

HbA1c Standardizasyonu

HbA1c Standardization

Sezer Uysal

Doruz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Glisemik kontrolün iyileştirilmesi diyabete bağlı mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişime riskini azaltır. Glisemik durumun izleminde en sık kullanılan belirteç olan HbA1c ölçümü ile ilgili birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Ölçüm yöntemlerini iyileştirmek için 1990'lı yıllarda ulusal standardizasyon programları geliştirilmiştir. Ayrıca sonuçların izlenebilirliğinin sağlanması için IFCC tarafından referans materyal ve yöntem geliştirilmiştir. Referans yöntem sonuçları ulusal yöntemlerin sonuçları ile karşılaştırılarak doğrusal bir ilişki olduğu saptanmış ve bir master eşitlik oluşturulmuştur. Günümüzde HbA1c diyabet tanı kriterleri arasına katılmıştır ve birçok diyabet ve klinik kimya cemiyetleri HbA1c ölçümünün sertifikasyon yöntemleriyle yapılmasını önermektedir.

Anahtar Sözcükler: Diyabet komplikasyonları; Hemogloblin A; glikozile; standardizasyon

ABSTRACT

Improving glyceemic control reduces the development of microvascular and macrovascular complications of diabetes mellitus. HbA1c measured by various methods is used to monitor glyceemic status. In 1990s, various national standardization programs were implemented to reduce variability in HbA1c results. Furthermore, reference material and reference method were developed by IFCC to provide traceability. The results of the national programs were compared with the reference method and a linear regression curve was obtained. Based on these results a master equation was created. Nowadays, HbA1c is implemented in the diagnostic criteria of diabetes and many diabetes and clinical chemistry associations recommend measuring HbA1c with certified methods.

Key Words: Diabetes complications; Hemoglobin A; glycosylated; standardization

GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre günümüzde dünyada 346 milyon hastası bulunan Diyabetes Mellitus gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında dördüncü sıradadır (1). İnsülin yetersizliği ve hiperglisemi ile karakterize kronik bir hastalık olan diyabette gözler, böbrekler, periferel sinirler, kalp ve kan damarlarında komplikasyon gelişme riski yüksektir. Diyabet komplikasyonları ile hipergliseminin ilişkisini araştıran geniş kapsamlı üç tane prospektif çalışma 1990'lı

yıllarda tamamlanmıştır (2). Dokuz yıl süren "Diabetes Control and Complications Trial" (DCCT) 1993'te tamamlanmış ve retinopati ve nöropati gibi kronik komplikasyonların gelişme riski ve ilerlemesinin, glikemik hemogloblin (GHb) ya da HbA1c ölçümü ile belirlenebilen glisemik kontrolle bağlantılı olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın devamı olan "The Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications" (EDIC) çalışmasında ise hiperglisemi ile koroner kalp hastalıkları gibi makrovasküler hastalıklar arasındaki

ilişki gösterilmiştir. "United Kingdom Prospective Diabetes Study" (UKPDS) çalışması da 1997 yılında tamamlanmıştır ve diyabet ile mikrovasküler komplikasyonlar arasındaki ilişki araştırılmıştır. Aynı zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda yoğun glisemik kontrolün uzun dönem mikrovasküler komplikasyonların riskini azaltacağı belirlenmiştir. Örneğin sıkı glisemik kontrol ile HbA1c düzeylerinin %7.5 olması %10 olmasına göre retinopati riskinin %74'e kadar azalmasını sağlar.

Laboratuvarlarda glisemik kontrolün takibinde kullanılan çeşitli yöntemler arasında HbA1c, fruktozamin, glike albumin, 1,5 anhidroglusitol, C-peptid düzeyleri ölçümü ve proteomik yöntemleri sayabiliriz. Bunlar arasında en sık kullanılanı HbA1c ölçümüdür. Hemoglobinin glikasyonu hemoglobinin alfa ve beta zincirlerinin valin-lizin kalıntılarına glukozun nonenzimatik eklenmesidir ve ilk olarak 1962 yılında tanımlanmıştır (3). HbA1c spesifik olarak hemoglobinin beta zincirinin N-terminal valin grubuna glukozun spontan eklenmesidir. Kan glukoz düzeyine ve eritrosit ömrüne bağlıdır ve 8-12 haftalık kan glukoz düzeylerini yansıtır.

"College of American Pathologists" (CAP), 1993 yılında yaptığı çalışmada laboratuvarlarda HbA1c, HbA1 ve GHb şeklinde farklı ölçüm yöntemlerinin olduğu ve farklı sonuçların glisemik kontrolün takibi açısından sorun yaratabileceğini belirtmiş ve aynı yıl "American Association for Clinical Chemistry" (AACC) HbA1c ölçümünün standardizasyonu için bir alt komite oluşturmuştur (4). "American Diabetes Association" (ADA) tarafından 1994'te HbA1c hedef değerleri belirlenmiştir (5). Ancak laboratuvarlarda kullanılan ölçüm yöntemlerinin ve sonuçların farklılığı nedeniyle sorunlar yaşanmıştır. HbA1c ölçümünde kullanılan çeşitli yöntemleri Tablo 1'de görebiliriz.

Sonuçların tüm dünyada karşılaştırılabilir olmasının önemi nedeniyle 1995 yılında

Tablo 1. HbA1c ölçüm yöntemleri.

Yük farklılığına dayanan yöntemler

İyon değişim kromatografi

Elektroforez

Kapiller elektroforez

İzoelektrik odaklama

Yapısal farklılığına dayanan yöntemler

Afinite kromatografi

İmmüno kimyasal analizler

Enzimatik yöntemler (fruktozil valin oksidaz)

"International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine" (IFCC) ve sonraki yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde "National Glycohemoglobin Standardization Programme" (NGSP) HbA1c ölçümü için standardizasyon programlarını başlatmıştır (4). Aynı zamanlarda Japonya ve İsveç'te de benzer programlar başlamıştır. Bütün yöntemlerde HPLC ölçümünün duyarlılığının artırılmasına çalışılmıştır. İsveç yöntemi katyon değiştirici olarak metil sülfonat kullanmaktadır ve ulusal yöntemler arasında duyarlılığı en yüksek olan yöntemdir. Japon yönteminde ise standardizasyon kalibratörleri üzerinden sağlanmaktadır.

NGSP programının amacı HbA1c test sonuçlarını standardize ederek klinik laboratuvar sonuçlarının, kan glukozu ile komplikasyon riski ilişkisini rapor eden DCCT çalışması ile karşılaştırılabilir olmasıdır (6). NGSP programında DCCT/EDIC çalışmalarında kullanılan yöntem geliştirilmiştir. Program kapsamında 1 tane santral referans laboratuvar, 3 tane primer referans laboratuvar ve 7 tane sekonder referans laboratuvar bulunmaktadır. Laboratuvarlararası CV %2.5'in altındadır. NGSP, AACC ve CAP ile birlikte çalışmakta, üretici firmalar ve laboratuvarların metodlarının kalibre edilmesi ve sertifikasyon işlemlerini yürütmektedir. Günümüzde 113 tane metod ve 109 tane laboratuvar sertifikasyon almıştır. Sertifikasyon kapsamında bir yıl içinde 40 örnek karşılaştırılmakta ve sertifikasyon 1 yıl için verilmektedir. Metod sertifikasyonu için kabul edilebilir bias 1999 yılında \pm %1.0 iken 2011 yılında \pm %0.75'e

çekilmiştir. NGSP, ayrıca CAP ile birlikte yeterlilik testleri (proficiency testing) çalışması yürütmektedir. Üç yüzden fazla laboratuvarın katıldığı testlerde metod performansları için kabul edilebilir limitler tanımlıdır. Kabul edilebilir bias 2007 yılında \pm %15 iken 2011 yılında \pm %7'ye düşürülmüştür. Başarı oranı 2010 yılında %95'dir ve laboratuvarlararası CV %4.5'ün altında bulunmuştur. Kabul edilebilir limitlerin giderek daraltılmasıyla üretici firmalar daha duyarlı ölçüm yöntemleri geliştirmeye teşvik edilmektedirler.

Glukoz, GFR, PSA ve HbA1c gibi yöntemden bağımsız olarak, spesifik eşik değeri ile yorumlanan testler için sonuçlar karşılaştırılabilir olmalıdır. Avrupa Parlamentosu direktiflerinde de referans materyal ve referans yöntemler oluşturulması ve sonuçların izlenebilirliğinin önemi vurgulanmıştır. Bu amaçla IFCC, HbA1c'ye spesifik olan ve pür standartlar kullanan bir referans metod geliştirmiş ve 2001 yılında kabul edilmiştir (7). İnsan kanından pür HbA1c ve HbA0 izole edilerek primer referans materyal oluşturulmuş, referans metodun primer kalibrasyonunda kullanılmıştır. Referans metod, endoproteinaz Glu-C enzimi ile inkübasyon ve zincirin N-terminal heksapeptidlerinin elde edilmesi, glike ve nonglike heksapeptidlerin ayrımı (HPLC), ve kantitasyon (MS veya CE) şeklinde özetlenebilir. Katılan 11 laboratuvarında kantitasyon kütle spektrometri veya kapiller elektroforez yöntemleri ile yapılmaktadır. Oluşturulan Sekonder Referans Materyal üretici metodlarının kalibrasyonunda kullanılmaktadır. Bu metotta HbA1c ve HbA (mmol/mol) düzeylerinin oranlanması ile sonuç verilmektedir.

IFCC ayrıca ulusal yöntemlerin karşılaştırma çalışmalarını yürütmektedir. NGSP ve IFCC metodları arasında yapılan yedi yıl süren karşılaştırmalarda iki yöntemin korelasyonunun başarılı olduğu ancak birimler arasında farklılık olduğu gözlenerek sonuçların dönüştürülmesinde kullanılacak "master eşitlik" saptanmıştır (NGSP: (0.09148 * IFCC) + 2.152).

IFCC yönteminde sadece HbA1c ölçülmekte, NGSP yönteminde ise yaklaşık %2 civarında nonHbA1c glike fraksiyon da elüe olmaktadır. Bu fraksiyonların da diyabet komplikasyonlarının gelişiminde katkısı olup olmadığının bilinmemesi nedeniyle, ayrıca hastaların glisemik kontrolünün bozulmaması için eşitlikte kullanılan sabit bir faktörle IFCC sonuçları yükseltilmiştir (8).

Milano'da 2007 yılında IFCC ve diyabet cemiyetlerinin katılımıyla dünya çapında HbA1c sonuçlarının standardizasyonu için yapılan toplantıda alınan kararlar yayımlanmış ve 2010'da güncellenmiştir (9). Bu kararlara göre:

1. HbA1c ölçümlerinin dünya çapında standardize edilmesi, geçerli referans yöntem olarak IFCC yönteminin kullanılması,
2. IFCC ve NGSP sonuçlarının birlikte rapor edilmesi ve birimlerin birbirine dönüşüm tablolarının ulaşılabilir olması,
3. Dergi editörlerince her iki birimi birlikte belirten makalelerin tercih edilmesi ve
4. Rapor edilen terimin HbA1c olması önerilmiştir.

HbA1c için "Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine" (JCTLM) veritabanında kabul edilmiş 3 tane referans yöntem bulunmaktadır (10). Bunlar NGSP-HPLC yöntemi, IFCC-MS/CE yöntemi ve Instand'ın geliştirdiği LC-ID-MS yöntemidir (11). Ayrıca JCTLM veritabanında HbA1c standardizasyonu için kabul edilen, Avrupa Birliği için hemolizat ve Japonya için tampon içinde hazırlanmış olmak üzere iki tane referans materyal vardır.

Kronik glisemik kontrolün glike hemoglobin oranı şeklinde verilmesinin, mg/dL birimli akut glukoz düzeyleriyle karşılaştırılmasının hastalar açısından zor olması ve kafa karışıklığı yaratabileceği nedeniyle HbA1c sonuçlarının "tahmini ortalama glukoz" (eAG) şeklinde rapor edilmesinin bu karışıklığı ortadan kaldıracabileceği düşünülmüştür (12). Bu amaçla planlanan çok merkezli ve uluslararası bir

çalışmada (A1C Derived Average Glucose, ADAG) üç aylık sürekli glukoz takibi ile HbA1c ölçümlerinin arasında yaş, cinsiyet, ırk diyabet tipi ve sigara içiminden etkilenmeyen kuvvetli bir ilişki bulunmuş ve çevrim faktörleri saptanmıştır. ADA ve AACC laboratuvarların HbA1c sonuçları ile birlikte eAG sonuçlarının da vermesini önermektedir. Günlük ve uzun dönemli glukoz kontrollerinin değerlendirilmesinde aynı birimlerin kullanılması hastaların sonuçları daha kolay anlamalarını sağlayacak ve diyabet yönetimini iyileştirecektir. Ancak gebelerde, adölesanlarda, böbrek hastalarında ve hemoglobinopatisi olan kişilerde daha ileri çalışmaların yapılması gereklidir. Eritrosit ömründeki değişikliklerle ilişkili bu tip durumlarda glikozile albumin kullanılmasının daha uygun olacağı öne sürülmektedir. İnternet ortamında ulusal HbA1c ölçüm yöntemlerinin, ayrıca eAG sonuçlarının birbirlerine dönüştürülebileceği çevrim tablolarına ulaşmak mümkündür. Ayrıca birçok ülkede klinisyenlere ve hastalara yeni birimlere uyum sağlamaları için eğitim çalışmaları yapılmaktadır (13). AACC,

1. A1C sonuçları ile beraber eAG sonucu verilmesi,
2. Sadece eAG raporlanması için yeterli veri olmadığı,
3. Gebe, çocuk, adölesan ve farklı etnik gruplar için ek çalışmalar yapılması,
4. Anemi ve hemoglobinopatilerde çalışılması,
5. ADA ve diğer grupların global harmonizasyon ve eğitim için çalışması yapılması gerektiğini önermektedir.

Amerikan Diyabet Cemiyeti, glisemik kontrolü stabil olan kişilerde yılda en az iki kez, stabil olmayan hastalarda ise dört kez HbA1c ölçümü yapılmasını ve hasta başı testlerin tanıda değil tedavi değişikliklerinin izleminde kullanılmasını önermektedir. Mikrovasküler hastalıkların önlenmesi için gebe olmayan erişkinlerde diyabet tanı kriteri ≤ 6.5 ve HbA1c hedefi < 7 olarak belirlen-

miştir. Ayrıca ADA ve diğer birçok diyabet cemiyeti, %7,5 ve üzerindeki sonuçlarda insülin tedavisine geçilmesini önermektedir. Tanı ve tedavi kriterlerinin birbirlerine bu kadar yakın olması nedeniyle laboratuvarların HbA1c sonuçlarını verirken %0,5'lik bir ayırımın klinik olarak anlamlı olduğunu, analitik hatadan kaynaklanmadığını söyleyebilmeleri gerekir (14,15). HbA1c testinin biyolojik değişkenliği %1'in altındadır, referans değişim değeri hesaplarına göre, hastanın iki ölçümünün arasındaki %0,5'lik bir farkın klinik olarak anlamlı olduğunu söyleyebilmemiz için analitik hatanın %2'nin altında olması gereklidir. CAP çalışmasının verilerine göre günümüzde duyarlılığı en yüksek olan HPLC yöntemleridir ancak çalışmaya katılan laboratuvarların %80'i bu düzeyde analitik değişkenliği yakalayabilmektedir. Bu nedenlerle, laboratuvarların kendi analitik değişkenliklerini ve referans değişim değerlerini hesaplayarak klinisyenleri bilgilendirmeleri gereklidir.

Uluslararası uzman komite raporunda HbA1c ölçümünün glukoz ölçümüne göre avantajları belirtilmiştir (16) (Tablo 2).

Tablo 2. HbA1c ölçümünün glukoz ölçümüne göre avantajları.

| |
|--------------------------------------------------------------------------------------|
| HbA1c ölçüm yöntemi glukoz ölçümünden daha iyi standardize edilmiş |
| Toplam glisemik maruziyet ile uzun dönem komplikasyon riski arasındaki ilişki yüksek |
| Biyolojik değişkenlik az |
| Açlık veya zamanlı örneğe gerek yok |
| Preanalitik dayanıklılık iyi |
| Glukoz düzeylerinin anlık değişimlerinden etkilenmez |
| Tanı ve tedavi düzenleme rehberleri var |

"National Academy of Clinical Biochemistry"nin yayımladığı, 2011 yılında güncellenen diyabet yönergesinde,

1. Laboratuvarların NGSP sertifikeli ve IFCC ile izlenebilirliği olan yöntemleri kullanması,

2. Alt referans limitlerin altındaki ve %15'in üzerindeki HbA1c sonuçlarının tekrar çalışılması,
3. Laboratuvarların testin interferanslarından haberdar olması
4. Laboratuvarların CAP gibi bir yeterlilik programına katılmaları
5. HbA1c sonuçları tanıda kullanılacaksa serifiye yöntemle ve akredite bir laboratuvarda çalışılması gerektiği bildirilmiştir (17).

Standardizasyon çalışmalarının başlamasından günümüze HbA1c ölçüm yöntemlerindeki çeşitlilik ve sonuçların değişkenlikleri önemli ölçüde azalmasına rağmen, farklı ülkelerde NGSP ya da IFCC yöntemlerinin uygulanması ve sonuçların raporlanması arasında henüz farklılıklar bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde NGSP ve eAG sonuçları verilmektedir. Avrupa'da birçok ülke ile birlikte Kanada ve Avustralya'da IFCC ve NGSP sonuçları birlikte raporlanmakta ve iki yıldan sonra sadece IFCC sonuçlarının verileceği belirtilmektedir. IFCC yönteminde nondiyabetik referans aralık 20-42 mmol/mol, tedavi hedefi ise 53 mmol/mol olarak belirlenmiştir (8).

Sonuç olarak günümüzde de HbA1c ölçümünde kullanılan farklı yöntemler vardır, ancak üretici firmaların büyük bir kısmı NGSP tarafından sertifikasyon almaktadır, ve sonuçlar IFCC sonuçları ile uyumludur. Diyabet tanı ve tedavisinde kritik karar limitleri bulunan ve hasta tedavisini büyük oranda etkileyen HbA1c testi farklı laboratuvarlarda farklı yöntemlerle çalışılsa da, analitik performansı, doğru ölçülmesi ve sonuçların diğer yöntemlerle karşılaştırılabilir olması önemlidir.

KAYNAKLAR

1. Herman WH, Fajans SS. Hemoglobin A1c for the diagnosis of diabetes: practical considerations. *Pol Arch Med Wewn* 2010; 120(1-2): 37-40.
2. Saudek CD, Brick JC. The clinical use of hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3(4): 629-34.
3. Weykamp C, John WG, Mosca A. A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3(3): 439-45.
4. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB; National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) Steering Committee. Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem* 2011; 57(2): 205-14.
5. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care* 2010; 33 (Suppl 1): 11-61.
6. Marshall SM. Standardization of HbA1c: good or bad? *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6(7): 408-11.
7. Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO, et al. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: a 6-year progress report. *Clin Chem* 2008; 54(2): 240-8.
8. Braga F, Dolci A, Montagnana M, Pagani F, Paleari R, Guidi GC, et al. Reevaluation of biological variation of glycated hemoglobin (HbA(1c)) using an accurately designed protocol and an assay traceable to the IFCC reference system. *Clin Chim Acta* 2011; 412(15-16): 1412-6.
9. Hanas R, John G. 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A(1c) measurement. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 90(2): 228-30.
10. Armbruster D, Miller RR. The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): a global approach to promote the standardisation of clinical laboratory test results. *Clin Biochem Rev* 2007; 28(3): 105-13.
11. Kaiser P, Akerboom T, Ohlendorf R, Reinauer H. Liquid chromatography-isotope dilution-mass spectrometry as a new basis for the reference measurement procedure for hemoglobin A1c determination. *Clin Chem* 2010; 56(5): 750-4.
12. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ. A1c-Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1c assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008; 31(8): 1473-8.
13. John WG, Mosca A, Weykamp C, Goodall I. HbA1c standardisation: history, science and politics. *Clin Biochem Rev* 2007; 28(4): 163-8.
14. Little RR, Rohlfing CL. Analytical goals for HbA1c: are HbA1c results good enough for optimal use? *J Diabetes* 2011; 3(1): 3-6.
15. Weykamp CW, Mosca A, Gillery P, Panteghini M. The analytical goals for hemoglobin A(1c) measurement in IFCC units and National Glycohemoglobin Standardization Program Units are different. *Clin Chem* 2011; 57(8): 1204-6.

Uysal S.

16. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-34.
17. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011; 57(6): 793-8.

Yazışma adresi:

Dr. Sezer Uysal
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir
E-posta: sezer.uysal@deu.edu.tr
Tel : 0 232 412 22 22
