



Přehled metod a principů stanovení HbA_{1c} (redakční příspěvek)



Tento příspěvek poskytuje stručný přehled různých metod měření HbA_{1c}. Obecně existují dvě hlavní kategorie metod. První zahrnuje metody, které jsou založeny na rozdílu v náboji molekul, jako jsou kationtoměničová vysoce účinná kapalinová chromatografie (CE-HPLC) a kapilární elektroforéza. Druhá kategorie se skládá z metod založených na strukturálních rozdílech, jako jsou afinitní vysokoučinná kapalinová chromatografie (afinitní-HPLC) a imunochemické testy. Jedním ze základních rozdílů mezi typy je, že u metod založených na rozdílech nábojů je nutné kvůli správnému výpočtu HbA_{1c} vyloučit všechny nefyziologické formy, zatímco u metod založených na strukturálních rozdílech tomu tak není. K tomu musí být metody jako CE-HPLC schopny identifikovat všechny přítomné varianty Hb a jejich glykované formy, což může být problematické vzhledem k tomu, že všechny molekuly se stejným elektrickým nábojem budou eluovány ve stejném retenčním čase.¹ To může ovlivnit specifitu testu a právě tento potenciální nedostatek specifity brání přijetí CE-HPLC jako referenční metody pro systém IFCC a podnítl vývoj alternativních metod.²

Přehled principů stanovení HbA_{1c}

HbA _{1c} metody	
Rozdílný náboj	Strukturální rozdíly
<p>pozitivní náboj negativní náboj</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Vysoce výkonná kapalinová chromatografie na katexu (CE-HPLC) • Kapilární elektroforéza (CE) 	<ul style="list-style-type: none"> • Imunochemické testy • Enzymatické testy • Afinitní HPLC • Latexové testy

Referenční metoda

Pracovní skupina IFCC pro standardizaci HbA_{1c} se chopila vývoje referenční metody, která do té doby chyběla. Ta v prvním kroku štěpí hemoglobin na peptidy pomocí enzymu endoproteinázy Glu-C a ve druhém kroku se oddělené neglykované N-terminální hexapeptidy získaného řetězce rozdělí a kvantifikují pomocí HPLC a elektrospojové ionizační hmotnostní spektrometrie nebo dvourozměrným postupem, využívajícím HPLC a kapilární elektroforézu s UV detekcí [nejdříve provede HPLC (1. separační krok), dále separaci jednotlivých eluátů pomocí kapilární elektroforézy (CE, 2. krok separace), následovanou spektrofotometrickou detekcí při 214 nm, tj. kombinace HPLC-CE]. Oba principy poskytují shodné výsledky. HbA_{1c} se měří jako poměr mezi glykovanými a neglykovanými hexapeptidy. Používají se kalibrátory sestávající ze směsí vysoce purifikovaného HbA_{1c} a HbA₀. Analytické parametry referenční metody byly hodnoceny mezinárodní sítí referenčních laboratoří, zahrnující laboratoře z Evropy, Japonska a USA. Interkomparační studie sítě ukázaly vynikající výsledky s intralaboratorními CV v rozmezí 0,5 až 2 % a mezilaboratorními CV 1,4 až 2,3 %. Možné interference byly pečlivě prozkoumány. Kvůli vyšší specifitě referenční metody jsou výsledky nižší než ty, které jsou generovány většinou současných komerčních metod, včetně nejčastěji používaných imunochemických a HPLC metod. Popsaná referenční metoda byla schválena členskými společnostmi Mezinárodní federace klinické chemie a laboratorní medicíny a položila základ pro budoucí jednotné standardizace rutinních testů HbA_{1c} po celém světě.³

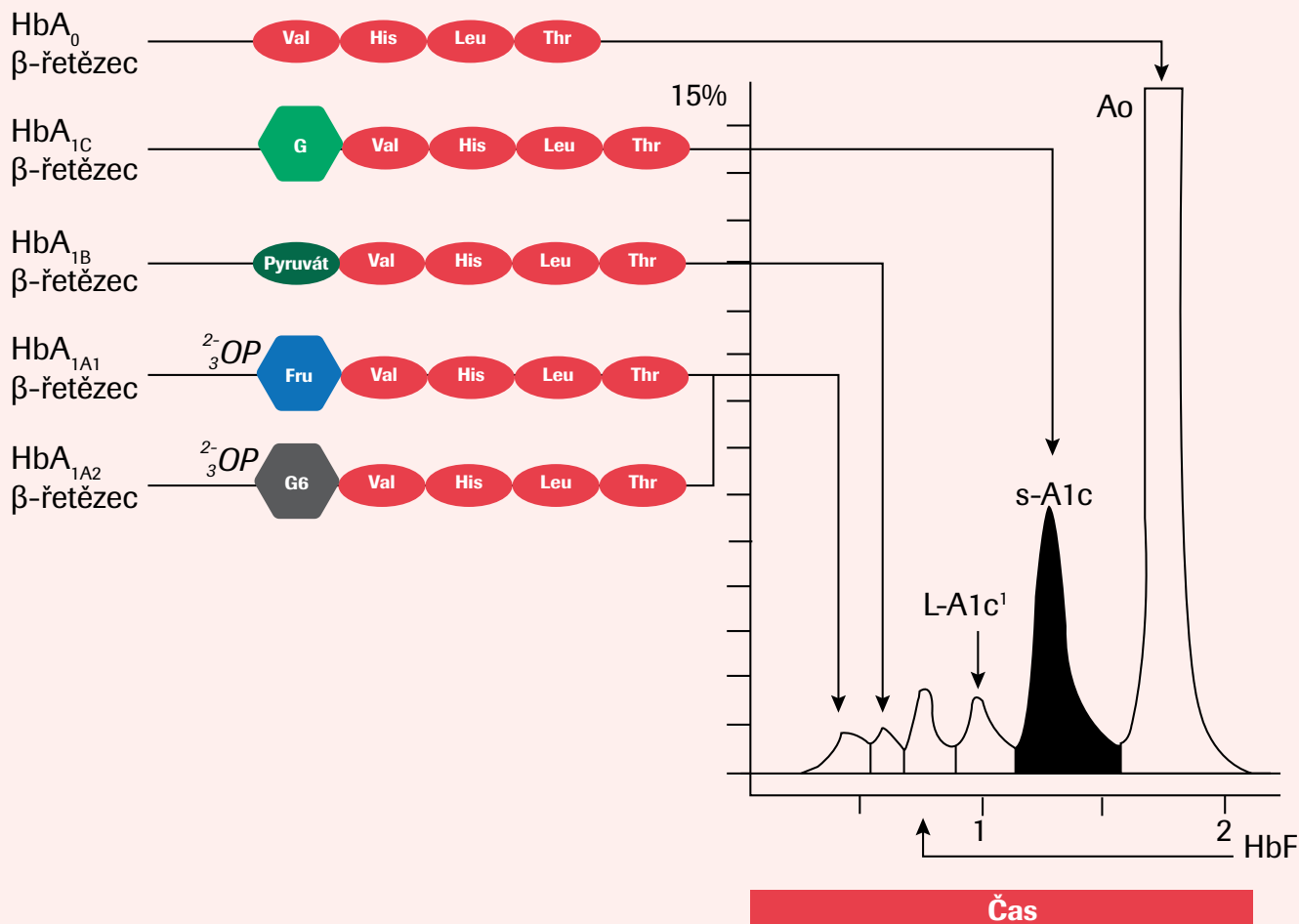
Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je metoda založená na náboji, která byla nedávno přizpůsobena testování HbA_{1c}. Hemoglobinové frakce se separují v křemíkových kapilárách při vysokém napětí na základě jejich elektroforetické pohyblivosti a elektroosmotického toku.⁴ Frakce hemoglobinu se detekují spektrofotometricky.



CE-HPLC

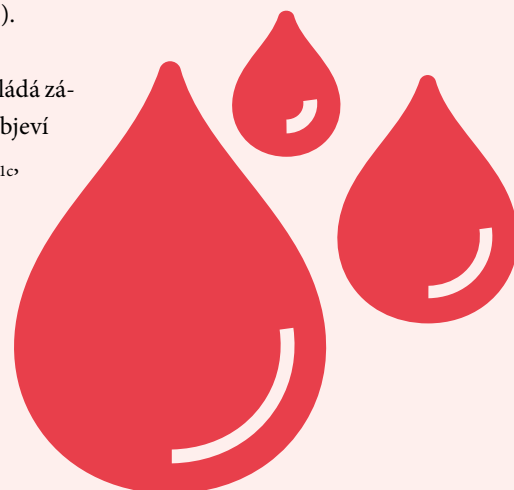
Fyziologické Hb varianty v HPLC na katexu. Čím kladněji je molekula nabitá, tím delší je retenční čas.



Stanovení HbA_{1c} iontoměničovou chromatografií je založeno na separaci elektrickým nábojem. Za fyziologických podmínek je volná aminoskupina v terminálním valinu β-řetězce kladně nabitá. Tento kladný náboj je ztracen v důsledku glykace, ale také v důsledku dalších úprav. Metody založené na elektrickém náboji (iontoměničová chromatografie a kapilární elektroforéza) proto mohou potenciálně podléhat interferenci dalších modifikací (např. karbamylace, acetylce, varianty atd.).

Chromatografie na katexu zpožďuje kladně nabitě kationty, protože stacionární fáze předkládá záporně nabitou funkční skupinu. Všechny látky se stejným nebo podobným nábojem se objeví pod stejným vrcholem, což znamená, že varianty hemoglobinu, které migrují buď s HbA_{1c}, nebo HbA₀, mohou způsobit podhodnocení nebo nadhodnocení HbA_{1c}.⁵ Schopnost detekovat – „vidět“ – varianty u HPLC není spolehlivá, protože mnoho látek migruje se stejným elučním vrcholem.⁶

Obrázek ukazuje retenční čas pro různé fyziologické varianty Hb, čím pozitivnější je molekula, tím déle zůstává ve sloupci.

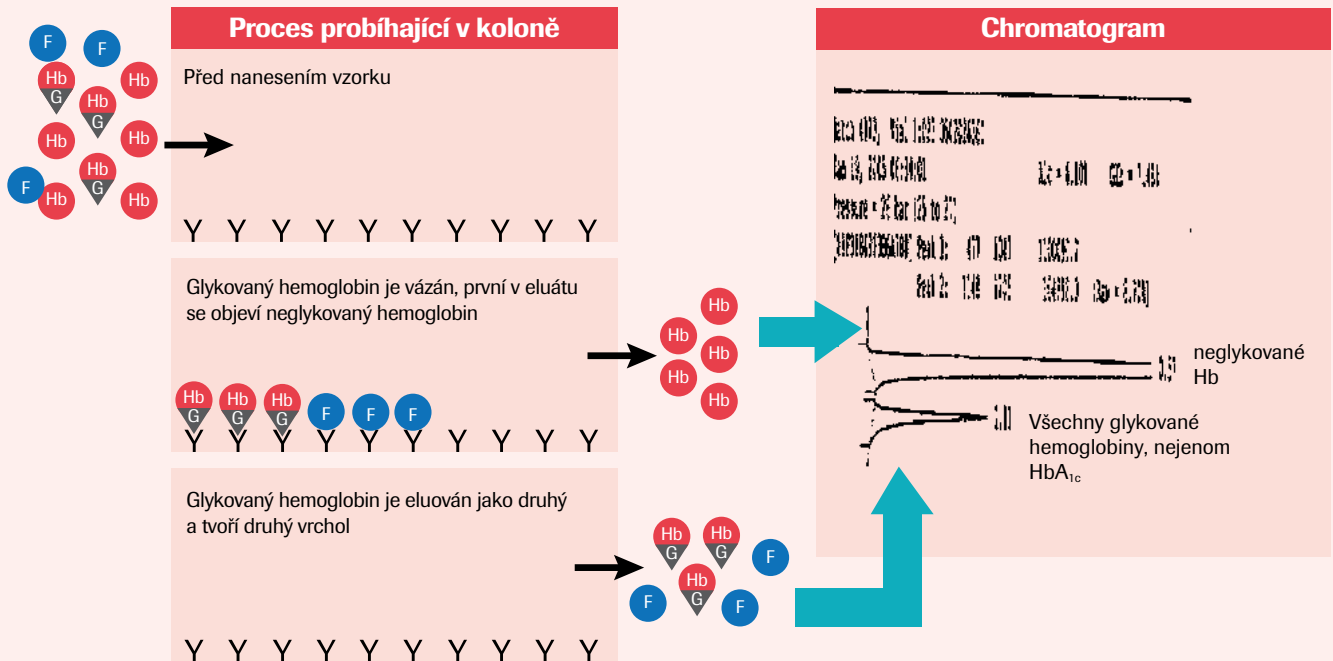




Afinitní HPLC

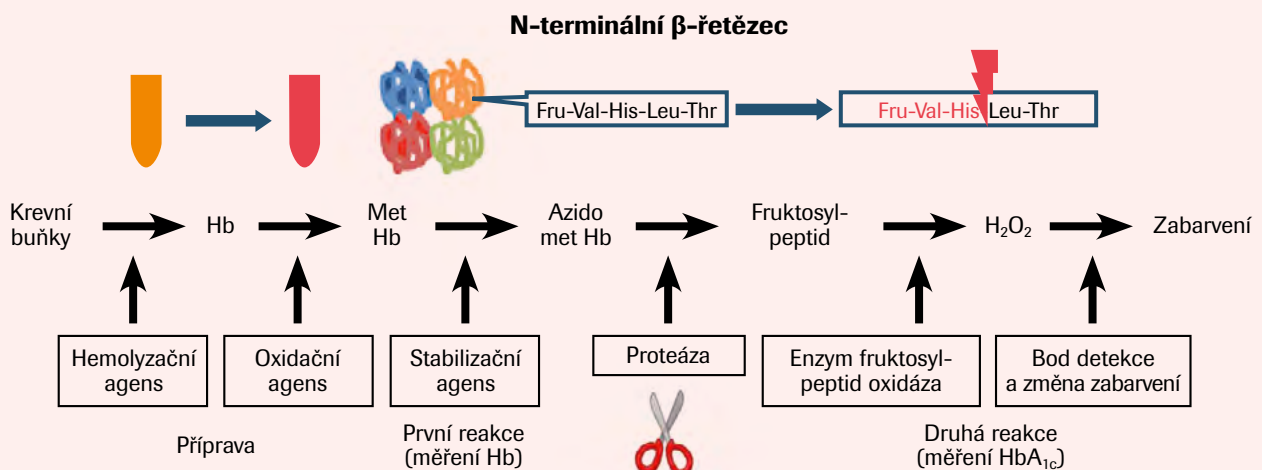
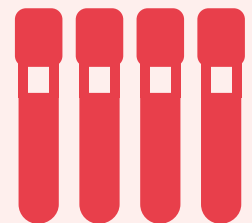
Afinitní chromatografie odděluje molekuly na základě jejich chemické struktury. Pro měření glykovaného hemoglobinu se používají komerčně dostupné afinitní kolony, které obsahují imobilizovanou kyselinu fenylboritou.⁷ Kyselina boritá reaguje s cis-diolovými skupinami v sacharidových zbytcích GHb (viz obrázek), které zahrnují skupiny ε-aminolysinu.

Afinitní HPLC detekuje celkový glykovaný hemoglobin, ze kterého se HbA_{1c} vypočítává.⁷



Enzymatické

Enzymatické metody jsou založeny na enzymatické kvantifikaci fruktosyldipeptidů pomocí fruktosylpeptidoxidázy. Plná krev je hemolyzována a hemoglobin je přeměněn na methemoglobin. Proteináza uvolňuje N-koncové fruktosyldipeptidy z β-řetězce. Methemoglobin je spektrofotometricky kvantifikován pro výpočet celkového hemoglobinu. Fruktosylpeptidoxidáza odštěpí fruktosyldipeptidy, které vedou k produkci peroxidu vodíku. Peroxid vodíku v kombinaci se substrátem a peroxidázou vytváří specifickou barvu, která je kvantifikována spektrofotometricky a je úměrná koncentraci HbA_{1c}.⁸





Jak je stanoven HbA_{1c} testy na bázi latexových částic?

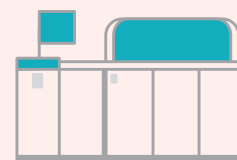
Testy na základě latexových částic lze provádět na velkých automatizovaných systémech nebo na zařízeních POC (Point-of-Care). U zařízení POC je možné použít jak kapilární krev z odběru z prstu, tak venózní krev, nanesenou přímo do reakční komory.

Jak se stanoví HbA_{1c} imunochemickými metodami?

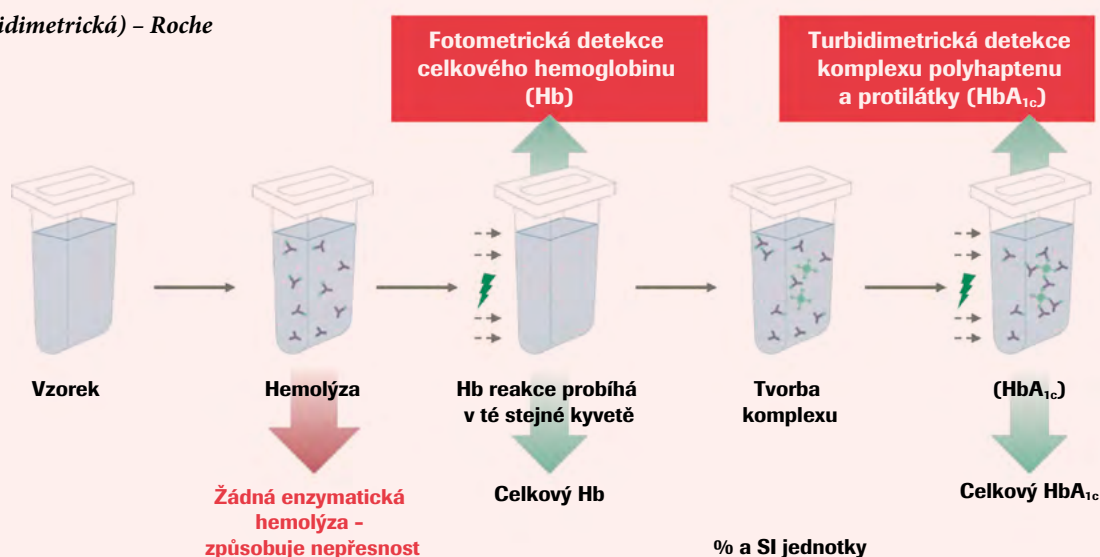
Imunochemické metody umožňují specifické a automatické stanovení HbA_{1c} na rutinních analyzátoch klinické chemie a POC zařízeních. Používají protilátky, které jsou namířeny proti aminoterminální peptidové sekvenci β-řetězce s jeho glykovanou valinovou skupinou. IFCC definuje HbA_{1c} jako βN1-deoxyfruktosyl hemoglobin.⁹ Existuje řada komerčních imunotestů. Všechny jsou navrženy pro specifické stanovení HbA_{1c}, ale mohou se lišit v počtu aminokyselin, které protilátka rozpoznává (obvykle 4–10 aminokyselin).

Roche gen. 3

Stanovení Tina-quant Hemoglobin A1c Gen. 3 je založeno na turbidimetrické inhibiční imunoanalýze (TINIA) pro hemolyzovanou plnou krev. GHb (HbA_{1c}) ve vzorku pacienta reaguje s anti-HbA_{1c} protilátkou za vzniku rozpustných komplexů antigen-protilátka. Protože místo pro vazbu specifické protilátky (epitop) je na molekule HbA_{1c} přítomno pouze jednou, nedochází k tvorbě nerozpustných komplexů. Polyhapteny (více epitopů) přidané v dalším stupni reagují s přebytečnými anti-HbA_{1c} protilátkami za vzniku nerozpustného komplexu protilátka-polyhapten, který lze stanovit turbidimetricky. Uvolněný hemoglobin v hemolyzovaném vzorku se stanoví spektrofotometricky.¹⁰ Metodu lze použít na analyzátoch COBAS INTEGRA 400 plus, **cobas c 111**, **cobas c 311**, **cobas c 501**, **cobas c 502**. Systémy **cobas c 501/502** disponují speciální sušicí stanicí pro vzorkovou jehlu zajišťující bezpečné pipetování plné krve v rámci stanovení HbA_{1c}. U analyzátorů **cobas c 513** (speciální pro stanovení pouze HbA_{1c} s kapacitou 400 vzorků/hod.) a **cobas c 503** je přítomná **speciální vzorková jehla pro plnou krev**.



Imunoanalýza (turbidimetrická) – Roche



LITERATURA

1. NGSP. HbA_{1c} methods. Updated July 2013. Available at: <http://www.ngsp.org/interf.asp> (accessed October 2013).
2. Rohlfing, C.L., et al. *Am J Clin Pathol* 129, 811-814.
3. Jeppsson, J-O. et al. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(1):78-89.
4. <http://www.sebia.com/en-EN/produits/capillarys-hb-a1c> Accessed October 24, 2017.
5. Bry L. *Clinical Chemistry* 2001;47:153-163.
6. Szuberski J, Oliveira J, Hoyer J. *International Journal of Laboratory Hematology* 2013;34:594-604.
7. <http://www.trinitybiotech.com/haemoglobins/boronate-affinity-chromatography>. Accessed October 20, 2017.
8. Jaisson S, Desmons A, Renard B, et al. *Clinica Chimica Acta* 2014; 434:48-52.
9. Topic E. *Biochimica Medica* 2014; 24(Suppl 1):S1-S78.
10. Roche Diagnostics Method Sheet/Package Insert (English).



Pokrokové přístrojové vybavení ROCHE: stanovení HbA_{1c} – laboratorní i POCT

cobas c 503

Vynikající výkon a snadné ovládání. Nová analytická jednotka **cobas c 503** nabízí vše, co potřebujete pro vytvoření nových standardů v oblasti spolehlivosti, údržby a efektivity.

- >200 aplikací klinické chemie včetně HbA_{1c} měření z plné krve či hemolyzátu a pipetování speciální vzorkovou jehlou
- Fotometrická technologie s kapacitou až 1000 testů za hodinu
- SonicWash, stanovení sérových indexů, detekce sraženin
- Bezkontaktní ultrazvukové míchání
- 60 pozic pro reagentie **cobas c pack green** s automatizovanou správou, tj. načítání a automatické vykládání kazet s činidly během provozu a pohotovostního režimu



cobas b 101

cobas b 101 je diagnostický systém in vitro navržený ke kvantitativnímu stanovení % HbA_{1c} (DCCT / NGSP) a mmol/mol HbA_{1c} (IFCC) v lidské kapilární a venózní plné krvi fotometrickým měřením. Odhadovaná průměrná hladina glukózy je vypočítána systémem **cobas b 101**. Systém je určen pro profesionální použití v prostředí klinické laboratoře nebo v místě péče o pacienta.

