

Ποιοτικός έλεγχος της μεθόδου μετρήσεως της γλυκοζυλιωμένης Hb (HbA1) με ιοντοανταλλακτικές ρητίνες

Περίληψη

Ε. Μακρυγιαννάκη*
Α. Πελετίδου*
Σ. Μπακατσέλος**
Μ. Οικονόμου-Αντωνιάδου*
Δ. Καραμήτσος**

Σκοπός της εργασίας ήταν: 1) Να γίνει ποιοτικός έλεγχος της μεθόδου της μέτρησης της HbA1 με ιοντοανταλλακτικές ρητίνες (kit Boehringer Mannheim) και 2) να εξετασθεί αν η παραμονή του αίματος για 12 μέρες επηρεάζει το αποτέλεσμα. Οι μετρήσεις έγιναν σε σταθερή θερμοκρασία 23° C. Η μέση επί τοις εκατό μεταβλητότητα της μεθόδου βρέθηκε να είναι 3,19%. Σε δείγματα αίματος με χαμηλές τιμές (HbA1 6,5%) η μεταβλητότητα ήταν 2,12%, σε τιμές μέτρια αυξημένες (HbA1 9,5%) ήταν 5,16% και σε υψηλές τιμές (HbA1 12%) ήταν 3,2%. Η παραμονή του αίματος για 12 μέρες σε θερμοκρασία 4° C δεν έδειξε να επηρεάζει το αποτέλεσμα. Συμπεραίνεται ότι η χρησιμοποιηθείσα μέθοδος έχει ικανοποιητική επαναληψιμότητα και τα δείγματα μπορεί να διατηρηθούν μέχρι 12 μέρες. Ωστόσο επειδή το εύρος διασποράς των τιμών στους περισσότερους ασθενείς είναι μικρό, με την εξαίρεση των εντελώς αρρυθμιστων ασθενών, χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια συνεχής αύξηση ενδιαφέροντος για τη μέτρηση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1) στους διαβητικούς ασθενείς. Η HbA1 είναι μια παράμετρος αναδρομικής εκτίμησης της υπεργλυκαιμίας αφού μ' αυτή μπορούν να εκτιμηθούν τα επίπεδα γλυκόζης αίματος κατά τις οκτώ προηγούμενες εβδομάδες περίπου και χαρακτηρίζεται ως «αποθηκευμένη μνήμη» της γλυκόζης του αίματος^{1,2}.

Η HbA1 σχηματίζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια από αντίδραση της γλυκόζης και άλλων σακχάρων με το τελικό αμινοξύ βαλίνη της β-αλυσού της αιμοσφαιρίνης. Η γλυκοζυλίωση της Hb είναι μια μη ενζυματική αντίδραση σχηματισμού HbA1. Αρχικά σχηματίζεται ένα ασταθές ενδιάμεσο προϊόν (αλδιμίνη). Ο σχηματισμός της ασταθούς HbA1 είναι αμφίδρομος αντίδραση έτσι ώστε ένα ποσοστό της μετατρέπεται βραδέως σε σταθερή HbA1 και το υπόλοιπο διασπάται στα αρχικά συστατικά της δηλαδή Hb και γλυκόζη (Εικ. 1). Η σταθερή HbA1 είναι μια κετοαμίνη³.

Η τιμή της HbA1 που προσδιορίζεται στο Εργαστήριο είναι το ποσοστό της σταθερής HbA1.

*Αιματολογικό Εργαστήριο
Γ.Π.Ι.Ν.Θ.

**Διαβητολογικό Κέντρο
Β' Π.Π. Κλινικής ΑΠΘ

ταχέως
γλυκόζη + HbA = ασταθής HbA1 (αλμυδίνη)

βραδέως
σταθερή HbA1 (κετοαμίνη)

Εικ. 1. Σχηματισμός της HbA1

Διακρίνονται τα εξής επί μέρους κλάσματα της HbA1:

HbA1α1, HbA1β, HbA1c. Το κλάσμα HbA1c αποτελεί το 70% της ολικής ποσότητας της σταθερής HbA1. Επειδή οι τιμές HbA1 και HbA1c εμφανίζουν στενή συσχέτιση μεταξύ τους, η διαγνωστική τους σημασία θεωρείται ισόδυναμη⁴.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν: α) Να προσδιοριστούν οι τιμές αναφοράς της HbA1 με ιοντοανταλλακτικές ρητίνες (kit Boehringer Mannheim), β) Να γίνει ποιοτικός έλεγχος της μεθόδου (επαναληψιμότητα στον προσδιορισμό και μεταξύ προσδιορισμών) και επαναληψιμότητα των προτύπων δειγμάτων, γ) Να ελεγχθεί η σταθερότητα των δειγμάτων (παραμονή του αίματος για δώδεκα μέρες σε θερμοκρασία +4° C σύμφωνα με προδιαγραφές συντήρησης του αίματος προτεινόμενες από τη μέθοδο).

Υλικό και μέθοδος

Ως υλικό της μελέτης χρησιμοποιήθηκε:

1) Δείγματα ολικού αίματος από 51 βεβαιωμένα φυσιολογικά άτομα ως προς το μεταβολισμό του σακχάρου για να καθοριστούν οι τιμές αναφοράς της γλυκοζυλιωμένης Hb (HbA1) στο Εργαστήριό μας.

2) Δείγματα ολικού αίματος α) Με φυσιολο-

γική τιμή HbA1, β) με μέτρια αύξηση της HbA1 και γ) με μεγάλη αύξηση της HbA1. Τα δείγματα αυτά μετρήθηκαν την 1η μέρα της λήψης, την 7η μέρα και την 12η μέρα μετά από συντήρησή τους σε θερμοκρασία ψυγείου +4° C επί 10 φορές το καθένα κάθε φορά.

3) Πρότυπα αιμολύματα HbA1 που παρέχει το Kit.

Η αιμοληψία γινόταν με αντιπηκτικό EDTA για τη λήψη ολικού αίματος. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν χρωματογραφία σε μικροστήλες με ιοντοανταλλακτικές ρητίνες (kit Boehringer Mannheim).

Αποτελέσματα

Η μέση τιμή της HbA1 των 51 φυσιολογικών δειγμάτων και το φυσιολογικό εύρος των τιμών της HbA1 ήταν $6,03 \pm 0,595$ και με εύρος που προκύπτει με τρεις σταθερές αποκλίσεις έχουμε τιμές αναφοράς 4,24 - 7,81.

Στον πίνακα 1 φαίνονται οι μέσες τιμές HbA1 με μετρήσεις της 1ης, 7ης 12ης μέρας και ο μέσος συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV%), στον ίδιο προσδιορισμό. Είναι φανερό ότι η διατήρηση του αίματος στο ψυγείο μέχρι την 12η μέρα δεν αλλοιώνει το αποτέλεσμα των μετρήσεων.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου σε διαφορετικές μέρες είχε ένα μέσο συντελεστή μεταβλητότητας 2,63% (Πίν. 2).

Στον πίνακα 3, έχουμε την επαναληψιμότητα των πρότυπων αιμολυμάτων: στη χαμηλή τιμή HbA1 7,21% ο C.V. είναι 0,36% και στην αυξημένη τιμή 15,9% ο C.V. είναι 0,97%.

Πίνακας 1. Επαναληψιμότητα της μεθόδου μετρήσεως της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης όπως προκύπτει από μετρήσεις εις δεκαπλούν του ίδιου δείγματος αίματος και μετά παραμονή των δειγμάτων σε ψυγείο για μια, επτά και δώδεκα μέρες

Δείγματα	Μέσες τιμές δειγμάτων HbA1			Μέση τιμή CV%
	1η μέρα	7η μέρα	12η μέρα	
Φυσιολογικά	6,27 ± 0,13	6,50 ± 0,15	6,48 ± 0,13	2,12
Μέτρια αυξημένα	9,45 ± 0,48	9,78 ± 0,46	9,37 ± 0,47	5,16
Πολύ αυξημένα	11,42 ± 0,36	11,65 ± 0,4	11,74 ± 0,32	3,2

Πίνακας 2. Επανηληψιμότητα της μεθόδου σε διαφορετικές ημέρες (Συντελεστής μεταβλητότητας = σταθερή απόκλιση/μέση τιμή X 100)

	σ
Χαμηλές τιμές	2,63%
Μέτρια αυξημένες τιμές	3,18%
Αυξημένες τιμές	2,08%
Μέσος συντελεστής μεταβλητότητας	2,63%

Πίνακας 3. Επανηληψιμότητα προτύπων διαλυμάτων (n = 5)

Μέση τιμή HbA1c εργαστηρίου	Τιμές του Kit	CV%	
Χαμηλή τιμή	7,21	7,6	0,36
Αυξημένη τιμή	15,9	15,9	0,97

Συζήτηση

Από τις μετρήσεις της HbA1c των δειγμάτων αίματος φυσιολογικών ατόμων καθορίζονται οι τιμές αναφοράς του Εργαστηρίου μας που είναι 4,24%-7,81% (τρεις σταθερές αποκλίσεις από τη μέση τιμή). Η μέθοδος του kit αναφέρει τιμές HbA1c από 5-8% σε άτομα με φυσιολογικό μεταβολισμό σακχάρου και σε άτομα με αρρυθμιστο διαβήτη > 10%.

Η επαναληψιμότητα σε μετρήσεις της ίδιας μέρας, σε μετρήσεις διαφορετικών ημερών και η επαναληψιμότητα των προτύπων διαλυμάτων μας δίνουν ικανοποιητικό αποτέλεσμα για την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Βέβαια η διαφορά μεταξύ του συντελεστή μεταβλητότητας με μέτρια αυξημένη τιμή 5,16% και των προτύπων διαλυμάτων (0,36% για χαμηλές τιμές και 0,97% για υψηλές τιμές HbA1c), αποδεικνύουν ότι η μέθοδος (παρασκευή αιμολύματος, θερμοκρασία πειράματος, ενεργοποίηση ρητίνης κ.λ.π.) είναι επιβεβλημένο να δουλεύεται με ιδιαίτερη σχολαστικότητα και προσοχή.

Η μέθοδος φαίνεται κατάλληλη για τους κλινικούς σκοπούς που χρησιμοποιείται⁵. Βεβαίως ο

κλινικός γιατρός πρέπει να έχει υπόψη του και τους πειράγοντες που είναι δυνατό να επηρεάσουν το αποτέλεσμα⁶ από τους οποίους ο κυριότερος είναι η εκτέλεση της μεθόδου σε σταθερή θερμοκρασία 23°C. Ωστόσο επειδή το εύρος διασποράς των τιμών στους περισσότερους ασθενείς είναι μικρό, με την εξαίρεση των εντελώς αρρυθμιστων ασθενών, χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστήριο

Ευχαριστούμε τον επίκουρο καθηγητή κ. Αθ. Βουζαντάδη για τις κριτικές υποδείξεις του.

Summary

Macriyannaki E, Peletidou S, Bacatselos S, Antoniadou-Economou M, Karamitsos D. Quality control of HbA1c measurement using ion exchange microcolumns. *Hellen Diabetol Chron* 1991; 2: 126-128.

We studied the quality control of HbA1c measurements. The mean coefficient of variation was found to be 3.19%. The between assay variation was 2.63%. The storage of blood in 4°C does not affect the results. The method can be used with some caution in evaluation of diabetes control.

Βιβλιογραφία

1. Dum RA, Cole JS. Temporal relationship of glycosylated hemoglobin concentrations to glucose control in diabetes. *Diabetologia* 1979; 17: 213-220.
2. Gonen B, Rubenstein J. Hemoglobin A1c an indicator of metabolic control of diabetic patients. *Lancet* 1977; 2: 734-737.
3. Bunn HF. Non-enzymatic glycosylation of protein. Relevance to diabetes. *Diabetes* 1981; 70: 325.
4. Peterson OM, Formby B. Glycosylated proteins. In Alberti KGMM and Krall Lp, eds, *The diabetic Annual* 1, Amsterdam-New York-Oxford, Elsevier 1985: 178.
5. Abraham EC, Huff TA, Cope ND, Wilson JB Jr, Bransome ED Jr, Huisman THJ. Determination of the glycosylated hemoglobins (HbA1c) with a new microcolumn procedure. Suitability of the technique for assessing the clinical management of diabetes mellitus. *Diabetes* 1978; 27: 931-937.
6. Κεραμίδα-Καραμήτσου Π. Εργαστηριακή διάγνωση και παρακολούθηση σακχαροδιαβητικού ασθενούς. *Μικροβιολογικά Χρονικά* 1987; 3: 126-36.