

Jugoslav Med Biohem 2003; 22 (Suppl 1): 43–50

## STANDARDIZACIJA ODREĐIVANJA GLIKOHEMOGLOBINA/HbA<sub>1c</sub>: IFCC REFERENTNI SISTEM

Olivera Janković

Interlabexim, Beograd

*Kratak sadržaj:* Glikohemoglobin je uveden u rutinsku kliničku praksu ranih 1980-ih i ubrzo je postalo očito da postoji značajna razlika u rezultatima koji su dobijeni u različitim laboratorijama. Ove razlike u dobijenim rezultatima posledica su niza metoda koje se koriste u laboratorijama, i nedostatka primarnog referentnog materijala. Poređenje rezultata iz različitih laboratorija bilo je stoga teško ili čak nemoguće. Standardizacija sa uobičajenom kalibracijom je prvi put predložena 1984. godine, međutim, tek 1993. godine posle objavljivanja studije Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) (*Ispitivanja koja se odnose na komplikacije i kontrolu dijabetesa*) pitanje međunarodne standardizacije merenja glikohemoglobina postalo je važno za naučnike i kliničare. U to vreme, zbog nedostatka međunarodne standardizacije, nekoliko zemalja je razvilo nacionalne programe standardizacije. Važno je napomenuti da su ovi programi zasnovani na čvrstoj saradnji sa nacionalnim profesionalnim telima, i da su mnogo doprineli smanjenju razlika među laboratorijama u svim zemljama. Ovo poboljšanje u smislu smanjenja razlika između laboratorija je dokumentovano rezultatima dobijenim iz National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) (*Nacionalni program za spoljnu kontrolu kvaliteta*) materijala (kalibratora). Radna grupa Međunarodne federacije za kliničku hemiju (IFCC WG) za standardizaciju glikohemoglobina formirana je 1995. godine. IFCC projekat se zasniva na: jasnom definisanju analita zavisno od njegove molekularne strukture; razvijanju i potvrđivanju odobrene referentne metode koja bi sa visokom specifičnošću merila glikohemoglobina u krvnom uzorku i kontrolnim materijalima; razvijanju primarnog referentnog materijala; proizvodnji seta sertifikovanih humanih kontrolnih materijala koji bi se koristili kao sekundarni referentni materijal; ustanovljenju referentnih granica i utvrđivanju granica za donošenje medicinske odluke.

*Ključne reči:* glikohemoglobin, standardizacija, IFCC referentni sistem.

### Uvod

U vezi standardizacije i određivanja glikohemoglobina u dužem periodu se postavlja više pitanja i to:

*Šta je glikohemoglobin?* Glikozilirani hemoglobin je indeks srednje vrednosti glukoze u krvi u toku predhodnih 120 dana. Ovo je zbog toga što eritrocit ima životni vek od oko 120 dana. Nivou glikoziliranog hemoglobina u bilo kom trenutku doprinose svi eritrociti u cirkulaciji. Međutim, mera glikoziliranog hemoglobina je matematički izveden nivo šećera u krvi tokom predhodnih 120 dana, tako da nivoi šećera u krvi u predhodnih 30 dana više doprinose nivou glikoziliranog hemoglobina nego što to čine ranija očitavanja. Otuda se nivo glikoziliranog hemoglobina može povećati ili smanjiti relativno brzo neposredno posle velikih promena u nivou glukoze u krvi, što znači da nije potrebno 120 dana da bi se otkrila značajna promena u nivou glikoziliranog hemoglobina posle klinički značajne promene nivoa glukoze u krvi.

### Zbog čega treba koristiti glikohemoglobin?

- Postoji predvidljiv i uporedljiv odnos između glikohemoglobina kada se koristi metoda određivanja koja je standardizovana prema DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) referentnoj metodi i srednjim nivoima glukoze u krvi.
- Otuda ovo mogu primenjivati zdravstveni radnici i pacijenti da postave i usaglasu ciljnu vrednost za glukozu u krvi na osnovu dokaza iz DCCT.
- Važno je setiti se da je glikohemoglobin mera nivoa šećera u krvi u predhodnih 120 dana.

*Zašto treba standardizovati glikohemoglobin prema DCCT vrednostima?* Standardizovanje određivanja glikohemoglobina prema DCCT vrednostima bi omogućilo pojedinačnim kliničkim laboratorijama da dobiju rezultate testa koji bi se mogli direktno dovesti u vezu i sa srednjim vrednostima šećera u krvi i rizicima za nastajanje i/ili napredovanje komplikacija hro-

ničnog dijabetesa. To bi takođe omogućilo pacijentima i zdravstvenim radnicima ekvivalentna poređenja kontrole šećera.

*Da li postoje pokušaji da se na međunarodnom nivou standardizuju određivanja glikohemoglobina?* Da. Radna grupa Međunarodne federacije za kliničku hemiju i laboratorijsku medicinu trenutno u dužem periodu radi na standardizaciji.

Glikohemoglobin je uveden u rutinsku kliničku praksu ranih 1980-ih i ubrzo je postalo očito da postoji značajna razlika u rezultatima koji su dobijeni u različitim laboratorijama. Ove razlike u dobijenim rezultatima posledica su niza metoda koje se koriste u laboratorijama, i nedostatka primarnog referentnog materijala (1). Poređenje rezultata iz različitih laboratorija bilo je stoga teško ili čak nemoguće. Standardizacija sa uobičajenom kalibracijom je prvi put predložena 1984. godine (2), međutim, tek 1993. godine posle objavljivanja studije Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) (*Ispitivanja koja se odnose na komplikacije i kontrolu dijabetesa*) pitanje internacionalne standardizacije merenja glikohemoglobina postalo je važno za naučnike i kliničare (3). U to vreme, zbog nedostatka međunarodne standardizacije, nekoliko zemalja je razvilo nacionalne programe standardizacije od kojih su najznačajniji:

- u SAD; National Glycohemoglobin Standardisation Program (NGSP) (*Nacionalni program za standardizaciju glikohemoglobina*). Važnost mogućnosti poređenja rezultata spoznata je ranije u studiji DCCT (i takođe u United Kingdom Prospective Diabetes Study (*Prospektivne studije dijabetesa u Ujedinjenom Kraljevstvu*) [UKPDS]); s obzirom da u to vreme nije postojala međunarodna standardizacija, HPLC metod je korišćen za poređenje što je omogućavalo da ova ispitivanja budu uspešno završena (4-6);
- u Švedskoj; Mono S jonoizmenjivačka hromatografija je korišćena za poređenje (7, 8);
- u Japanu; primena uobičajenih kalibratora (kalibracija sa dve tačke) sa HbA<sub>1c</sub> vrednostima za koje se opredelilo Japansko društvo za dijabetes (9-11).

Važno je napomenuti da su ovi programi zasnovani na čvrstoj saradnji sa nacionalnim profesionalnim telima, i da su mnogo doprineli smanjenju razlika među laboratorijama u svim zemljama. Ovo poboljšanje u smislu smanjenja razlika između laboratorija je dokumentovano rezultatima dobijenim iz National External Quality Assessment Scheme (NEQAS) (*Nacionalni program za spoljnu kontrolu kvaliteta*). Interesantno je da je čak i u odsustvu nacionalnih programa standardizacije, postignuto poboljšanje u razlikama između laboratorija u zemljama gde je EQAS (*Projekat za spoljnu kontrolu kvaliteta*) redovno primenjivan (koristeći stabilne zamenjive materijale za kontrolu) za glikohemoglobin (12-14).

Zajednička osobina ovih nacionalnih programa je odsustvo nekomercijalne, nezavisne referentne metode za kvantifikaciju HbA<sub>1c</sub>, i nedostatak primarnih i sekundarnih referentnih materijala (kalibratora). Na ovim nedostacima koji se odnose na standardizaciju glikohemoglobina u dužem periodu uspešno radi International Federation of Clinical Chemistry Working Group (IFCC WG) (*Radna grupa Međunarodne federacije za kliničku hemiju*).

### IFCC standardizacija

Radna grupa Međunarodne federacije za kliničku hemiju (IFCC WG) za standardizaciju glikohemoglobina oformljena je 1995. godine (15). Cilj inicijative IFCC-a je bio da se umesto nacionalnih standardizacija (koje su primenjivale različite pristupe pri standardizaciji) razvije međunarodna, naučno zasnovana, šema za standardizaciju.

IFCC projekat se zasniva na sledećem:

- jasnom definisanju sastojka zavisno od njegove molekularne strukture;
- razvijanju i potvrđivanju odobrenih referentnih metoda koja bi sa visokom specifičnošću merila sastojak u krvnom uzorku i kontrolnim materijalima;
- razvijanju primarnog referentnog materijala;
- proizvodnji seta sertifikovanih humanih kontrolnih materijala koji bi se koristili kao sekundarni referentni materijal;
- ustanovljenju referentnih oblasti (granica) i utvrđivanju granica za donošenje medicinske odluke.

Ovim ciljevima se uspešno prišlo na osnovu niže opisanih istraživanja.

### Definicija HbA<sub>1c</sub>

IFCC WG je odlučila da standardizaciju zasnuje na HbA<sub>1c</sub>, koji je stabilan oblik glukoze na N-terminalnoj amino grupi β-lanca HbA (N-[1-deoksifruktozil] hemoglobina). Obrazloženje je bilo da je HbA<sub>1c</sub> bihemijski dobro okarakterisan, da je glavni oblik glikohemoglobina u humanoj krvi i da većina komercijalnih testova za glikohemoglobin meri samo ovaj oblik. Čak i većina testova afinitetne hromatografije koji prvobitno mere sve glikohemoglobinske vrste je interno standardizovana poređenjem u odnosu na metodu određivanja HbA<sub>1c</sub> pošto postoji bliska korelacija između »ukupnog glikohemoglobina« izmerenog afinitetnom hromatografijom i HbA<sub>1c</sub>.

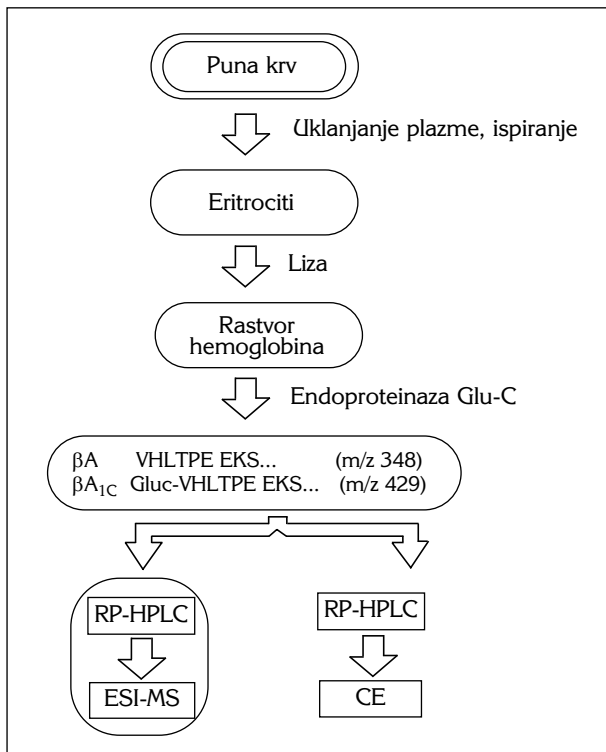
### Referentna metoda

HPLC metode su mnogo godina primenjivane kao komparativne metode za standardizaciju rutinskih testova. Ali ove metode nisu referentne metode u metrološkom smislu jer one ne mere specifično HbA<sub>1c</sub>. Ovim tehnikama se mere različiti dodaci i količine

interferenata (koji nisu HbA<sub>1c</sub>) kao HbA<sub>1c</sub> zavisno od uslova (16). Stoga je IFCC WG (*Radna grupa međunarodne federacije za kliničku hemiju*) razvila metodu koja razlikuje manji N-terminalni deo β-lanca HbA<sub>1c</sub> od lanaca HbA<sub>0</sub> molekula, čime se izbegava heterogenost do koje se dolazi modifikacijom drugih mesta glikacije Hb molekula.

Referentna metoda (17) se zasniva na enzimskom cepanju intaktnih molekula hemoglobina sa endoproteinazom Glu-C da bi se dobili β-N-terminalni hekseptidi HbA<sub>1c</sub> i HbA<sub>0</sub>. Peptidi se tada odvajaju reverznom fazom HPLC i kvantifikuju pomoću elektrosprej jonizujuće-masene spektrometrije (*electrospray ionization-mass spectrometry-ESI-MS*; opcija A) ili pomoću kapilarne elektroforeze (CE, opcija B) (*v. Sliku 1*).

Ispitivane su analitičke karakteristike izvođenja ove dve kandidovane referentne metode i dokazano je da su obe metode specifične za definisani analit. Nema interferencije patoloških hemoglobina kao što su HbS i HbC, niti acetilovanog ili karbamil hemoglobina. Važno je napomenuti da su obe metode linearne u kliničko relevantnom koncentracionom opsegu od 2,5 - 11% HbA<sub>1c</sub>. Ne postoji statistički značajna razlika između HPLC-CE i HPLC-MS metoda, tako da nije bitno koja se metoda primenjuje za utvrđivanje vrednosti u referentnom ili kontrolnom materijalu. Obe metode imaju dobru preciznost unutar i između laboratorija; ovo su više puta pokazali međulaboratorijski koeficijenti varijacije (KV) u mreži referentnih laboratorija (KV= 1,5%).

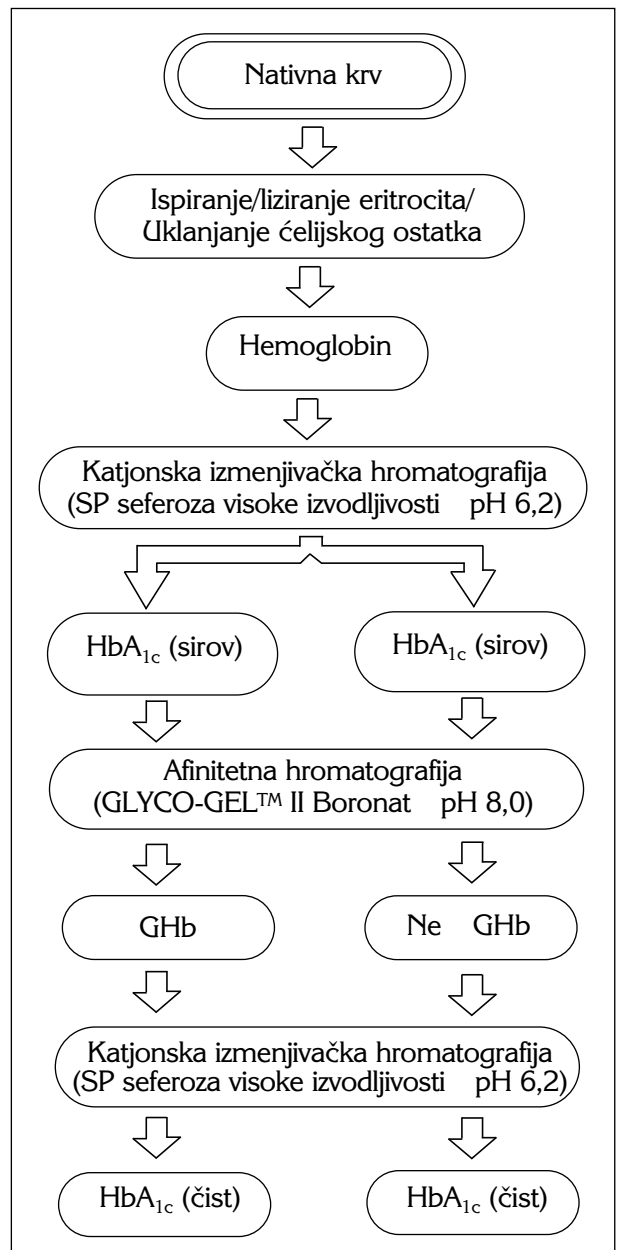


Slika 1. Dijagram referentne metode Međunarodne federacije za kliničku hemiju (IFCC) (8)

IFCC referentnu metodu prihvatila su nacionalna društva 2001. godine, a odobrena je kao IFCC referentna metoda 2002. godine (18).

*Primarni referentni materijali*

Pripremljeni su veoma prečišćeni materijali, koristeći krv od zdravih osoba koje ne boluju od dijabetesa, prema šemi koja je prikazana na slici 2 (19). Čiste frakcije β-N-terminalnog glikohemoglobina A i neglikoliziranog hemoglobina A pripremljene su primenom tro-



Slika 2. Postupci prečišćavanja za izolovanje čistih HbA<sub>0</sub> i HbA<sub>1c</sub> korišćeni za pripremanje primarnih referentnih materijala Međunarodne federacije za kliničku hemiju (8)

stepenog hromatografskog postupka (katjonska izmena SP Sefaroze, afinitetna hromatografija glikogel boronata i ponovo katjonska izmena SP Sefaroze) (*cation exchange SP Sepharose, Glycogel boronate affinity chromatography and again by cation exchange SP Sepharose*). Čistoća preparata je procenjena pomoću HPLC i kapilarnog izoelektričnog fokusiranja ili elektrosprej jonizujuće-masene spektrometrije. Primenom navedene tehnike, samo mase tipične za  $\alpha$ -lanac (15 126 Da) i  $\beta$ -lanac (15 866 Da) bile su detektovane u prečišćenom HbA<sub>0</sub> materijalu, dok su isti signali zajedno sa signalom tipičnim za N-terminalni glikozilovan  $\beta$ -lanac (16 028 Da) bili detektovani u HbA<sub>1C</sub> frakciji. Čistoća je bila >99,5% za neglikozilovan hemoglobin A i > 98,5 za  $\alpha$ -N-terminalni glikozilovan hemoglobin A.

Rezultati mapiranja peptida su ukazali da mala količina  $\beta$ -N-terminalnog neglikozilovanog hemoglobina A ko-eluirala sa  $\beta$ -N-terminalnim glikozilovanim hemoglobinom A. Međutim, standardnim postupkom dodavanja, može se odrediti tačna količina  $\beta$ -N-terminalnog glikozilovanog hemoglobina A, dok se smeše i  $\beta$ -N-terminalnog neglikozilovanog hemoglobina A i  $\beta$ -N-terminalnog glikozilovanog hemoglobina A mogu upotrebiti za kalibrisanje referentne metode. U ovu svrhu potrebno je da se pomešaju tačne količine HbA<sub>0</sub> i HbA<sub>1C</sub> prema željenom sadržaju kalibratora HbA<sub>1C</sub>.

Da bi se osigurala održivost međunarodne mreže referentnih laboratorija proizveden je dovoljan broj kalibracionih setova.

#### *Sekundarni referentni materijali*

Radna grupa Međunarodne federacije za kliničku hemiju IFCC WG razvila je nekoliko sekundarnih referentnih materijala (pul krvi, panel krvnih uzoraka i liofilizirane kontrole), specijalno osmišljenih da se koriste u različite svrhe. Svi proizvedeni materijali bili su takvog sastava da su koncentracije HbA<sub>1C</sub> pokrivali klinički relevantan koncentracioni opseg. Za pul krvi, sve laboratorije iz mreže odredile su referentne vrednosti; dok su za 40 pojedinačnih uzoraka krvi uvek 3 laboratorije iz mreže davale referentnu vrednost za uzorke. Jedna laboratorija iz mreže primenom trostrukog merenja tokom tri probe u barem tri različite fiole po lotu, odredila je vrednosti referentnom metodom u liofilizovanim kontrolama.

Za studije među poređenja unutar mreže referentnih laboratorija, pripremljene su studije poređenja metoda sa označenim metodama, a za kalibrisanje rutinskih metoda pripremljeni su pulovi krvi (krv od 10 davalaca krvi pomešana za svaki pul). Preimućstvo takvih pulova je ta da je smanjeno svako potencijalno

interferiranje kod pojedinačnog uzorka (efekti matriksa, interferentne supstance), tako da nema uticaja ni na korelaciju ni na kalibraciju.

Za poređenja između IFCC i rutinskih metoda pripremljen je panel od 40 uzoraka krvi uzetih od pojedinačnih donora. U ovom slučaju detekcija potencijalne interferencije bila je od interesa jer ona ukazuje na nedostatak specifičnosti rutinske metode. Ovi pulovi krvi i panel uzorka krvi čuvani su na 80 °C a slati su na suvom ledu.

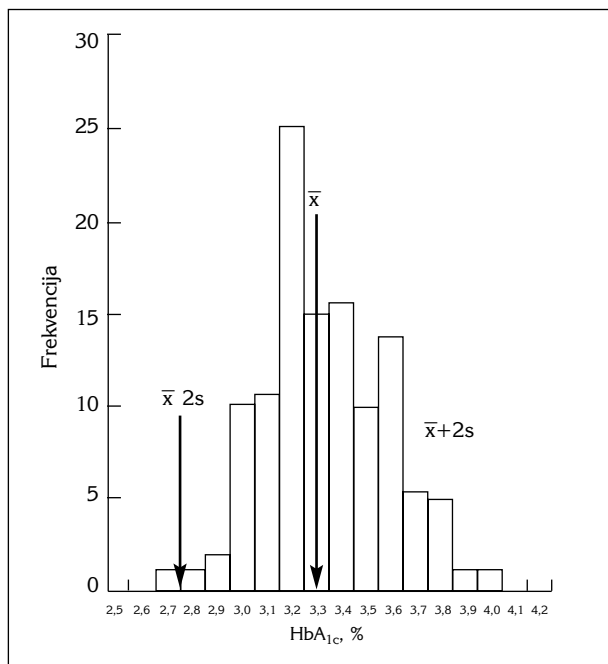
Konačno, liofilizirani materijal je pripreman na osnovu iskustva holandskih i italijanskih laboratorija (20). Ovaj materijal bio je vrlo stabilan (više od 18 meseci na 20 °C i na 2-4 °C), bez uticaja matriksa na najveći broj komercijalnih metoda, izuzev u slučaju imunohemijske metode. Bio je idealan za postupak unutrašnje i spoljašnje kontrole kvaliteta, a imao je i protokole za specifičnu primenu metoda.

#### *Referentni opsezi*

Visoka specifičnost referentne metode daje niže vrednosti za HbA<sub>1C</sub> u uzorcima pacijenata pošto nespecifične komponente koje su izmerene kao »HbA<sub>1C</sub>« pomoću rutinskih metoda nisu izmerene referentnom metodom. Shodno tome određen je referentni opseg za novu referentnu metodu za osobe koje nemaju dijabetes. Analizirani su EDTA-isprani eritrociti sakupljeni u periodu od aprila do maja 2000. godine u studiji na danskoj populaciji (Dia Risk, Steno Diabetes Center, Kopenhagen) od 120 osoba koje nisu imale dijabetes (60 žena i 60 muškaraca). Za procenu da osobe nisu imale dijabetes primenjeni su trenutno važeći kriterijumi Svetske zdravstvene organizacije i Američke asocijacije za dijabetes (našte šećer u plazmi < 6,1 mmol/L i 2-časovna glukoza standardnog OGTT < 7,8 mmol/L). Srednja starost grupe je bila 43,5 godina (opseg 32-60).

Četiri laboratorije internacionalne mreže primenjivale su HPLC-CE metodu, a tri HPLC-MS metod; svaka laboratorija analizirala je 25 uzoraka u duplikatu. Dva uzorka za kontrolu kvaliteta analizirana su četiri puta a sve laboratorije analizirale su šest referentnih uzoraka. Nisu nađene statistički značajne razlike između muškaraca i žena tako da su se podaci mogli kombinovati. Distribucija frekventnosti rezultata je prikazana na slici 3. Posmatranjem grafika moglo bi se pretpostaviti da postoji bimodalna distribucija, ali statistička procena je pokazala da je distribucija bila unimodalna, koja se uklapa u Gausovu krivu raspodele.

Srednja vrednost iznosila je 3,33% HbA<sub>1C</sub>, a standardna devijacija 0,24%. Iz ovih podataka ustanovljen je tada 95% referentni opseg od 2,85-3,81%.

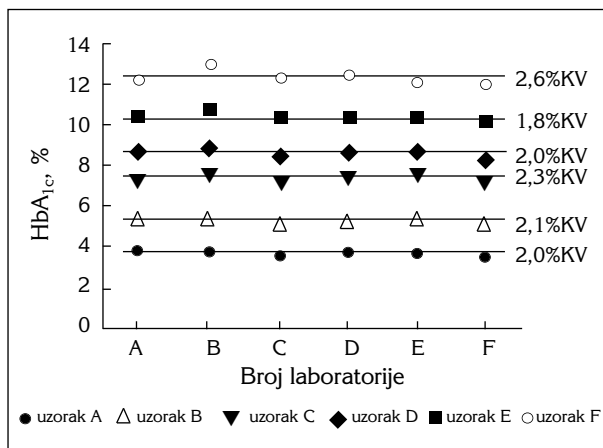


Slika 3. Referentni intervali za 120 odrasla osoba koje nisu imale dijabetes ( $\bar{x}$  = srednja vrednost, SD = standardna devijacija) (8).

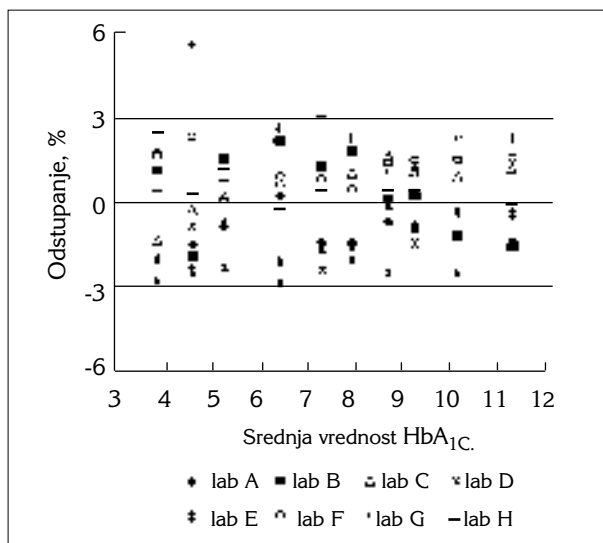
**Internacionalna mreža referentnih laboratorija za određivanje HbA<sub>1c</sub>**

Za sprovođenje i održivost novog HbA<sub>1c</sub> referentnog sistema potrebna je međunarodna mreža referentnih laboratorija (NRL, Network of reference laboratories). Laboratorije bi trebalo da ocenjuju referentnu metodu, slože se sa njom i štampaju Standardne postupke rada (*Standard Operating Procedure SOP*) kao i da budu osposobljene da je pouzdano izvode. Mreža referentnih laboratorija koje primenjuju referentnu metodu ustanovljena je 1997. godine, koristeći ESI-MS ili CE opciju. Učesnici su uključeni u jednu/dve međulaboratorijske provere godišnje (obavljeno je devet opita od kako je prvi obavljen u aprilu 1997. godine). Pulovi krvi od 6-8 pacijenata (kao hemolizati), koji su pokrivali opseg od 4-12% HbA<sub>1c</sub>, bili su distribuirani za analizu; takođe su bila uključena dva kontrolna uzorka i jedan set primarnih kalibratora. Svaki uzorak je bio liziran u duplikatu, a svaki alikvot analiziran je dva puta. Dobijeni rezultati su analizirani centralno i saopšteni učesnicima. Kriterijumi uključivanja bili su sledeći:

- potpuno usaglašavanje sa SOP u svim glavnim tačkama (priprema uzorka, HPLC i CE separacija, kalibracija);
- međulaboratorijska preciznost, KV = 3% na svakom uzorku, srednja međulaboratorijska preciznost na svim uzorcima, KV = 2%;
- odstupanje od ukupne srednje vrednosti  $\pm 3\%$  (relativno) na svakom uzorku, srednja odstupanja od konsenzusne srednje vrednosti na svim uzorcima  $\pm 2\%$ .



Slika 4. Reproducibilnost između laboratorija. Prva međulaboratorijska (IFCC) studija: reproducibilnost između laboratorija na šest različitih nivoa HbA<sub>1c</sub>. KV, koeficijent varijacije.



Slika 5. Odstupanja pojedinačnih laboratorija od srednje vrednosti za koju je postignut konsenzus. Četvrta IFCC međulaboratorijska studija (8).

Tipičan set rezultata je prikazan na slici 4 (reproducibilnost; uzeta iz četvrte studije među poređenja) i slici 5 (tačnost; uzeta iz četvrte studije međupoređenja). Ove probe su dokazale da je moguće ustanoviti međunarodnu mrežu referentnih laboratorija koje su u stanju da pouzdano izvode IFCC referentnu metodu za HbA<sub>1c</sub>.

Glavni zadatak mreže Međunarodne federacije za kliničku hemiju je pouzdano davanje ciljnih vrednosti HbA<sub>1c</sub> referentnim materijalima, referentnom panelu krvnih uzoraka i kontrolnim materijalima koji su potrebni za sprovođenje i održivost sistema standardizacije. Učesnici takođe moraju redovno da obavljaju studije među-poređenja da bi obezbedili analitičko izvođenje referentnih metoda.

### Studije za poređenje metoda

U septembru 1999. godine proizvođači metoda HbA<sub>1C</sub> pozvani su da učestvuju u studiji »Florence II«; projektu koji je specijalno dizajnirala radna grupa Međunarodne federacije za kliničku hemiju (IFCC WG) da bi odgovorila na sledeća pitanja:

- Da li je moguće standardizovati sve metode prema IFCC referentnom sistemu?
- Šta su IFCC HbA<sub>1C</sub> brojevi u poređenju sa brojevima HbA<sub>1C</sub> proizvođača i takođe u poređenju sa naznačenim HbA<sub>1C</sub> brojevima poredbenih metoda (tj. NGSP, švedske i japanske šeme standardizacije) koje se trenutno koriste?
- Koji su materijali pogodni da povežu metode proizvođača sa IFCC referentnom metodom mreže?

U ovim studijama (prema studiji »Florence II« isplanirane su i završene druge dve studije); korišćeni su pulovi krvi koji pokrivaju klinički relevantan opseg koncentracije. Vrednosti uzoraka pula za referentne metode dale su sve ovlašćene NRL laboratorija (n=10); za NGSP sistem Sjedinjenih američkih država devet NGSP laboratorija iz mreže ovog sistema koje koriste različite »sekundarne referentne metode« koje su standardizovane prema Bio-Rex 70 metodi koja se koristi u DCCT studiji; za japansku šemu standardizacije tri referentne laboratorije koje primenjuju HPLC metode Tosoh-a i KyotoDaichi-a koje su osnov za sistem japanske standardizacije; i nacionalna referentna laboratorija u Švedskoj koja primenjuje Mono S HPLC metodu koja je osnov sistema švedske standardizacije. Ova studija je pokazala da postoji linearna korelacija između IFCC referentne metode i poredbenih metoda. Sve naznačene metode za poređenje imale su pozitivan otsek (na engleskom *intercept* = deo linije koji leži između dve tačke u kojima je presečena linijama ili ravnima).

Konačno, u odnosu na rutinske testove, svi proizvođači su bili pozvani da učestvuju u studijama poređenja metoda. Rutinske metode koje se često koriste u medicinskim laboratorijama bile su zastupljene sa tri glavna analitička principa koja se koriste za merenje HbA<sub>1C</sub>/glikoziliranog hemoglobina, tj. imuno-određivanje, HPLC jono izmenjivačka hromatografija i afinitetna hromatografija.

Jono izmenjivačka hromatografija je predstavljena HPLC metodama proizvođača Bio-Rad i Tosoh, imuno-određivanje Roche-ovim Tina-quant i Integra testovima i Bayer-ovim sistemom DCA 2000, dok je afinitetna hromatografija primenjena u Abbot-ovom IMx određivanju i Primus sistemu.

Namera je bila da se ocene odnosi između ovih rutinskih metoda i referentnih metoda i da se prouči da li je moguće standardizovati metode sa kalibratorima imajući ciljne vrednosti koje su dobijene sa IFCC

referentnom metodom. U tom cilju korišćen je panel od 40 krvnih uzoraka koji pokriva klinički relevantan opseg koncentracije. Vrednosti referentne metode su odredile tri NRL laboratorije za svaki uzorak. Vrednosti rutinskih metoda su odredili sami proizvođači i objavili je kao srednju vrednost četiri posebna merenja.

U svim poređenjima je dobijena linearna korelacija između rutinskih metoda i HbA<sub>1C</sub> referentnih metoda. Sve metode, čak i one specifične zasnovane na imuno analizi, imale su pozitivan otsek zbog činjenice da su podešene primenom nespecifično određenim vrednostima HPLC metodom za poređenje.

Kalibracija je izvedena primenom 6 pulova krvi sa ciljnim vrednostima koje su dale sve NRL laboratorije. Pulove je analizirao proizvođač, a rezultati su korišćeni za virtualnu standardizaciju ponovnim izračunavanjem vrednosti iz 40 uzoraka. Posle kalibracije nađeno je da regresione prave ponovno izračunatih uzoraka krvi nisu bile statistički različite od prave identičnosti ( $y = x$ ). Ubedljivo je dokazano da je moguće standardizovati sve rutinske metode nezavisno od njihovih analitičkih principa. Ovo znači da je IFCC referentni sistem koji je razvila Radna grupa međunarodna federacija za kliničku hemiju (IFCC WG) podesna za jednoobraznu standardizaciju rutinskih određivanja HbA<sub>1C</sub>/glikohemoglobina/ (detaljna publikacija ove studije je u pripremi).

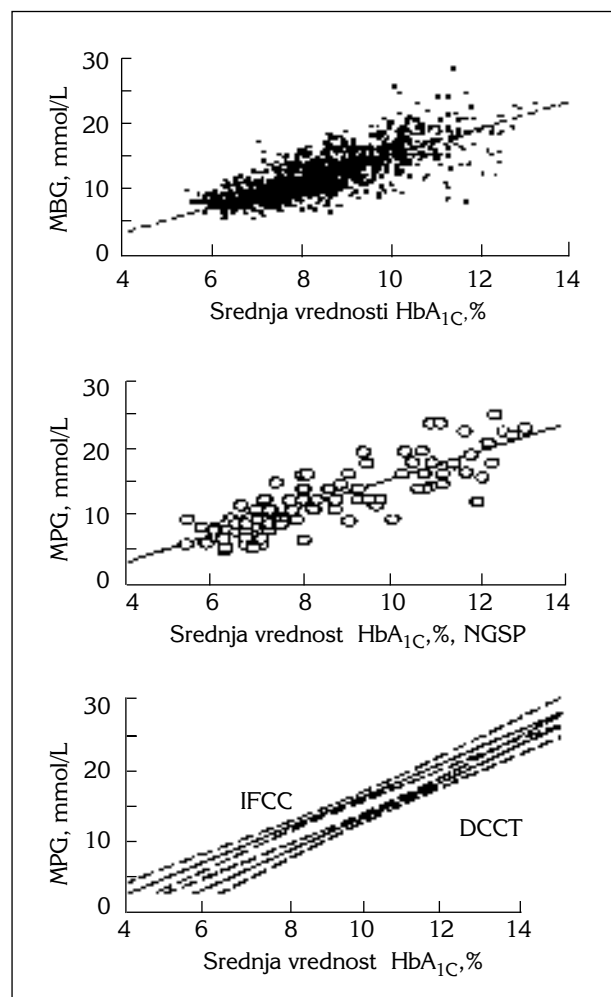
### Klinička primena

Treba ilustrovati kako primena IFCC referentnog sistema može da utiče na važno pitanje kao što je odnos između glikohemoglobina i srednje vrednosti glikemije (21). Odnos je kompleksan, jer nekoliko drugih faktora (varijabilnost u životnom veku eritrocita i različiti intenzitet glikacije među pojedincima, osim tehničkih artefakta kao što je nepravilna upotreba glukometra i laboratorijske greške) mogu imati uzajamno dejstvo. U DCCT studiji inicijalno je određena korelacija između HbA<sub>1C</sub> i glukoze u krvi samo kod ograničenog broja pacijenata za vreme studije o izvodljivosti (22), ali opsežna analiza u različitim vremenskim tačkama i uz korišćenje kompletnog seta podataka na raspolaganju je tek od nedavno (23).

Kao što se može videti sa *slike 6* (na vrhu) odnos između glikohemoglobina i srednje vrednosti glukoze u plazmi (MPG) može se opisati linearnim modelom regresije. Iz celokupnih DCCT podataka, pokazano je da svako povećanje od 1% u HbA<sub>1C</sub>, prati promena od 1,98 mmol/L u MPG. Shodno tome, MPG se može izračunati iz HbA<sub>1C</sub> u sledećim opsezima: MPG, od 3,6 19,5 mmol/L; HbA<sub>1C</sub>, od 4,0 12%.

### Buduće aktivnosti

Kao što se može videti, većina ciljeva IFCC projekta je postignuta. Za sprovođenje predložene IFCC šeme standardizacije komercijalna određivanja treba



Slika 6. Odnos između srednjih vrednosti glukoze u plazmi izračunatih iz profila glukoze u sedam tačaka i glikoziliranog hemoglobina u studiji koja se odnosi na kontrolu i komplikacije kod dijabetesa (DCCT).

MPG = srednja vrednost glukoze u plazmi;

MBG = srednja vrednost glukoze u krvi (8).

trajno vezati za ovaj nov referentni sistem. U tu svrhu treba imati na umu da u odnosu na Evropsku zajednicu, direktiva koja se odnosi na medicinske uređaje koji se koriste za *in vitro* dijagnostiku (24) zahteva da proizvođači dijagnostičkih uređaja moraju da garantuju mogućnost praćenja njihovih rutinskih testova do referentnih metoda i materijala višeg metrološkog reda a budući ISO Standard ISO 17 511 detaljno opisuje kako ovo treba učiniti. Novo razvijeni IFCC referentni sistem za merenje HbA<sub>1c</sub> u ljudskoj krvi je internacionalno metrološki dobar referentni sistem na koji se, prema Direktivi evropske zajednice i ISO standardu koji se odnose na mogućnost praćenja kalibracije HbA<sub>1c</sub>, rutinski testovi moraju oslanjati u budućnosti.

Posao sada mora da otpočne na globalnoj implementaciji IFCC standardizacije; ova implementacija mora da se razvije u bliskoj saglasnosti sa dijabetologima, nacionalnim naučnim društvima, proizvođačima i korisnicima. Presentacija IFCC referentnog sistema je već započeta (25), a dokumenti konsenzusa su u pripremi.

## IFCC REFERENCE SYSTEM FOR GLYCOHAEMOGLOBIN/HbA<sub>1c</sub> STANDARDIZATION

*Olivera Janković*

*Interlabexim, Belgrade, Serbia and Montenegro*

**Summary:** Glycated haemoglobin was introduced into routine clinical practice in the early 1980s and it quickly becomes apparent that there was a significant difference in results produced by different laboratories. Standardization with common calibration was first proposed in 1984, however, it was only after the publications of Diabetes Control and Complications Trial study in 1993 that the issue of international standardization of glycated haemoglobin measurements become an important objective for scientists and clinicians. In 1995 the International Federation of Clinical Chemistry Working Group (IFCC WG) on glycohaemoglobin standardization was formed with the objective to achieve a uniform international standardization for glycated haemoglobin. The IFCC project was based on the clear definition of the analyte based on its molecular structure, development and validation of an approved reference method, development of a primary reference material, production of a set of certified human control material to be used as secondary reference material, and establishment of reference ranges and medical decision limits.

**Key words:** glycohaemoglobin, standardization, IFCC reference system.

## Literatura

1. Boucher BJ, Burrin JM, Gould BJ. A collaborative study of the measurement of glycosylated hemoglobin by several methods in seven laboratories in the United Kingdom. *Diabetologia* 1983; 24: 265–71.
2. Peterson CM, Jovanović L, Raskin P, Goldstein DE. A comparative evaluation of glycosylated hemoglobin assays: feasibility of references and standards. *Diabetologia* 1984; 26: 214–17.
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of longterm complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977–86.
4. Little RR. The National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). In: John WG, ed. *Monitoring glycaemic control in the diabetic patient*. London: Harcourt Health Communication; 2001: 123–36.
5. College of American Pathologists. *Glycohemoglobin survey 2000, set GH2-A*. Northfield, IL, College of American Pathologists: 2000.
6. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB, Goldstein DE. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A five-year progress report. *Clin Chem* 2001; 47: 1985–92.
7. Eskerborn S, Bergqvist Y, Jeppsson JO. Improved method for analysis of glycated hemoglobin by ion exchange chromatography. *Ann Clin Biochem* 1994; 31: 355–60.
8. Mosca A, Paleari R. Standardization schemes for hemoglobin A<sub>1c</sub> determination. In: John WG, ed. *Monitoring glycaemic control in the diabetic patient*. London: Harcourt Health Communication; 2001: 137–50.
9. Shima K, Endo J, Oimomi M, et al. Interlaboratory differences in HbA<sub>1c</sub> measurement in Japan, an interim report of the committee on an interlaboratory standardization of HbA<sub>1c</sub> determination, the Japan Diabetes Society. *J Japan Diab Soc* 1994; 37: 233–43.
10. Shima K, Endo J, Oimomi M, et al. Interlaboratory differences in GHb measurement in Japan, the third report of the GHb standardization committee, the Japan Diabetes Society. *J Japan Diab Soc* 1996; 39: 485–93.
11. Shima K, Endo J, Oimomi M, et al. Interlaboratory differences in GHb measurement in Japan, the fifth report of the GHb standardization committee, the Japan Diabetes Society. *J Japan Diab Soc* 1998; 41: 317–23.
12. Weykamp C, Penders TJ, Muskiet FAJ, van der Slik W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. *Clin Chem* 1994; 40: 138–44.
13. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Capani F, Pagano G, Plebani M. A re-evaluation of glycohemoglobin standardization: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 243–8.
14. Marshall SM, Barth JH. Standardization of HbA<sub>1c</sub> measurements: a consensus statement. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 45–6.
15. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardization of HbA<sub>1c</sub>/glycohemoglobin determinations. *J IFCC* 1996; 9: 62–7.
16. Koskinen LK. Specificity of hemoglobin A<sub>1c</sub> measurement by cation exchange liquid chromatography. Evaluation of a Mono S column method. *Clin Chim Acta* 1996; 253: 159–69.
17. Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for hemoglobin A<sub>1c</sub> based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997; 43: 1944–51.
18. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umamoto M, Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA<sub>1c</sub> in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 78–89.
19. Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppsson JO. Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA<sub>1c</sub> determinations. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 299–308.
20. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Evaluation of a reference material for glycated hemoglobin. *Wur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 67–72.
21. Bonora E, Calcaterra F, Lombardi S, Bonfante N, Formentini G, Bonadonna RC, Muggeo M. Plasma levels through the day and HbA<sub>1c</sub> interrelationship in type 2 diabetes: implications for treatment and monitoring of metabolic control. *Diabetes Care* 2001; 24: 2023–9.
22. The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. Diabetes Control and Complication Trial (DCCT): results of the feasibility study. *Diabetes Care* 1987; 10: 1–19.
23. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, England JD, Tennil A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA<sub>1c</sub>. *Diabetes Care* 2002; 25: 257–8.
24. European Communities. Directive 98/79 EC on in vitro diagnostic medical devices. *Off J L* 1998; 331:1–37.
25. Boulton AJM, Saudek CD. The need for standardisation of glycated haemoglobin measurements. Report on an International Workshop held in Dusseldorf, Germany 17 January 2002. EASD News Section 04/02 ([www.easd.org](http://www.easd.org)).