

Jugoslav Med Biohem 2003; 22 (Suppl 1): 51–54

GLIKOHEMOGLOBIN: KONTROLA KVALITETA

Svetlana Ignjatović

Institut za medicinsku biohemiju, Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija i Crna Gora

Kratak sadržaj: Određivanje glikohemoglobina (GHb) koristi se za rutinsko praćenje dugoročnog statusa glukoze kod pacijenata sa *diabetes mellitus*-om. GHb se istovremeno koristi kao indeks prosečne koncentracije glukoze u krvi i za procenu rizika od nastanka komplikacija dijabetesa. Ovaj parametar se od strane davalaca zdravstvenih usluga koristi za procenu brige o dijabetičarima u mnogim programima obezbeđenja kvaliteta pri čemu se zahteva na dokumentaciji vezanoj za frekvenciju određivanja GHb, kao i na broju pacijenata kod kojih je ovaj parametar ispod specifikovane vrednosti. S obzirom da se različitim metodama dobijaju različite vrednosti GHb, Američko udruženje za dijabetes (*American Diabetes Association*, ADA) preporučuje da laboratorije koriste samo one metode koje su sertifikovane prema GHb iz »trajala« kontrola dijabetesa i komplikacija (*Diabetes Control and Complications Trial*, DCCT). DCCT vrednosti se odnose na hemoglobin (Hb) A_{1c}. Preporučuju se metode određivanja GHb čiji je KV između laboratorija <5% (idealno <3%). Takođe, pri određivanju GHb treba voditi računa o mogućim interferencijama, uključujući i hemoglobinopatije. Laboratorije koje određuju GHb u USA treba da učestvuju u programu spoljašnje kontrole kvaliteta koji koristi svežu krv kao uzorke, a »target vrednosti« su određene u laboratorijama uključenim u Nacionalni program standardizacije glikohemoglobina (*National Glycohemoglobin Standardization Program*, NGSP).

Cljučne reči: glikohemoglobin, kontrola kvaliteta.

Uvod

Određivanje glikohemoglobina (GHb) koristi se za rutinsko praćenje dugoročnog statusa glukoze kod pacijenata sa *diabetes mellitus*-om. GHb se istovremeno koristi kao indeks prosečne koncentracije glukoze u krvi i za procenu rizika od nastanka komplikacija dijabetesa (1–3). GHb se ne koristi za postavljanje dijagnoze *diabetes mellitus*-a. Ovo proističe zbog teškoća u standardizaciji određivanja, a što utiče na određivanje odgovarajuće *cut-off* vrednosti, mada i metodološke poteškoće doprinose niskom nivou dijagnostičke osetljivosti GHb (4). Ovaj parametar se od strane davalaca zdravstvenih usluga koristi za procenu brige o dijabetičarima u mnogim programima obezbeđenja kvaliteta pri čemu se zahteva na dokumentaciji vezanoj za frekvenciju određivanja GHb, kao i na broju pacijenata kod kojih je ovaj parametar ispod specifikovane vrednosti (5, 6). S obzirom da se razli-

čitim metodama dobijaju različite vrednosti GHb, Američko udruženje za dijabetes (*American Diabetes Association*, ADA) preporučuje da laboratorije koriste samo one metode koje su sertifikovane prema GHb iz »trajala« kontrola dijabetesa i komplikacija (*Diabetes Control and Complications Trial*, DCCT) (5, 6). DCCT vrednosti se odnose na hemoglobin (Hb)A_{1c}. Takođe, pri određivanju GHb treba voditi računa o mogućim interferencijama, uključujući i hemoglobinopatije. Laboratorije koje određuju GHb u USA treba da učestvuju u programu spoljašnje kontrole kvaliteta koji koristi svežu krv kao uzorke, a »target vrednosti« su određene u laboratorijama uključenim u Nacionalni program standardizacije glikohemoglobina (*National Glycohemoglobin Standardization Program*, NGSP).

Analitička razmatranja

Danas se koristi više od 30 različitih metoda za određivanje GHb, od onih koje se primenjuju u istraživačkim laboratorijama, preko manuelnih metoda koje koriste minikolone, do visoko automatizovanih. Uopšteno rečeno, postoji odlična korelacija rezultata metoda koje koriste različite principe određivanja i ne pos-

Adresa autora

Svetlana Ignjatović
Institut za medicinsku biohemiju
Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu
Višegradska 26, 11129 Beograd, Srbija i Crna Gora
e-mail: tana@eunet.yu

toji nijedan uverljiv podatak kojim bi se pokazala klinička superiornost bilo koje metode u odnosu na ostale. Međutim, rezultati određivanja GHb različitim metodama u uzorku iste krvi mogu značajno da se razlikuju ukoliko nisu standardizovani prema istom referentnom standardu, tj, rezultat za isti uzorak krvi može u jednoj laboratoriji da bude 7%, a u drugoj 9% (1, 7-11). Iz ovih razloga NGSP je 1996. godine započeo process standardizacije testova za određivanje GHb između laboratorija prema DCCT vrednostima (10-12). HPLC katjon-izmenjivačka metoda kojom se određuje HbA_{1c} predstavlja DCCT referentnu metodu (13). Metoda se koristi od 1978. godine i KV između laboratorija iznosi <3% (14).

Preanalitička razmatranja

Varijacije vezane za pacijenta

Rezultati određivanja GHb klinički ne zavise od godina, pola, rase, doba godine ili od prisustva akutnog oboljenja. Međutim, bilo koje stanje koje dovodi do skraćanja života eritrocita (oporavak posle gubitka krvi, hemolitička anemija) daje lažno niže vrednosti GHb (1). Vitamini C i E inhibiraju glikozilaciju hemoglobina i mogu da budu razlog nižih vrednosti, a anemija izazvana nedostatkom gvožđa uzrok viših vrednosti. Unos hrane suštinski ne utiče na rezultate određivanja. Hipertrigliceridemija, hiperbilirubinemija, uremija, hronični alkoholizam, hronično uzimanje salicilata ili opijata interferiraju u nekim metodama određivanja GHb. U nekim metodama interferenciju uzrokuju hemoglobinopatije (Hb S, Hb C) i hemijski derivati hemoglobina (15, 16).

Uzimanje, rukovanje i čuvanje uzoraka

Krv se dobija venepunkcijom ili punkcijom kože. Kao antikoagulans se koristi EDTA. Stabilnost uzoraka zavisi od primenjene metode. Uopšteno, puna krv je stabilna za određivanje GHb nedelju dana ako se čuva na 4 °C. Čuvanje uzoraka na visokoj temperaturi može da izazove neželjeno stvaranje artefakata koje može da utiče na određivanje nekim metodama.

Analitički ciljevi

Preporučuju se metode određivanja GHb čiji je KV između laboratorija <5% (idealno <3%). Pri proveri karakteristika metode treba koristiti bar dva različita kontrolna materijala. Rezultate određivanja koji su ispod donje granice referentnog materijala, kao i one koji su >15% treba proveriti ponovnim određivanjem. Ukoliko postoji interferencija labilne frakcije (pre HbA_{1c}) treba je ukloniti pre određivanja.

Zahtevi pri određivanju i kontrola kvaliteta

Više ekspertskih grupa preporučuje primenu metoda određivanja GHb u zdravoj i populaciji dijabetičara čiji je KV između laboratorija <5%, odnosno između laboratorija <3% (17). Ove preporuke su razumljive s obzirom da je intraindividualni KV za GHb veoma mali i iznosi <2%. Preporučuje se korišćenje dva kontrolna materijala različitih srednjih vrednosti (visoka i niska vrednost) na početku i na kraju serije određivanja. Idealno je da se uzorci pune krvi koji se koriste kao kontrole čuvaju na -70 °C podeljeni u alikvote. Pri ovim uslovima mogu se koristiti više meseci ili godina, a što zavisi od metode koja se koristi za određivanje. Komercijalno dostupni liofilizovani uzorci mogu zbog interferencija koje potiču od matriksa da utiču na određivanje. Preporučuje se istovremeno korišćenje komercijalnih uzoraka i kontrola koje su pripremljene u laboratoriji kako bi se najoptimalnije pratile karakteristike određivanja.

Referentni interval

Preporučuje se da laboratorija odredi sopstveni referentni interval kod osoba koje nisu gojazne i čija je koncentracija glukoze na tašte <6,1 mmol/L. Metode koje imaju NGSP sertifikat, pri određivanju referentnog intervala bi trebalo da imaju Sd čija vrednost ne prelazi 0,5% GHb, a što za interval pouzdanosti od 95% iznosi 2% GHb (tj. za srednju vrednost HbA_{1c} ± 2 Sd = 5,0% ± 1,0%). Referentni interval NGSP-sertifikovanih metoda ne bi trebalo da odstupa više od 0,5% za opseg od 4% do 6%.

Uzorci čije su vrednosti izvan granica referentnog intervala

Preporučuje se ponovno određivanje u svim uzorcima čije su vrednosti ispod donje granice referentnog intervala. U slučaju potvrde ovakvih rezultata treba razmotriti da li su vrednosti koncentracije hemoglobina kod ovih pacijenata patološke ili postoji destrukcija eritrocita. Takođe, u slučaju da je rezultat GHb >15%, i ako se ponovljenim određivanjem rezultat potvrdi treba imati u vidu mogućnost prisustva varijanti hemoglobina (18).

Uklanjanje labilne frakcije GHb

U slučaju hiperglikemije dolazi do brzog stvaranja intermedijera Šifove baze označenog kao »pre-HbA_{1c}« ili labilni HbA_{1c} koji interferira u nekim metodama za određivanje GHb, i to posebno onim koje za razdvajanje frakcija GHb koriste naelektrisanje. Preporuka je da se ovaj intermedijer ukloni pre određivanja.

Interpretacija rezultata

Neophodno je da između laboratorije i lekara koji je zahtevao određivanje GHb postoji tesna saradnja kako bi se postigla odgovarajuća interpretacija rezultata vezana za metode određivanja, a što uključuje i prisutne interferencije. Rezultati određivanja GHb NGSP sertifikovanim metodama istovremeno pružaju informacije o srednjoj vrednosti glikemije i mogućim rizicima, a kako su to definisali DCCT i Prospektivna studija o dijabetesu Velike Britanije (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*, UKPDS) (1, 2, 19). Na primer: promena vrednosti GHb za 1% ukazuje na promenu u koncentraciji glukoze od 2 mmol/L. Treba takođe naglasiti da male promene u vrednosti GHb u toku određenog vremenskog intervala (tj. za 0,5%) pre mogu da reflektuju varijacije koje potiču od određivanja nego stvarni status glikemije.

Programi spoljašnje kontrole kvaliteta GHb

Mreža NGSP laboratorija u USA ima saradnju sa proizvođačima testova za određivanje GHb-a kako bi im pomogla u kalibraciji metoda, odnosno sertifikaciji prema DCCT-u. Važna dopuna ovom programu je i stalni profesionalni nadzor koji sprovodi Kolegijum američkih patologa (*College of American Pathologists*, CAP). Nadzor počinje 1996. godine i uključuje 500 laboratorija, da bi 1998. godine bile uključene sve laboratorije. U programu se koristi sveža puna krv, sa NGSP označenim »target« vrednostima. Od početka programa postoji dokumentovano neprekidno poboljšanje komparabilnosti vrednosti GHb-a između laboratorija (14).

U Velikoj Britaniji postoje dva programa spoljašnje kontrole: *UK National EQA Scheme* (UK NE-QAS) i *Wales EQA Scheme* (WEQAS). U UK NEQAS programu svakog meseca se distribuira EDTA puna krv koja je dobijena od dobrovoljnih davalaca (dijabetičari) u tri nivoa, sa DCCT označenim vrednostima. WEQAS program pokriva 250 laboratorija u Velikoj Britaniji i Irskoj. Šalju se dva uzorka svaki drugi mesec (20).

GLYCATED HAEMOGLOBIN: QUALITY ASSURANCE

Svetlana Ignjatović

*Institute of Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia and School of Pharmacy,
University of Belgrade, Belgrade, Serbia & Montenegro*

Summary: Measurement of glycated haemoglobin (GHb), is widely used for routine monitoring of long-term glycaemic status in patients with *diabetes mellitus*. GHb is used both as an index of mean glycaemia and as a measure of risk for the development of diabetes complications. This test is also being used increasingly by quality assurance programs to assess the quality of diabetes care, e.g., requiring that healthcare providers document the frequency of GHb testing in patients with diabetes and the proportion of patients with GHb values below a specified value. Because different GHb assays can give different GHb values, the ADA recommends that laboratories use only assay methods that are certified as traceable to the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) GHb reference; these results are reported as haemoglobin (Hb) A_{1c}. Laboratories should use GHb assay methods with an interassay CV < 5% (ideally < 3%) and should be aware of potential interferences, including hemoglobinopathies, that may affect GHb test results. US laboratories should use only GHb assay methods that are certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) as traceable to the DCCT reference. In addition, laboratories that measure GHb should participate in a proficiency-testing program, such as the CAP Glycohemoglobin Survey, that uses fresh blood samples with targets set by the NGSP Laboratory Network.

Key words: glycated haemoglobin, quality assurance.

Literatura

1. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 1995; 18: 896-909.
2. American Diabetes Association. Tests of glycemia [Position Statement]. *Diabetes Care* 2000; 23 (Suppl 1): S80-S82.
3. American Diabetes Association. Implications of the Diabetes Control and Complications Trial [Position Statement]. *Diabetes Care* 2000; 23 (Suppl 1): S24-S26.
4. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of *diabetes mellitus*. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of *diabetes mellitus*. *Diabetes Care* 2000; 23: S4-S18.
5. Davidson MB. Diabetes research and diabetes care. Where do we stand? *Diabetes Care* 1998; 21: 2152-60.
6. American Diabetes Association. Provider Notes 2000; 1: 1-4.
7. Peterson CM, Jovanović L, Raskin P, Goldstein DE. A comparative evaluation of glycosylated haemoglobin assays: feasibility of references and standards. *Diabetologia* 1984; 26: 214-17.
8. Bodor GS, Little RR, Garrett N, Brown W, Goldstein DE, Nahm MH. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. *Clin Chem* 1992; 38: 2414-18.
9. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. *Clin Chem* 1994; 40: 138-144.
10. Little RR, Goldstein DE. Standardization of glycohemoglobin measurements. *AACC Endo* 1995; 13: 109-124.
11. Goldstein DE, Little RR. Bringing order to chaos: the National Glycohemoglobin Standardization Program. *Contemp Int Med* 1997; 9: 27-32.
12. NGSP Steering Committee. Implementation of the national glycohemoglobin standardization program (NGSP). *Diabetes* 1997; 46: 151A.
13. DCCT Research Group. Feasibility of centralized measurements of glycated hemoglobin in the diabetes control and complications trial: a multicenter study. *Clin Chem* 1987; 33: 2267-71.
14. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer H-M, Myers GL, Sacks DB, Goldstein DE. The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP): a five-year progress report. *Clin Chem* 2001; 47: 1985-92.
15. Schnedl WJ, Krause R, Halwachs-Baumann G, Trinker M, Lipp RW, Krejs GJ. Evaluation of HbA_{1c} determination methods in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care* 2000; 23: 339-44.
16. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of *diabetes mellitus*. *Clin Chem* 2002; 48: 436-72.
17. Marshall SM, Barth JH. Standardization of HbA_{1c} measurements: a consensus statement. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 45-46.
18. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-63.
19. DCCT Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent *diabetes mellitus*. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
20. Thomas A. Glycated haemoglobin quality assurance: the UK experience. In: John WG. Monitoring glycaemic control in the diabetic patient, IFCC Series, Excerpta Medica Publications, Elsevier Science Limited, 2002; 103-22.