

Σύγκριση μεθόδων προσδιορισμού της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA_{1c})

Περίληψη

Ε. Σούλιου
Γ. Συμεωνίδης
Τ. Μουσλέχ
Μ. Αρχανιωτάκη
Ε. Δίζα
Β. Κυριαζοπούλου

Η σπουδαιότητα του προσδιορισμού των επιπέδων της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA_{1c}) για τους διαβητικούς ασθενείς οδήγησε στην ανεύρεση πολλών και ποικίλων εργαστηριακών μεθόδων. Για το λόγο αυτό θεωρήθηκε σκόπιμη η σύγκριση τεσσάρων εξ αυτών. Συγκρίθηκαν οι τιμές 1) της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC). 2) της μεθόδου χημικής συγγένειας με την τεχνολογία δέσμευσης ιόντων (IMx Analyser της Abbott). 3) της ηλεκτροφορήσεως σε πηκτή αгарόζης με αντιδραστήρια της Εταιρείας Beckman και 4) της ηλεκτροφορήσεως σε πηκτή αгарόζης με αντιδραστήρια της Εταιρείας Sebia. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) των μεθόδων βρέθηκε: $r = 0,77$ για τις HPLC/Abbott, $r = 0,86$ για τις HPLC/Beckman, $r = 0,81$ για τις Beckman/Abbott, και $r = 0,81$ για τις HPLC/Sebia. Εξετάσθηκε ακόμη η επαναληψιμότητα των μεθόδων στην ίδια δοκιμασία (intra assay) και σε διαφορετικές δοκιμασίες (inter assay). Ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV) της intra assay κομάνθηκε στην HPLC για μεν την HbA_{1c} από 1,2-3,43% για δε την HbA₁ από 1,19-3,22%, στο IMx της Abbott για την HbA_{1c} από 1,25-4,74%, στην ηλεκτροφόρηση της Beckman για την HbA_{1c} από 5,89-13,6% και στην ηλεκτροφόρηση της Sebia για την HbA₁ από 5,53-8,72%. Ο CV της inter assay κομάνθηκε στην HPLC για μεν την HbA_{1c} από 0,96-1,56% για δε την HbA₁ από 0,69-2,13%, στο IMx για την HbA_{1c} από 3,48-6,23%, στην ηλεκτροφόρηση της Beckman για την HbA_{1c} από 10,94%-20,78% και στην ηλεκτροφόρηση της Sebia για την HbA₁ από 4,21-7,93%. Συμπεραίνεται ότι η συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων μεθόδων είναι ικανοποιητική, η δε επαναληψιμότητα για μεν την HbA_{1c} είναι καλύτερη με την HPLC μέθοδο ακολουθεί η δέσμευση ιόντων της Abbott και η ηλεκτροφόρηση της Beckman, ενώ για την HbA₁ καλύτερη είναι η επαναληψιμότητα με την HPLC και ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση της Sebia.

Η γλυκόζη αντιδρά αυτόματα και μη ενζυμικά με πρωτεΐνες. Κατά την αντίδραση αυτή σχηματίζονται προϊόντα με υψηλό δείκτη αντιδραστικότητας, τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα μίγμα ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων που αποκαλούνται Προχωρημένα Τελικά Προϊόντα Γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycosylation and Products, AGEs) και ίσως ευθύνονται για την

εμφάνιση και εξέλιξη των επιπλοκών του σακχαρώδους διαβήτη¹.

Μεταξύ των πρωτεϊνών που γλυκοζυλιώνονται είναι και η HbA. Η γλυκοζυλίωση της αιμοσφαιρίνης είναι μη ενζυμική αντίδραση και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σταθερής HbA₁ (γλυκοζυλιωμένη Hb) μέσω ενός ασταθούς ενδιάμεσου προϊόντος². Η HbA₁ αποτελείται από τα κλάσματα HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}, HbA_{1c}. Από αυτά το μεγαλύτερο κλάσμα είναι η HbA_{1c}, η οποία αποτελεί το 70% της όλης ποσότητας της HbA₁. Η HbA_{1c} σχηματίζεται από την αντίδραση της αμινοτελικής βαλίνης των β-αλυσίδων της HbA (H₂N-BA) με τη γλυκόζη σχηματίζοντας πρώτα αλδιμίνη (βάση του Schiff) η οποία με ανακατανομή Amadori δίνει κετοαμίνη. Ενώ η AbA_{1a1} προκύπτει από την αντίδραση της ίδιας αμινομάδας της HbA με την 1,6-διφωσφορική φρουκτόζη και η Hba_{1a2} από την αντίδραση με 6-φωσφορική γλυκόζη⁴.

Τα ερυθροκύτταρα του ανθρώπου είναι εύκολα διαπερατά από τη γλυκόζη. Η ταχύτητα της αντίδρασης σχηματισμού της HbA_{1c} εξαρτάται από τη συγκέντρωση της γλυκόζης. Ο σχηματισμός σταθερής HbA_{1c} είναι πρακτικά μη αναστρέψιμος και αυτή παραμένει μέσα στα ερυθροκύτταρα για όλο το διάστημα της ζωής τους (100-120 ημέρες)⁵. Επειδή η HbA_{1c} παράγεται συνεχώς καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής των ερυθροκυττάρων αρχίζοντας από ελάχιστα ποσά τα οποία σταθερά αυξάνουν καθώς τα κύτταρα γερνούν και επιπλέον επειδή σ' ένα δείγμα αίματος υπάρχουν ερυθρά αιμοσφαίρια σε διάφορα στάδια εξέλιξης γι' αυτό σ' ένα δείγμα αίματος ελέγχεται μια χρονική περίοδος 120 ημερών. Έτσι το ποσό της HbA_{1c} που περιέχεται στα κύτταρα αυτά αντικατοπτρίζει τη «μέση τιμή» των επιπέδων της γλυκόζης του αίματος κατά τους προηγούμενους 2-3 μήνες^{6,7}, κατ' άλλους κατά τους προηγούμενους 1-2 μήνες⁸. Για το λόγο αυτό ο προσδιορισμός της HbA_{1c} αποτελεί καλύτερο δείκτη ελέγχου του διαβητικού ασθενούς από ότι ο προσδιορισμός της γλυκόζης του αίματος και των ούρων⁶. Τα επίπεδα όμως της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης μπορεί να επηρεασθούν από την οξεία και χρονία απώλεια αίματος η οποία μειώνει τη διάρκεια ζωής των ερυθροκυττάρων και ως εκ τούτου τη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη που περιέχουν. Γι' αυτό χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων όταν υπάρχει αναιμία από έλλειψη σιδήρου, αιμορραγία του γαστρεντερικού συστήματος, αιμοχρωμάτωση, αιμόλυση κλπ. Ακό-

μη κατά τη χρονία νεφρική ανεπάρκεια η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη μπορεί να έχει υποστεί καρβονυλίωση οπότε οι τιμές της αυξάνουν. Ακόμη μερικές αιμοσφαιρινοπάθειες επηρεάζουν την HbA_{1c}.

Η σπουδαιότητα του προσδιορισμού της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης για τους διαβητικούς ασθενείς οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών και ποικίλων μεθόδων προσδιορισμού αυτής. Η επιλογή της πιο κατάλληλης μεθόδου, ανάλογα φυσικά και με τις δυνατότητες του Εργαστηρίου, αποτελεί πολλές φορές αντικείμενο προβληματισμού. Για το λόγο αυτό, σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να συγκριθούν ανά δύο η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC), η μέθοδος της χημικής συγγένειας με τη τεχνολογία δέσμευσης ιόντων, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης με αντιδραστήρια της Εταιρείας Beckman και επίσης η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης με αντιδραστήρια της Εταιρείας Sebia. Ακόμη, σκοπός της εργασίας ήταν να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα όλων των μεθόδων την ίδια ημέρα στην ίδια δοκιμασία (intra assay) και σε διαφορετικές δοκιμασίες σε διαφορετικές ημέρες (inter assay) και κατ' αυτόν τον τρόπο να βρεθεί η μέθοδος η οποία κατά προτίμηση θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί.

Υλικό και μέθοδοι

Το υλικό της μελέτης αυτής αποτέλεσαν 175 ενήλικες διαβητικοί ασθενείς (73 άρρενες και 102 θήλειες) με τιμές σακχάρου αίματος που κυμάνθηκαν από 41-376 mg% (μέση τιμή 185 ± 72,2). Από κάθε ασθενή λήφθηκε ένα δείγμα αίματος. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν την ημέρα της λήψής τους ή σε διάστημα έως και πέντε ημερών από αυτήν. Εξετάστηκαν επίσης για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των μεθόδων, τέσσερα δείγματα αίματος με διάφορες τιμές HbA_{1c} [3,7%, 6,6%, 7%, 7,9% όταν αυτά εξετάστηκαν με την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)] και HbA₁ [5,1%, 9%, 9,7%, 11% όταν αυτά εξετάστηκαν επίσης με την HPLC]. Το κάθε ένα από αυτά εξετάστηκε για κάθε μια μέθοδο πέντε φορές στην ίδια δοκιμασία (intra assay) και επί πέντε συνεχείς ημέρες (inter assay).

Για τον προσδιορισμό της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι:

1) Η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Κατ' αυτήν προσδιορίστηκαν η HbA_{1c}

και HbA_{1c} σε τελείως αυτοματοποιημένο μηχάνημα (Hi Auto A_{1c} Analyser Model HA-8121, Kyoto Daiichi Kagakin Japan) όπου προσδιορίζεται η HbA₀, HbA₁, HbA_{1c} και η HbF με την τεχνολογία υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης η οποία έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα. Τα αποτελέσματα αυτής δεν επηρεάζονται από τις αιμοσφαιρινοπάθειες.

2) Η μέθοδος της χημικής συγγένειας με την τεχνολογία δέσμευσης ιόντων (Ion Capture) στον αυτόματο ανοσοενζυμικό αναλυτή IMx της Abbott. Η μέθοδος βασίζεται στο σχηματισμό συμπλεγμάτων μεταξύ της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης και ενός πολυανιόντος (3-aminophenylboronic acid). Σύμφωνα με την τεχνολογία αυτή οι γυάλινες ίνες της μήτρας του υποδοχέα αντίδρασης επικαλύπτονται με υψηλού μοριακού βάρους τετρασθενείς ενώσεις αμμωνίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη θετική φόρτιση της μήτρας ώστε να αιχμαλωτίζει σύμπλοκα με αρνητικά φορτία. Στον αυτόματο αναλυτή IMx τοποθετείται το δείγμα του ολικού αίματος, το αντιδραστήριο λύσης και το πολυανιόν. Με το αντιδραστήριο λύσης προκαλείται λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων και στη συνέχεια το πολυανιόν ενώνεται με τη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη δημιουργώντας το σύμπλοκο πολυανιόν+γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη. Το πολυανιόν συνδέεται ειδικά με την γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη λόγω συγγενικής έλξης του βορονικού οξέος με το σάκχαρο αυτής. Το σύμπλοκο πολυανιόν + γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη αιχμαλωτίζεται από την κατιοντική μήτρα. Στη συνέχεια η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη διαχωρίζεται από τη μη γλυκοζυλιωμένη δια μέσου της ηλεκτροστατικής επίδρασης μεταξύ του ανωτέρω συμπλόκου και της κατιοντικής επιφάνειας της μήτρας. Για να γίνει αυτό πλένεται η μήτρα με ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης, που περιέχει τη φθορίζουσα ουσία 4-methylumbelliferone για να απομακρυνθεί η μη γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη και να μετρηθεί η γλυκοζυλιωμένη με το MEIA οπτικό σύστημα. Επίσης γίνεται μέτρηση της ολικής αιμοσφαιρίνης (γλυκοζυλιωμένης και μη) από το MEIA οπτικό σύστημα. Οι μετρήσεις φθορισμού μετατρέπονται σε συγκεντρώσεις γλυκοζυλιωμένης και ολικής αιμοσφαιρίνης, όπως αυτές καθορίζονται από τις αντίστοιχες καμπύλες που είναι αποθηκευμένες στο μηχάνημα. Η συγκέντρωση της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης διαιρείται με τη συγκέντρωση της ολικής αιμοσφαιρίνης και πολλαπλασιάζεται επί 100 για να δώσει το τε-

λικό αποτέλεσμα της εκατοστιαίας αναλογίας της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης. Η εξέταση δεν επηρεάζεται από τις αιμοσφαιρίνες F,S,C⁹.

3) Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης: α) με τα αντιδραστήρια Diatrac της Εταιρείας Beckman με τα οποία προσδιορίζεται η HbA_{1c}, και β) με τα αντιδραστήρια Hydragel της Εταιρείας Sebia με τα οποία προσδιορίζεται η HbA₁. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός αυτών γίνεται σε λεπτό στρώμα 1% αгарόζης και σε ρυθμιστικό διάλυμα με όξινο pH. Τοποθετείται στην αгарόζη μικρή ποσότητα αιμολυμένων ερυθρών αιμοσφαιρίων, τοποθετείται η αгарόζη σε συσκευή ηλεκτροφόρησης και ο διαχωρισμός γίνεται ανάλογα με το ηλεκτρικό φορτίο του μορίου και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Με την ηλεκτροφόρηση της Εταιρείας Beckman επιτυγχάνεται διαχωρισμός των αιμοσφαιρίων με την ακόλουθη σειρά από το θετικό προς τον αρνητικό πόλο C-S-A₀-A_{1c}-F-A_{1b}-A_{1a}. Στην ηλεκτροφόρηση της Εταιρείας Sebia το προς την κάθοδο ευρισκόμενο κλάσμα ανταποκρίνεται στην ολική A₁ γλυκοζυλιωμένη Hb (A_{1a}, A_{1b}, A_{1c}), ενώ το προς την άνοδο ευρισκόμενο στην HbA₀ και HbA₂. Και στις δύο περιπτώσεις ο ποσοτικός προσδιορισμός της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης γίνεται με ειδικό φωτόμετρο (πυκνόμετρο) όπου υπολογίζεται η εκατοστιαία αναλογία της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (A₁ ή A_{1c}) επί του συνόλου της αιμοσφαιρίνης.

Στατιστική ανάλυση. Για τη συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων, επειδή η κατανομή των τιμών που χρησιμοποιήθηκαν στις περισσότερες περιπτώσεις δεν ήταν κανονική, υπολογίσθηκε ο μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson (r). Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των μεθόδων υπολογίσθηκε η μέση τιμή των δειγμάτων (x), η σταθερή απόκλιση μεταξύ των λαμβανομένων τιμών (SD) καθώς και ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV%).

Αποτελέσματα

Κατά τη συσχέτιση των μεθόδων μεταξύ τους ο συντελεστής συσχέτισης κατά Pearson (r) βρέθηκε 0,77 (r = 0,77) όταν συγκρίθηκε η HPLC με την τεχνολογία δέσμευσης ιόντων της Abbott για την HbA_{1c} σε 149 δείγματα αίματος διαβητικών ασθενών. Ο ίδιος συντελεστής βρέθηκε r = 0,86 όταν συγκρίθηκε η HPLC με την ηλεκτροφόρηση της Εταιρείας Beckman για την HbA_{1c} σε 154 δείγματα αίματος διαβητικών

ασθενών και $r = 0,81$ όταν συγκρίθηκε η τεχνολογία δέσμευσης ιόντων της Abbott με την ηλεκτροφόρηση της Beckman για την HbA_{1c} σε 154 δείγματα αίματος διαβητικών ασθενών. Ενώ κατά τη σύγκριση της HPLC με την ηλεκτροφόρηση της Εταιρείας Sebia ο μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισεως βρέθηκε $r = 0,81$ για την HbA_1 σε 175 δείγματα αίματος διαβητικών ασθενών (Πίν. 1). Η συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων κρίνεται ικανοποιητική.

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας όλων

των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα δείγματα αίματος τα ίδια για όλες τις μεθόδους και όλους τους προσδιορισμούς. Καθ' ένα από τα τέσσερα δείγματα, εξετάστηκε πέντε φορές την ίδια ημέρα στην ίδια δοκιμασία (intra assay) και από μια φορά επί πέντε συνεχείς ημέρες (inter assay). Αυτό επαναλήφθηκε χωριστά για κάθε μέθοδο. Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας φαίνονται στους πίνακες 2,3,4,5. Από τους πίνακες αυτούς γίνεται αντιληπτό ότι με τη μέθοδο HPLC (HbA_{1c}) ο συντελεστής μεταβλητότητας (CV%) για την intra assay κυμάνθηκε από 1,2-3,43% (Πίν. 2), ενώ για την inter assay από 0,96-1,56% (Πίν. 4). Με τη μέθοδο της χημικής συγγένειας της Abbott (HbA_{1c}) ο συντελεστής μεταβλητότητας κυμάνθηκε από 1,25-4,74% για την intra assay (Πίν. 2) και από 3,48-6,23% για την inter assay (Πίν. 4). Με την ηλεκτροφόρηση της Εταιρείας Beckman (HbA_{1c}) ο CV% κυμάνθηκε από 5,89-13,6% για την intra assay (Πίν. 2) και από 10,94-20,78% για την inter assay (Πίν. 4). Ακόμη για την HbA_1 ο συντελεστής μεταβλητότητας αφ' ενός μεν με την HPLC κυμάνθηκε για την intra assay από 1,19-3,22% (Πίν. 3) και για την inter assay από 0,69-2,13% (Πίν. 5) αφ' ετέ-

Πίνακας 1. Μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισεως κατά Pearson (r) για τον προσδιορισμό της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης

Μέθοδοι	Γλυκολύζ. Hb	n	r
HPLC/Abbott	HbA_{1c}	149	0,77
HPLC/Beckman	HbA_{1c}	154	0,86
Abbott/Beckman	HbA_{1c}	154	0,81
HPLC/Sebia	HbA_1	175	0,81

Πίνακας 2. Επαναληψιμότητα της HbA_{1c} σε 4 δείγματα αίματος εξετασθέντα πέντε φορές στην ίδια δοκιμασία (intra assay)

Δείγματα αίματος	HPLC			Abbott			Beckman		
	x	SD	CV%	x	SD	CV%	x	SD	CV%
1	3,76	0,05	1,43	4,44	0,13	3	4,84	0,65	13,6
2	6,54	0,16	2,5	6,12	0,07	1,25	7,36	0,43	5,89
3	6,92	0,08	1,2	6,81	0,32	4,74	8,02	0,6	7,55
4	7,82	0,26	3,43	7,46	0,23	3	9,36	1,13	12,1

Πίνακας 3. Επαναληψιμότητα της HbA_1 σε 4 δείγματα αίματος εξετασθέντα πέντε φορές στην ίδια δοκιμασία (intra assay)

Δείγματα αίματος	HPLC			Sebia		
	x	SD	CV%	x	SD	CV%
1	5,12	0,08	1,63	6,34	0,35	5,53
2	8,78	0,17	2,03	10,64	0,75	7,05
3	9,56	0,11	1,19	9,52	0,84	8,72
4	10,64	0,34	3,22	10,56	0,71	6,74

Πίνακας 4. Επαναληψιμότητα της HbA_{1c} σε 4 δείγματα αίματος εξετασθέντα επί πέντε συνεχείς ημέρες (inter assay)

Δείγματα αίματος	HPLC			Abbott			Beckman		
	x	SD	CV%	x	SD	CV%	x	SD	CV%
1	3,75	0,05	1,33	4,55	0,21	4,75	3,65	0,76	20,78
2	6,51	0,1	1,56	6,30	0,22	3,56	6,26	0,68	10,94
3	6,94	0,08	1,26	6,76	0,42	6,23	6,99	0,76	10,94
4	7,92	0,07	0,96	7,83	0,27	3,48	8,06	0,98	12,18

Πίνακας 5. Επαναληψιμότητα της HbA_1 σε 4 δείγματα αίματος εξετασθέντα επί πέντε συνεχείς ημέρες (inter assay)

Δείγματα αίματος	HPLC			Sebia		
	x	SD	CV%	x	SD	CV%
1	5,18	0,10	2,04	6,37	0,26	4,21
2	8,79	0,18	2,13	10,15	0,80	7,93
3	9,65	0,06	0,69	10,75	0,82	7,68
4	10,88	0,14	1,35	11,61	0,89	7,73

ρου δε με την ηλεκτροφόρηση της Εταιρείας Sebia από 5,53-8,72% για την intra assay (Πίν. 3) και από 4,21-7,93% για την inter assay (Πίν. 5).

Επομένως η επαναληψιμότητα για την HbA_{1c} είναι καλύτερη με τη μέθοδο HPLC, ακολουθεί η μέθοδος της χημικής συγγένειας της Abbott και τέλος η μέθοδος της ηλεκτροφορήσεως της Εταιρείας Beckman. Για δε την HbA_1 η επαναληψιμότητα της μεθόδου HPLC είναι καλύτερη από αυτήν της ηλεκτροφορήσεως της Sebia.

Συζήτηση

Προκειμένου ένα Εργαστήριο να επιλέξει τη μέθοδο που θα χρησιμοποιήσει για να προσδιορίσει την AbA_{1c} θα πρέπει να εξετάσει το συντελεστή συσχέτισεως, την επαναληψιμότητα της μεθόδου στην ίδια δοκιμασία και σε διαφορετικές ημέρες (συντελεστής μεταβλητότητας) αλλά ακόμη θα πρέπει να υπολογίσει το κόστος και την ταχύτητα της μεθόδου, τη δαπάνη που απαιτείται για τον εξοπλισμό του Εργαστηρίου σε σχέση με τον αριθμό των δειγμάτων που εξετάζονται και το χρόνο απασχολήσεως του προσωπικού.

Για τις δύο από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, την HPLC και την τεχνολογία δέσμευσης ιόντων της Abbott, χρησιμοποιούνται

αυτοματοποιημένα μηχανήματα, δε χρειάζονται σημαντικές τεχνικές γνώσεις, χρησιμοποιείται ολικό αίμα χωρίς καμία προεργασία, ο απαιτούμενος χρόνος για τη δοκιμασία είναι μικρός και δε χρειάζεται περαιτέρω απασχόληση του προσωπικού. Η δαπάνη όμως για την αγορά των μηχανημάτων είναι σημαντική.

Για τις ηλεκτροφορητικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης της Εταιρείας Beckman και της Εταιρείας Sebia, χρησιμοποιούνται δύο μηχανήματα για κάθε μία, η συσκευή ηλεκτροφορήσεως και το ειδικό φωτόμετρο (πυκνόμετρο). Οι μέθοδοι δεν είναι αυτοματοποιημένες, χρειάζονται περισσότερες τεχνικές γνώσεις από ότι στις προηγούμενες, το αίμα πριν εξετασθεί θα πρέπει να αιμολυθεί, ο απαιτούμενος χρόνος για τη δοκιμασία είναι μεγαλύτερος και χρειάζεται και περαιτέρω απασχόληση του προσωπικού. Ο δε καθορισμός των τελικών αποτελεσμάτων εξαρτάται από την εμπειρία και τις γνώσεις του εργαστηριακού. Ο εξοπλισμός όμως είναι λιγότερο ακριβός από τον εξοπλισμό των προηγούμενων μεθόδων. Ακόμη ειδικά η ηλεκτροφόρηση της Εταιρείας Sebia προσδιορίζει την AbA_1 η οποία προέρχεται από τη μη ενζυμική σύνδεση της αιμοσφαιρίνης με διάφορα σάκχαρα ενώ η HbA_{1c} συνδέεται ειδικά

με τη γλυκόζη¹⁰.

Συσχετίζοντας τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν μεταξύ τους βρέθηκε ότι η συσχέτιση μεταξύ αυτών ήταν αρκετά ικανοποιητική ($r = 0,77$, $r = 0,86$, $r = 0,81$, $r = 0,81$) (Πίν. 1). Από τους Tigan και συν.¹¹ βρέθηκε πολύ καλύτερη συσχέτιση ($r = 0,96$) μεταξύ της τεχνολογίας δέσμευσης ιόντων της Abbott και της Diamat HPLC, ενώ όταν η πρώτη συγκρίθηκε με τη Poly LC Inc HPLC συντελεστής συσχέτισεως βρέθηκε $r = 0,857$ ¹², κατά δε την σύγκριση της ίδιας μεθόδου με τη DCA 2000 της Bayer ο συντελεστής συσχέτισεως βρέθηκε $r = 0,873$ ¹³. Ακόμη όταν συγκρίθηκε η ηλεκτροφόρηση με την HPLC για την HbA_{1c} βρέθηκε συντελεστής συσχέτισεως $r = 0,888$ ¹⁴ ενώ ο αντίστοιχος της παρούσας μελέτης βρέθηκε $r = 0,81$.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα (Πίν. 2,3,4,5) κατά τον προσδιορισμό της HbA_{1c} η επαναληψιμότητα (συντελεστής μεταβλητότητας CV%) της HPLC είναι καλύτερη ακολουθεί η επαναληψιμότητα της χημικής συγγένειας της Abbott και τέλος της ηλεκτροφορήσεως της Beckman. Ακόμη για τον προσδιορισμό της HbA_{1c} η επαναληψιμότητα της HPLC είναι καλύτερη από την επαναληψιμότητα της ηλεκτροφορήσεως της Sebia, η οποία κρίνεται μάλλον μέτρια. Τα αποτελέσματα αυτά (Πίν. 2,4) δεν διαφέρουν σημαντικά από αυτά των Tigan και συν.¹¹, οι οποίοι αναφέρουν intra assay CV = 4,2-5,7% και inter assay CV = 3,9-4,3% για την HbA_{1c} με τη δοκιμασία της Abbott. Ακόμη η επαναληψιμότητα της HbA_{1c} με δύο HPLC μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, τη Bio-Rad Diamat¹¹ (intra assay CV = 0,4-0,7% και inter assay CV = 0,3-1,6%) και τη Merck Hitachi L-9100¹¹ (intra assay CV = 0,7-1,3% και inter assay CV = 1,0-3,4%) δεν είχε σημαντικές διαφορές από την επαναληψιμότητα της HPLC της Hi Auto A_{1c} Analyser Japan που χρησιμοποιήθηκε από το Εργαστήριο μας (Πίν. 2,4). Όταν δε χρησιμοποιήθηκε από άλλους ερευνητές¹⁵ ο Shimadzu HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) αναλυτής ο συντελεστής μεταβλητότητας ήταν για την HbA_{1c} CV = 2,6% στην intra assay και CV = 1,2% στην inter assay.

Summary

Souliou E, Symeonidis G, Mouselch Z, Archaniotaki M, Diza E, Kyriazopoulou V. Determination of glyated hemoglobin: comparison of four assays. Hellen Diabetol Chron 1998; 1: 67-73.

The determination of hemoglobin A_{1c} is one of the most important monitoring procedures for long-term control diabetes mellitus. Several methods have been developed for the HbA_{1c} measurement. This study compares the results of the four following assays 1) high performance liquid chromatography (HPLC) 2) boronate affinity binding by IMx Abbott analyser 3) agarose gel Beckman's electrophoresis 4) agarose gel Sebia's electrophoresis. Our results are as follows: The Pearson's correlation coefficients (r) was 0,77 between HPLC and Abbott analyser, 0,86 between HPLC and Beckman's electrophoresis, 0,81 between Abbott and Beckman's electrophoresis and 0,81 between HPLC and Sebia's electrophoresis. The intra assay coefficients of variation (CV%) in HPLC method ranged from 1,2-3,43% for HbA_{1c} and from 1,19-3,22% for HbA₁. In ion capture assay it ranged from 1,25-4,74% and with Beckman's electrophoresis from 5,89-13,6% for HbA_{1c} and with Sebia's electrophoresis from 5,53-8,72% for HbA₁. The inter assay CV% with HPLC method ranged from 0,96-1,56% for HbA_{1c} and from 0,69-2,13% for HbA₁. With ion capture assay it ranged from 3,48-6,23% and with Beckman's electrophoresis from 10,94-20,78% for HbA_{1c} and with Sebia's electrophoresis from 4,21-7,93% for HbA₁. In conclusion the r values between these methods were satisfactory and the reproducibility checked by CV% showed HPLC, ion capture assay and Sebia's electrophoresis followed by Beckman's electrophoresis in decreasing order.

Βιβλιογραφία

1. Vlasara H, Bucala R, Striker L. Γλυκοζυλίωση. Βιολογία της νόσου. Βιοχημικές και κλινικές επιπτώσεις στο Σακχαρώδη Διαβήτη και το Γήρας. Στο: Τούντας Χ. Υπεύθυνος Έκδοσης. Σακχαρώδης Διαβήτης Θεωρία, Πράξη. Εκδόσεις Επτάλοφος Αθήνα 1995: 483-503.
2. Roth M. "Glycated Hemaglobin". Not "Glycosylated" or "Glucosylated". Clin Chem 1983; 29: 1991.
3. Henrichs HR, et al. HbA_{1c}-Bestimmung verbessert Diagnostik und Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus. Med Klinik 1981; 76: 471.
4. Τρακατέλλης Α. Γλυκοαιμοσφαιρίνες και Διαβήτη. Βιοχημεία. Τόμος Β Μέρος Ια, Κεφ. 5, Θεσσαλονίκη 1992: 69-70.
5. Bunn HF. Nonenzymatic Glycosylation of Protein: Relevance to Diabetes. Amer J Med 1981; 70: 325.
6. Παυλάτος Φ. Σακχαρώδης διαβήτης. Στο: Τούντας Χ. Υπεύθυνος Έκδοσης. Σακχαρώδης Διαβήτης Θεωρία, Πράξη. Εκδόσεις Επτάλοφος Αθήνα 1995: 133-57.

7. Goldstein DE, Parker KM, England JD, et al. Clinical application of glycosylated hemoglobin measurements. *Diabetes* 1982; 31 (Suppl 3): 70-8.
8. Weck M. Laboratory diagnostics and self-monitoring. In: M. Hanefeld. A practical guide to the therapy for type II diabetes. Pathophysiology, Metabolic Syndrome, Differential Therapy, Late Complications. Walter de Gruyter 1995: 74-88.
9. Wilson DH, et al. Fully automated assay for glycosylated hemoglobin on the Abbott IMx analyser utilizing novel approaches for separation and detection. *Clin Chem* 1993: Sept.
10. John WG, Bullock DG, MacKenzie F. Methods for the analysis of glycosylated haemoglobins: what is being measured? *Diabet Med* 1992; 9: 15.
11. Tiran A, Pieber T, Tiran B, Halwachs-Baumann G, Dobnig H, Grubelnig H, Wilders-Truschnig MM. Automated determination of glycosylated hemoglobin: comparative evaluation of five assay systems. *J Clin Lab Anal* 1994; 8(3): 128-34.
12. Turpeinen U, Karjalainen U, Stenman UH. Three assays for glycohemoglobin compared. *Clin Chem* 1995; 41(2): 191-5.
13. Κλέτα-Παναγιωτίδου Δ, Πελετίδου-Αραμπατζοπούλου Α, Νταγκούμα-Κωσταντίνου Ε, Οικονόμου-Αντωνιάδου Μ, Χατζηπέτρον Α. Προσδιορισμός της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA_{1c}). Συγκριτική μελέτη των τιμών της με τρεις μεθόδους. *Ελληνικά Διαβητολογικά Χρονικά* 1995; 8, 1: 73-7.
14. Kilpatrick E, Rumley AG, Dominiczak MH, Small M. Glycosylated haemoglobin values: problems in assessing blood glucose control in diabetes mellitus. *BMJ* 1994; 309: 983-6.
15. Hamvi H, Schweiger CR, Veitl M, Schmid R. Quantitative measurement of HbA_{1c} by an immunoturbidimetric assay compared to a standard HPLC method. *Am J Clin Pathol* 1995; 104(1): 89-95.