.
4. Dronca M. - *Glicozilarea neenzimatică a proteinelor (semnificații clinice și funcționale)*, Ed. Casa Cărții de Știință, Cluj-Napoca, 2000.
5. Higgins T., Beutler E., Doumas B.T. - *Hemoglobin, Iron and Bilirubin*, In: Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Brunts (szerk.): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Elsevier Saunders, 2006, 1165-1208.
6. Honda S.A.A., Bhagavan N.V., Sugiyama C.E. et al. - *Hemoglobinopathies detected by CBC analysis and HPLC hemoglobin A1c analysis*, Lab Med, 1994, 25:1976-1981.
7. Nemes-Nagy E., Al-Aissa Z., Jákó Zs. et al. - *Hemoglobinopátiák kórisztézése magas nyomású folyadékkromatográfiás eljárással*, EME Orvostudományi Értesítő, 2008, 81(2), 49-51.
8. Nemes-Nagy E., Fazakas Z., Fodor M.A. et al. - *Klinikai labordi-agnosztika*, Studium Alapítvány Kiadó, Marosvásárhely, 2009.
9. Nemes-Nagy E., Fazakas Z., Mareş-Ferencz G. - *Általános és alkalmazott biokémia – Szülészeti és neonatológiai vonatkozásokkal*, Studium Alapítvány Kiadó, 2008.
10. Nemes-Nagy E., Higgins T., Shank B.L. et al. - *Influența anticoagulantelor, pH-ului și a integrității hematiilor asupra procesului de glicozilare in vitro a hemoglobinei*, Revista Română de Medicină de Laborator, 2005, 1:20-26.