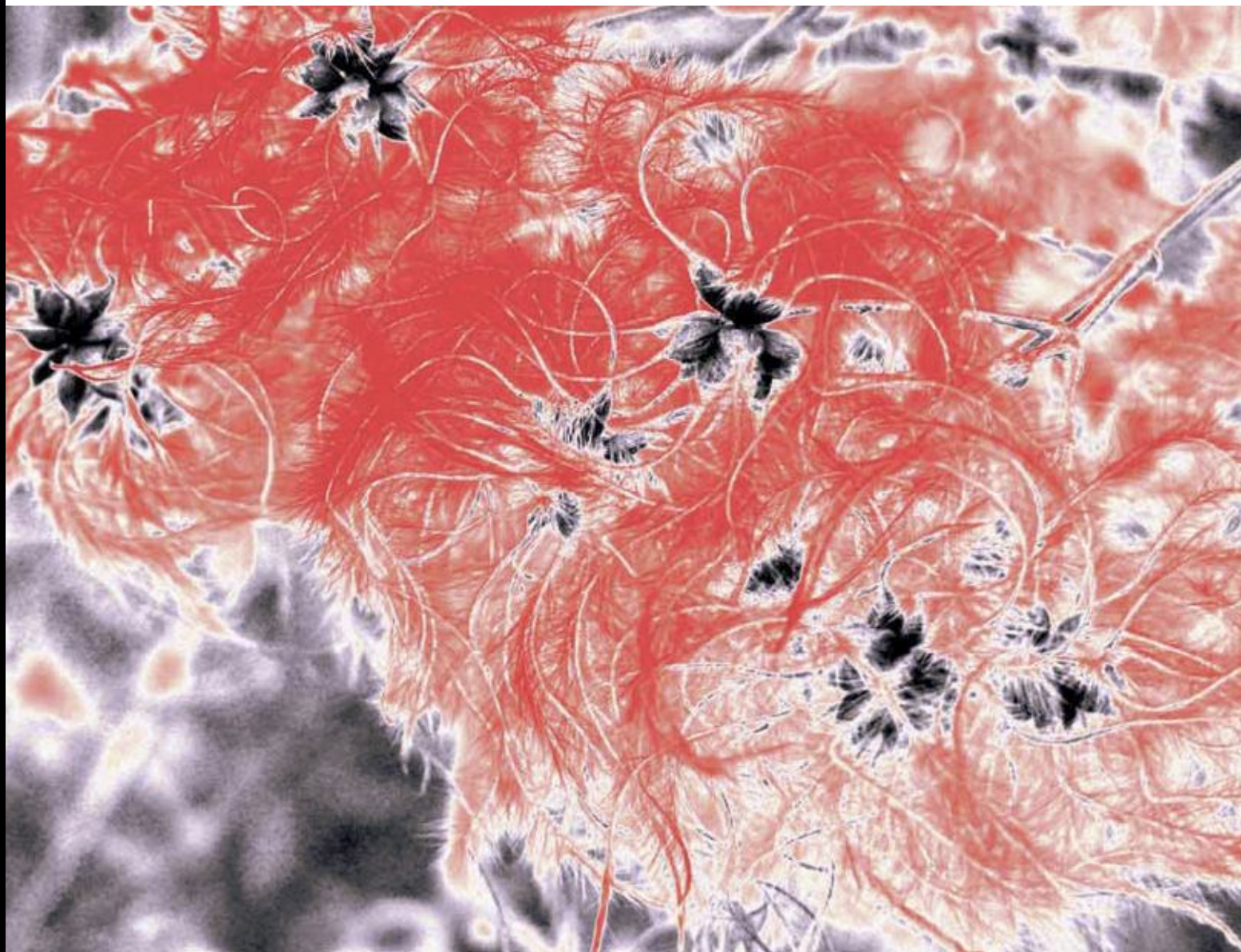




- Rola badań laboratoryjnych we wczesnym rozpoznawaniu cukrzycowej choroby nerek
- Znaczenie badania cytologicznego płynu mózgowo-rdzeniowego w diagnostyce różnicowej neuroinfekcji – „teraźniejszość i przyszłość”
- Oznaczanie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) – jak, kiedy i po co?
- Ocena w pełni zautomatyzowanego analizatora Capillarys 2 Flex Piercing do oznaczania HbA1c metodą elektroforezy kapilarnej
- Euromedlab Milano 2013

HbA1c

Pomiar hemoglobiny glikowanej metodą elektroforezy kapilarnej



szybki
i precyzyjny
rozdziół

sebia

Formuła liczenia zgodna z zaleceniami IFCC
$$\text{HbA1c} = \frac{\text{HbA1c}}{\text{HbA1c} + \text{HbA0}}$$

wyłącznym dystrybutorem firmy **SEBIA** w Polsce jest

HORIBA
Medical

SPIS TREŚCI

- 3** Rola badań laboratoryjnych we wczesnym rozpoznawaniu cukrzycowej choroby nerek
The role of laboratory tests in early diagnosis of diabetic nephropathy
Tomasz Zaborowski Piotr Raszczepkin

- 8** Znaczenie badania cytologicznego płynu mózgowo-rdzeniowego w diagnostyce różnicowej neuroinfekcji – „teraźniejszość i przyszłość”
Significance of cytological examination of cerebrospinal fluid in the differential diagnosis of neuroinfections – „present and future”
Maria Mantur, Iwona Sidorkiewicz

- 13** Oznaczanie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) – jak, kiedy i po co?
Glycated hemoglobin (HbA1c) testing – how, when and what for?
Bogdan Solnica

- 25** Ocena w pełni zautomatyzowanego analizatora Capillars 2 Flex Piercing do oznaczania HbA1c metodą elektroforezy kapilarnej
Evaluation of fully automated analyzer Capillars 2 Flex Piercing to measure HbA1c using capillary electrophoresis
Anna Rodziewicz-Lurzyńska, Dagna Bobilewicz

- 33** Euromedlab Milano 2013

- 34** Pytania testowe

- 35** Warto wiedzieć

Wydawca IN VITRO EXPLORER

HORIBA ABX Sp. z o.o.

Wał Miedzeszyński 598, 03-994 Warszawa

+48 22 673 20 22, +48 22 673 20 26

www.horiba-abx.com.pl

Redaktor koordynujący: Justyna Głowienka-Korzeń

Konsultacja naukowa: prof. dr hab. n.med. Dagna M. Bobilewicz

Redakcja: Firma TEKSTY

Projekt graficzny: Aleksandra Król

Skład i łamanie: Zych Studio

ISSN 1732-9752

Nakład: 3000 egz.

wrzesień 2013

Zasady publikowania prac w IN VITRO EXPLORER

do wglądu u p. Renaty Polkowskiej

e-mail: renata.polkowska@horiba.com

ROLA BADAŃ LABORATORYJNYCH WE WCZESNYM ROZPOZNAWANIU CUKRZYCOWEJ CHOROBY NEREK

THE ROLE OF LABORATORY TESTS IN EARLY DIAGNOSIS OF DIABETIC NEPHROPATHY

Tomasz Zaborowski Piotr Raszczepkin

Streszczenie

Pomimo szeroko rozpowszechnionego leczenia nefroprotekcijnego cukrzycowa choroba nerek pozostaje główną przyczyną schyłkowej niewydolności nerek. Identyfikacja pacjentów w jak najwcześniejszym stadium choroby istotnie wpływa na skuteczność podjętych interwencji terapeutycznych. Klasyczny model rozwoju cukrzycowej choroby nerek opiera się na założeniu, że albuminuria poprzedza wystąpienie jawnego białkomoczu, który z kolei przyczynia się do obniżenia filtracji kłębuszkowej, a w konsekwencji do niewydolności nerek. W świetle nowych badań albuminuria okazuje się być objawem dynamicznym, który częściej ulega wycofaniu niż progresji do jawnego białkomoczu. Jednocześnie uważa się, że w grupie pacjentów z rozpoznaną albuminurią doszło już do zapoczątkowania procesu obniżania filtracji kłębuszkowej, a zjawisko to znacznie wyprzedza występowanie jawnego białkomoczu. Dlatego też oznaczenie albuminy wydalonej z moczem, chociaż jest obecnie podstawowym sposobem oceny funkcji nerek u pacjentów z cukrzycą, nie jest badaniem pozbawionym wad. Niniejsza praca stanowi przegląd badań dotyczących oznaczeń diagnostycznych przydatnych w rozpoznawaniu i ocenie przebiegu cukrzycowej choroby nerek.

Słowa kluczowe

Cukrzycowa choroba nerek, albuminuria, markery nefropatii cukrzycowej.

Summary

Although nephroprotective treatment is very common in patients with diabetes mellitus, diabetic nephropathy still remains the leading cause of renal failure. The sooner a diagnosis of nephropathy is established, the more efficient types of treatment procedures may be implemented. The classic pattern of diabetic nephropathy development assumes that albuminuria may progress to overt proteinuria and then lead to glomerular filtration rate decrease. However, recent studies show that many patients with albuminuria do not progress to overt proteinuria, but regress to normoalbuminuria instead. At the same time, decrease in glomerular filtration rate begins long before overt proteinuria becomes present. Because of that, although the albuminuria test is still a key diagnostic for diabetic nephropathy, it is not entirely reliable. This article constitutes a review of studies that have been carried out in order to assess the usefulness of early diabetic nephropathy markers.

Key words

Diabetic kidney disease, albuminuria, early markers of diabetic nephropathy.

Cukrzycowa choroba nerek, do niedawna określana mianem nefropatii cukrzycowej, należy do późnych powikłań cukrzycy. Choroba rozwija się u 20–40% chorych na cukrzycę i jest obecnie najczęstszą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek, wymagającej leczenia nerkozastępczego. Udowodniono, że leczenie nefroprotekcyjne w istotnym stopniu

hamuje postęp choroby, jednocześnie jest tym skuteczniejsze, im wcześniej zostanie wprowadzone. Z tego powodu badania przesiewowe w kierunku obecności cech nefropatii cukrzycowej powinny być wykonywane regularnie. Polskie Towarzystwo Diabetologiczne zaleca tego typu ocenę raz do roku. W przypadku osób z cukrzycą typu 2 badania należy rozpocząć

od momentu rozpoznania, a u osób z cukrzycą typu 1 – od 5. roku trwania choroby. Ocena prawidłowej funkcji nerek powinna być oparta na określeniu ilości albuminy wydalananej z moczem, stężenia kreatyniny w surowicy krwi oraz szacowanej wartości przesączania kłębuszkowego (ang. *estimated glomerular filtration rate*, eGFR). Oznaczenia te powinny zostać poprzedzone badaniem ogólnym moczu w celu wykluczenia jawnego białkomoczu, obecność którego czyni oznaczenie albuminurii bezcelowym.

Badaniem przesiewowym w kierunku cukrzycowej choroby nerek jest półilościowe oznaczenie stężenia albuminy w jednej próbce moczu za pomocą immunochemicznych testów paskowych (za wynik dodatni przyjmuje się stężenie albuminy w moczu $> 20 \text{ mg/l}$). Po uzyskaniu dodatniego wyniku testu przesiewowego należy ocenić wydalanie albuminy (ang. *albumin excretion rate*, AER) na podstawie ilościowego oznaczenia bądź w dobowej zbiórce moczu (za wynik dodatni przyjmuje się wydalanie albuminy $> 20 \mu\text{g/min}$) lub też w porcji moczu, w której obok stężenia albuminy oznacza się stężenie kreatyniny, a wynik podaje się w mg (albuminy) na gram (kreatyniny) – mg/g. W przypadku dodatniego wyniku badania należy powtórzyć 2-krotnie w ciągu 3–6 miesięcy. Dwa dodatnie wyniki spośród 3 stanowią podstawę rozpoznania albuminurii.

Stężenie kreatyniny we krwi należy określać u chorych na cukrzycę przynajmniej raz w roku, i to niezależnie od wydalania albuminy z moczem, i dodatkowo wykorzystać go do wyliczenia eGFR według wzoru MDRD, co obecnie jest zaleceniem międzynarodowym.

Chociaż oznaczenie stężenia albuminy wydalananej z moczem uznaje się obecnie za „złoty standard” w rozpoznawaniu cukrzycowej choroby nerek, to

badanie to nie jest pozbawione wad. Zwiększone wydalanie albuminy może być również wynikiem wysiłku fizycznego w ciągu 24 godzin poprzedzających oznaczenie, zakażenia, hiperglikemii, krwinkomoczu, niewydolności krążenia lub nadciśnienia tętniczego. Ponadto o ile albuminuria powszechnie uznawana jest obecnie za podstawowy wskaźnik rozwijającej się cukrzycowej choroby nerek oraz skuteczności jej leczenia, o tyle niewątpliwie istnieje potrzeba identyfikacji markerów możliwych do wykrycia na wcześniejszym etapie choroby.

Najczęściej w celu oceny albuminurii stosuje się metody immunochemiczne. Jednakże w tym celu wykorzystuje się również metody chromatograficzne, m.in. wysokosprawną chromatografię cieczową (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Wysłunięto hipotezę, że w moczu obecna jest tzw. immunochemicznie nieaktywna albumina, która może zostać wykryta tylko przy użyciu HPLC. Comper i wsp. (1) porównując użyteczność metody HPLC i metod immunochemicznych stwierdzili, że przy użyciu HPLC albuminuria może zostać wykryta wcześniej o 3,9 lub 2,4 roku odpowiednio dla cukrzycy typu 1 i 2. Częstość występowania albuminurii w grupie australijskich cukrzyków stwierdzona za pomocą HPLC była 4-krotnie wyższa niż przy użyciu innych metod (20% vs. 5,5%) (2). W swojej pracy Brinkman i wsp. (3) stwierdzili, że średnie stężenie albuminy w moczu 998 badanych oznaczone przy użyciu IN wynosiło $6,8 \pm 4,3 \text{ mg/L}$, podczas gdy w tej samej grupie przy zastosowaniu metody HPLC uzyskano wynik $17,6 \pm 10,3 \text{ mg/L}$. Dostępne są również doniesienia, które kwestionują przewagę metod chromatograficznych nad immunochemicznymi, i dowodzą, że użycie przeciwciał poliklonalnych reagujących z licznymi epitopami cząsteczki albuminy umożliwia oznaczanie

„całkowitej albuminy” również przy użyciu metod immunoturbidymetrycznych.

W patogenezie cukrzycowej choroby nerek postuluje się rolę kolagenu IV, który jest jednym z głównych składników substancji międzykomórkowej kłębuszka nerkowego. Watanabe i wsp. (5) wykazali, że kolagen IV obecny jest w moczu osób z cukrzycową chorobą nerek, podczas gdy nie identyfikuje się go w moczu osób z albuminurią o innej etiologii. Obserwacja ta wskazuje, że kolagen IV jest dla cukrzycowej choroby nerek bardziej swoisty niż albumina. Ograniczeniem natomiast jest fakt, że kolagen IV wykrywany jest tylko w moczu pacjentów z już obecną albuminurią (6), a więc nie można go uznawać za wczesny marker cukrzycowej choroby nerek.

Adiponektyna wydzielana przez adipocyty jest cytokiną obecną w osoczu. Udowodniono, że jej stężenie w osoczu koreluje z otyłością brzusznią oraz innymi objawami zespołu metabolicznego. Koshimura i wsp. (7) stwierdzili podwyższone stężenie adiponektyny również w moczu pacjentów z cukrzycą typu 2. Autorzy wykazali również istnienie dodatniej korelacji pomiędzy stężeniem adiponektyny oraz albuminy w moczu. W toku dalszych badań stwierdzono, że stężenie adiponektyny w moczu i osoczu jest istotnie wyższe u pacjentów z cukrzycową chorobą nerek w porównaniu do osób z albuminurią o innej etiologii (8).

Podocyty jako podstawowy składnik bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego również stały się obiektem zainteresowań badaczy. Nakamura i wsp. (9) wykazali istotnie częstsze występowanie podocytów w moczu osób z cukrzycą typu 1 oraz towarzyszącą albuminurią w porównaniu do pacjentów bez białkomoczu. Nefryna, będąca jednym z białek specyficznych dla podocytów, w grupie pa-

cientów z cukrzycą typu 1 wykrywana była u 50% osób bez białkomoczu, u 17% osób z albuminurią i u 28% osób z jawnym białkomoczem (10). W grupie osób zdrowych, która stanowiła punkt odniesienia (grupa kontrolna) do tego badania, obecności nefryny nie stwierdzono. Na podstawie wyników powyższych badań można podejrzewać, że nefryna u części osób z cukrzycą typu 1 uwalniana jest przed śmiercią podocyta, dlatego jej obecność w moczu może być rozważana jako wczesny indykator cukrzycowej choroby nerek.

Końcowe produkty zaawansowanej glikacji (ang. *advanced glycation endproducts*, AGE) to heterogenna grupa białek i tłuszczów, które uległy nieenzymatycznej glikacji. Chociaż rola AGE w patogenezie cukrzycowej choroby nerek nie została jak dotąd jednoznacznie wyjaśniona, to poziom AGE jako marker ściśle związany z glikemią oraz zależny od prawidłowej funkcji nerek, przez które końcowe produkty zaawansowanej glikacji są wydalone, budzi zainteresowanie badaczy. Badanie poziomu AGE w moczu w grupie pacjentów z cukrzycą typu 2 wykazało jego istotnie wyższe stężenie u osób z albuminurią niż u osób bez białkomoczu (11). Jednak z uwagi na fakt, że obecność AGE stwierdzano również w moczu 15% osób bez cukrzycy, uważa się, że oznaczenie to cechuje się zbyt małą specyficznością dla wykrywania cukrzycowej choroby nerek. Użyteczniejsze z tego punktu widzenia wydają się być produkty rozkładu proteolitycznego AGE – końcowe produkty zaawansowanej glikacji o niskiej masie molekularnej (ang. *low molecular weight AGEs*, LMW-AGEs). Thomas i wsp. (12) stwierdzili, że stężenie LMW-AGEs w surowicy krwi było o 34% wyższe u osób z cukrzycą typu 2 niż u osób zdrowych oraz negatywnie korelowało z eGFR. Doniesienia literaturowe wskazują również na moż-

liwą wartość diagnostyczną proteiny beta ig-h3 (białka będącego składnikiem substancji zewnątrzkomórkowej kłębuszka nerkowego), której ekspresja jest indukowana przez transformujący czynnik wzrostu beta (TGF β). TGF β jest ściśle związany z patogenezą cukrzycowej choroby nerek. Ha i wsp. (13) wykazali, że iloraz stężenia beta ig-h3 w moczu oraz stężenia kreatyniny w moczu był istotnie wyższy w grupie osób z cukrzycą typu 2 w porównaniu do osób zdrowych. Jednocześnie stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy stężeniem wydalanej beta ig-h3 oraz stężeniem albuminy w moczu. Co więcej, stężenie beta ig-h3 było istotnie wyższe u osób z cukrzycą typu 2 bez albuminurii w porównaniu do osób zdrowych. Obserwacja ta może świadczyć o użyteczności beta ig-h3 jako wczesnego markera cukrzycowej choroby nerek.

W grupie osób z cukrzycą podejmowano również próby oznaczania N-acetyloglukozaminy (NAG). Związek ten należy do grupy modyfikowanych monosacharydów, a jego obecność w moczu wielu auto-

rów wiąże ze stanem uszkodzenia cewki bliższej nefronu. Kilkakrotnie stwierdzano wyższe stężenie NAG w moczu osób z niewyrównaną cukrzycą w porównaniu do osób z dobrze kontrolowaną chorobą (14–16). Kern i wsp. (17) w swoim badaniu, którym objęli 87 osób z cukrzycą typu 1, stwierdzili, że obecność NAG w moczu badanych istotnie korelowała z późniejszym występowaniem albuminurii i jawnego białkomoczu. Ponieważ jednak stężenie NAG w moczu jest również związane z poziomem glikemii, jego użyteczność u osób z niekontrolowaną cukrzycą jest ograniczona. Konkludując, trzeba powiedzieć, że idealny marker cukrzycowej choroby nerek powinien być możliwy do wykrycia na wcześniejszym etapie choroby niż albuminuria. Największe nadzieje wiąże się z oznaczaniem białek, które są składnikami mezangium lub związane są z podocytami kłębuszka nerkowego. Jednakże na chwilę obecną żaden z proponowanych markerów nie ma istotnej przewagi nad oceną albuminurii, która pozostaje głównym kryterium rozpoznania nefropatii cukrzycowej.

Piśmiennictwo:

1. Comper W.D., Jerums G., Osicka T.M.: Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clin. Biochem.* 2004, 37, 105–111.
2. Polkinghorne K.R., Su Q., Chadban S.J. i wsp.: Population prevalence of albuminuria in the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle (AusDiab) study: immunonephelometry compared with high-performance liquid chromatography. *Am. J. Kidney Dis.* 2006, 47, 604–613.
3. Brinkman J.W., Bakker S.J., Gansevoort R.T. i wsp.: Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. *Kidney Int. Suppl.* 2004, S69–S75.
4. Miller W.G., Bruns D.E., Hortic G.L. i wsp.: The National Kidney Disease Education Program – IFCC Working Group on Standardisation of Albumin in Urine: Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin. Chem.* 2009, 55, 24–38.
5. Watanabe H., Sanada H., Shigetomi S. i wsp.: Urinary excretion of type IV collagen as a specific indicator of the progression of diabetic nephropathy. *Nephron* 2000, 86, 27–35.
6. Tomino Y., Suzuki S., Azushima C. i wsp.: Asian multicenter trials on urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy. *J. Clin. Lab. Anal.* 2001, 15, 188–192.
7. Koshimura J., Fujita H., Narita T. i wsp.: Urinary adiponectin excretion is increased in patients with overt diabetic nephropathy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 316, 165–169.
8. Fukita H., Morii T., Koshimura J. i wsp.: Possible relations between adiponectin and renal tubular injury in diabetic nephropathy. *Endocr. J.* 2006, 53, 745–52.
9. Nakamura T., Ushiyama C., Suzuki S. i wsp.: Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2000, 15, 1379–1383.
10. Patari A., Forsblom C., Havana M. i wsp.: Nephropathy in diabetic nephropathy of type 1 diabetes. *Diabetes* 2003, 52, 2969–2974.
11. Turk N., Mornar A., Mrzljak V. i wsp.: Urinary excretion of advanced glycation endproducts in patients with type 2 diabetes and various stages of proteinuria. *Diabetes Metab.* 2004, 30, 187–192.
12. Thomas M.C., Forbes J.M., MacIsaac R. i wsp.: Low molecular weight advanced glycation end products: markers of tissue AGE accumulation and more? *Ann. NY Acad. Sci.* 2005, 1043, 644–654.
13. Ha S.W., Kim H.J., Bae J.S. i wsp.: Elevation of urinary beta ig-h3, transforming growth factor-beta-induced protein in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2004, 65, 167–173.
14. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) IX: Relationships of urinary albumin and N-acetylglucosaminidase to glycaemia and hypertension at diagnosis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and after 3 months diet therapy. *Diabetologia* 1993, 36, 835–842.
15. Agardh C.D., Agardh E., Isaksson A. i wsp.: Association between urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase and its isoenzyme patterns and microangiopathy in type 1 diabetes mellitus. *Clin. Chem.* 1991, 37, 1696–1699.
16. Patrick A.W., Oliver M.D., Howie A.F. i wsp.: Urinary excretion of beta-thromboglobulin and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in type 1 diabetes: potential indicators of early nephropathy? *Diabetes Metab.* 1990, 16, 441–447.
17. Kern E.O., Erhard P., Sun W. i wsp.: Early urinary markers of diabetic kidney disease: A nested Case-Control Study from diabetes control and complication trial (DCCT) *Am. J. Kidney Dis.* 2010, 55, 824–834.

dr n.med. Tomasz Zaborowski

*Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej
Uniwersytetu Medycznego
w Lublinie*

lek. med. Piotr Raszczepkin

*Oddział Wewnętrzny I Samodzielnego Publicznego
Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego
w Chełmie*

ZNACZENIE BADANIA CYTOLOGICZNEGO PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO W DIAGNOSTYCE RÓŻNICOWEJ NEUROINFEKCJI – TERAŹNIEJSZOŚĆ I PRZYSZŁOŚĆ

SIGNIFICANCE OF CYTOLOGICAL EXAMINATION OF CEREBROSPINAL FLUID IN THE DIFFERENTIAL
DIAGNOSIS OF NEUROINFECTIONS – „PRESENT AND FUTURE”

Maria Mantur, Iwona Sidorkiewicz

Streszczenie

Mikroskopowe badanie cytologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego jest rutynowym badaniem laboratoryjnym przy podejrzeniu neuroinfekcji oraz w różnicowaniu ropnych i limfocytarnych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych. Natomiast wykorzystanie nowoczesnych analizatorów hematologicznych z modułem do badania płynu mózgowo-rdzeniowego daje szersze możliwości zbadania dużo większej liczby komórek w bardzo krótkim czasie. Istnieją jednak ograniczenia co do ich zastosowania w przypadku próbek płynu o niskiej pleocytozie, na przykład w początkowym lub końcowym stadium choroby. W tych przypadkach nadal złotym standardem badania płynu jest cytodiagnostyka mikroskopowa. Pomimo to przyszłość cytodiagnostyki płynu mózgowo-rdzeniowego należy upatrywać w analizatorach hematologicznych o udoskonalonej technice badawczej, wysokiej precyzji i dokładności.

Słowa kluczowe

Cytodiagnostyka, pleocytoza, płyn mózgowo-rdzeniowy.

Summary

Cytological examination of cerebrospinal fluid is a routine laboratory test in patients with suspected neuroinfections. The use of modern hematology analyzers with the module for testing cerebrospinal fluid offers more opportunities to explore a greater number of cells in a very short time. However, the use of such analyzers is limited in the case of fluid samples with low pleocytosis e.g. in the initial or final stages of the disease. In such cases the cytodiagnostic microscopy is still the gold standard for fluid analysis. However, due to a higher testing efficiency, precision, and accuracy, it is the laboratory analyzers, that promise a brighter future for cytological examination.

Key words

Cytodiagnostic, pleocytosis, cerebrospinal fluid.

Powstawanie płynu mózgowo-rdzeniowego

Płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) jest jasną, bezbarwną cieczą, wytwarzaną przez splot naczyniówkowy w komorach bocznych mózgu. Płyn mózgowo-rdzeniowy wypełnia przestrzeń podpajęczynówkową otaczającą mózg i rdzeń kręgowy, natomiast wchłania-

niany jest do krwi w obrębie kosmków opony pajęcznej, wpuklających się do dużych naczyń żylnych. Wszystkie substancje przechodzące z krwi do płynu muszą pokonać barierę krew-mózg. Dlatego też proces powstawania płynu można opisać jako wybiórcze

wydzielanie składników osocza do przestrzeni płynowych mózgu, nie zaś jako jego ultraprzesączenie. Wskazuje na to inne niż w osoczu stężenie niektórych składników rozpuszczalnych, jak np. chloru, potasu czy wapnia. Powstawanie, krążenie i zwrotne wchłanianie płynu do krwi jest dynamicznym procesem, który powoduje jego ciągłą wymianę (9).

Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego jest podstawowym badaniem laboratoryjnym, które ma zastosowanie nie tylko u pacjentów z podejrzeniem neuroinfekcji, ale wskazuje także na inne procesy chorobowe w ośrodkowym układzie nerwowym (3, 12).

Znaczenie badania biochemicznego PMR

U osób zdrowych skład płynu mózgowo-rdzeniowego podlega ścisłej regulacji, dlatego zmiany biochemiczne i cytologiczne ułatwiają diagnostykę wielu chorób neurologicznych, a w szczególności neuroinfekcji. Rutynowo podczas badania PMR mierzy się zawartość białka, glukozy, mleczanów oraz wykonuje się badanie bakteriologiczne. Ciągłe podejmowane są próby wykorzystania innych parametrów biochemicznych, np. stężenia sodu, potasu, chlorków, magnezu, enzymów, pH czy pCO_2 (5, 7), jednak ich wartość diagnostyczna jak dotychczas jest niewielka. Natomiast zasadnicze znaczenie diagnostyczne ma badanie cytologiczne, któremu należy poświęcić więcej uwagi.

Znaczenie badania cytologicznego PMR

Ocena cytologiczna płynu mózgowo-rdzeniowego powinna być wykonana najpóźniej 2 godziny od momentu jego pobrania. Płyn osoby zdrowej zawiera

niewielką liczbę komórek jednojądrzastych (dorośli 0–5 w mm^3 , noworodki 0–30 w mm^3 , niemowlęta 0–10 w mm^3), natomiast nie powinien zawierać erytrocytów, które zazwyczaj dostają się do płynu podczas wykonywania punkcji lędźwiowej. Czasem obecność krwinek czerwonych może być rezultatem świeżego krwawienia podpajęczynówkowego lub śródmózgowego (9).

Pleocytoza to liczba komórek jądrzastych w 1 mm^3 płynu mózgowo-rdzeniowego. Niska wartość pleocytozy sprawia, że liczniki elektroniczne (analizatory hematologiczne) dają niedokładne wyniki pomiaru. Spowodowane jest to tym, że często „tło aparatu” jest wyższe od próby badanej, gdyż analizatory hematologiczne są przystosowane do badania próbek krwi. Dlatego liczenie komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym przeprowadza się zazwyczaj pod mikroskopem z użyciem komory skalowanej Fuchsa-Rosenthala. Do obliczania ogólnej liczby komórek płyn należy dokładnie wymieszać, odmierzyć i połączyć z płynem Samsona w celu hemolizy erytrocytów oraz zwiększenia wizualizacji leukocytów poprzez wybarwienie ich jąder. Należy jednak pamiętać, że pleocytoza jako badanie ilościowe jest tylko badaniem wstępnym, które dopiero w zestawieniu z badaniem jakościowym, tzw. cytodiagnostyką, stanowi pełny obraz komórek znajdujących się w płynie mózgowo-rdzeniowym (3).

Cytodiagnostyka jest metodą diagnostyczną w medycynie, polegającą na badaniu pod mikroskopem komórek pobranych przyżyciowo. Ocena mikroskopowa polega na analizie ilościowej i jakościowej opartej na różnicowaniu komórek na podstawie

cech morfologicznych (wielkość, kształt, barwność oraz przestrzenny układ, rozproszenie lub zgrupowanie w formie gniazd komórkowych). Zaletą cytodiagnostyki mikroskopowej jest trwałość sporządzonego preparatu, możliwość wieloletniego przechowywania i wielokrotnej oceny. Do wad należy zaliczyć pewną ilość artefaktów związanych z utrwalaniem i barwieniem oraz długi czas wykonania (10). Wiarygodność badania cytologicznego PMR zapewnia: 1) dobra jakość wykonanego osadu komórek, 2) sposób utrwalenia i zabarwienia preparatu, 3) reprezentatywność komórek w próbce badanego płynu.

Odczyn granulocytarny jest najbardziej charakterystyczny dla bakteryjnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Wraz z rozwojem tej choroby stopniowo zwiększa się liczba monocytów zauważalnych w preparacie barwionym. W dalszym etapie pojawiają się również limfocyty i komórki plazmatyczne. Natomiast podwyższony odsetek eozynofili w płynie mózgowo-rdzeniowym wskazuje na neuroinfekcję pasożytniczą lub grzybiczą. W neuroborelioze zazwyczaj przeważają komórki jednojądrzaste z obecnością aktywowanych limfocytów B. W przypadku krwotoku podpajęczynówkowego obecność licznych makrofagów i erytrofagów świadczy o niedawno przeżytym krwawieniu, natomiast stwierdzenie komórek żernych z ziarnami hemosyderyny, hematoidyny, biliwerdyny lub kryształów bilirubiny przemawia za wcześniej przeżytym krwawieniem podpajęczynówkowym (9). Stwierdzenie obecności komórek nowotworowych wskazuje jednoznacznie na zajęcie opon mózgowo-rdzeniowych procesem nowotworowym, jednak jego wykrywalność jest stosunkowo niska, gdyż często komórki nowotworowe są mylone z innymi komórkami o cechach atypii.

Perspektywy rozwoju i udoskonalania metod do cytodiagnostyki PMR

Liczba krwinek białych i ich różnicowanie na jedno- i wielojądrzaste w płynie mózgowo-rdzeniowym jest kluczowym badaniem w diagnostyce różnicowej neuroinfekcji. Najczęściej stosowaną metodą do badania cytologicznego PMR jest mikroskopowa metoda komorowa, połączona z wykonaniem preparatu cytologicznego uzyskanego z osadu komórek w cytowirówce. Metoda jest w pełni manualna, dlatego można ją wykonywać niemal w każdym laboratorium, co stanowi jej zaletę. Z drugiej jednak strony to metoda czasochłonna i wymaga doświadczenia od osoby wykonującej badanie płynu. Pomimo że cytodiagnostyka mikroskopowa PMR jest nadal metodą referencyjną, to poszukuje się metod zautomatyzowanych, które mogą zapewnić szybkie uzyskanie wyniku, co jest kluczowe w przypadku neuroinfekcji. Ponadto wyniki z analizatorów są bardziej powtarzalne i pozbawione wpływu subiektywnej oceny osoby badającej płyn.

Coraz więcej uwagi poświęca się analizatorom hematologicznym zaopatrzonym w moduły do badania płynu mózgowo-rdzeniowego, opartym na metodzie impedancyjnej lub cytometrii przepływowej (1, 2, 4, 8, 10, 11, 13). Metoda impedancyjna wykorzystuje fakt, że komórka przechodząc przez układ pomiarowy zmienia oporność właściwą roztworu (elektrolitu), w którym jest zawieszona. Przewodnictwo roztworu zmienia się proporcjonalnie do liczby komórek. Apertura pomiarowa liczy pojedynczo przepływające komórki, a zmiana impedancji jest proporcjonalna do objętości analizowanej komórki. W zależności od zmierzonej objętości ko-

mórki klasyfikowane są przez poszczególne kanały pomiarowe analizatora, a ich graficzną wizualizacją jest histogram. W analizatorach hematologicznych stosuje się duże rozcieńczenia, aby zapobiec wzajemnej interferencji różnych populacji komórek. To zaś jest zasadniczą wadą przy liczeniu i ocenie komórek w płynach mózgowo-rdzeniowych z uwagi na znacznie niższą liczbę komórek niż we krwi obwodowej (8).

W cytometrii przepływowej wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne znakowane fluorochromem, które łączą się ze swoistymi receptorami znajdującymi się na powierzchni błony komórkowej (12). Każda komórka po przejściu przez układ pomiarowy jest poddawana ocenie pod względem załamania, rozproszenia i odbicia wiązki światła laserowego z jednoczesnym pomiarem fluorescencji. W tej metodzie rejestrowana jest wielkość i ziarnistość komórek, cechy morfologiczne, a także antygenowe i biochemiczne. Trudność w tej

metodzie może jednak sprawić skompletowanie takiego zestawu przeciwciał, który pozwoli uzyskać możliwie precyzyjny opis fenotypu badanych komórek (6).

Podsumowanie

W związku z ciągłym poszukiwaniem nowych technik badawczych do cytodiagnostyki płynu mózgowo-rdzeniowego należy zadać pytanie, czy istnieje „złoty standard” tego badania? Odpowiedź jest prosta – tak, metoda mikroskopowa. Natomiast z pewnością przyszłość cytodiagnostyki płynu mózgowo-rdzeniowego należy wiązać z analizatorami laboratoryjnymi o udoskonalonej technice badawczej, wysokiej precyzji i dokładności. Jednak na dzień dzisiejszy nie ma jeszcze konkretnego stanowiska ani jednoznacznych rekomendacji, dotyczących obowiązkowego stosowania analizatorów komórkowych do rutynowej diagnostyki neuroinfekcji.

Piśmiennictwo:

1. Aune M.W., Becker J.L., Brugnara C et al.: Automated flow cytometric analysis of blood cells in cerebrospinal fluid: analytic performance. *Am. J. Clin. Pathol.* 2004, 121, 690–700.
2. de Graaf M.T., de Jongste A.H., Kraan J. et al.: Flow cytometric characterization of cerebrospinal fluid cells. *Cytometry B. Clin. Cytom.* 2011, 80, 271–281.
3. Dean A., Seehusen, M.D., Mark M., Reeves, M.D. et al.: Cerebrospinal Fluid Analysis. *Am. Fam. Physician.* 2003, 68, 1103–1109.
4. Dux R., Kindler-Röhrborn A., Annas M. et al.: A standardized protocol for flow cytometric analysis of cells isolated from cerebrospinal fluid. *Journal of the Neurological Sciences*, 1994, 121, 74–78.
5. Dyla Ł., Sawaryn T., Wilczkowski A. et al.: Przydatność niektórych badań płynu mózgowo-rdzeniowego w różnicowaniu ropnych i limfocytarnych zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych. *Pol. Tyg. Lek.* 1987, 42, 1410–1414.
6. Kaczmarek A., Mackiewicz A., Leporowska E., Osawa T.: Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce klinicznej. *Współcz. Onkol.* 2002, 6, 366–373.
7. Kępa Ł., Oczko-Grzesik B., Błędowski D.: Ocena aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy chorych z ropnymi bakteryjnymi zapaleniami opon i mózgu. *Przegl. Epidemiol.* 2006, 60, 291–298.
8. Kleine T.O., Nebe C.T., Löwer C. et al.: Cell analysis in cerebrospinal fluid (CSF) using Sysmex® hematology analyzers XT-4000i and XE-5000: evaluation with CSF controls of the Joint German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (DGKL). *Cytometry A.* 2012, 81, 255–264.
9. Lewczuk P., Mantur M.: Płyn mózgowo-rdzeniowy. Badania i interpretacja wyników. Wyd. Ekonomia i środowisko. Białystok 2002.
10. Perné A., Hainfellner J.A., Womastek I. et al.: Performance evaluation of the Sysmex XE-5000 hematology analyzer for white blood cell analysis in cerebrospinal fluid. *Arch. Pathol. Lab.* 2012, 136, 194–198.
11. Pranzatelli M.R.: Going with the flow: neuroinflammation. *Dev. Med. Child Neurol.* 2011, 53, 782–791.
12. Ronald G., Riechers II, Abel D., Jarell, Geoffrey S., F. Ling.: Infections of the Central Nervous System. *Current Clinical Neurology* 2004, 515–531.
13. Sandhaus L.M., Ciarlini P., Kidric D. et al.: Automated cerebrospinal fluid cell counts using the Sysmex XE-5000: is it time for new reference ranges? *Am. J. Clin. Pathol.* 2010, 134, 734–738.
14. Tung J.W., Heydari K., Herzenberg L.A.: Modern Flow Cytometry: A Practical Approach. *Clin. Lab. Med.* 2007, 27, 453–469.

prof. dr hab. n.med. Maria Mantur

*Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej
Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku*

Iwona Sidorkiewicz

*Studenckie Koło Naukowe
przy Zakładzie Laboratoryjnej
Diagnostyki Klinicznej
Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku*

Adres do korespondencji

*prof. dr hab. n.med. Maria Mantur
mantur@umb.edu.pl
Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Klinicznej
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Waszyngtona 15a
15-274 Białystok*

OZNACZANIE HEMOGLOBINY GLIKOWANEJ (HbA1c) – – JAK, KIEDY I PO CO?

GLYCATED HEMOGLOBIN (HbA1c) TESTING – HOW, WHEN AND WHAT FOR?

Bogdan Solnica

Streszczenie

Oznaczanie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) odgrywa kluczową rolę w monitorowaniu leczenia cukrzycy, a ostatnio zaproponowano jego stosowanie w rozpoznawaniu tej choroby. Epidemia cukrzycy, z jaką mamy obecnie do czynienia, powoduje, że oznaczenia HbA1c i związane z nimi problemy są udziałem większości laboratoriów diagnostycznych. W artykule przedstawiono aktualne informacje na temat metodyki i standaryzacji oznaczeń HbA1c oraz ich zastosowania w diagnostyce cukrzycy.

Słowa kluczowe

Cukrzyca, przewlekłe powikłania, wyrównanie metaboliczne cukrzycy.

Summary

Measurement of glycated hemoglobin (HbA1c) plays a key role in diabetes treatment monitoring, and recently its use in the diagnosis of this disease has been proposed. The epidemic of diabetes, with which we are currently experiencing, makes HbA1c assays and related problems shared by most diagnostic laboratories. The article presents current information on the methodology and standardization of HbA1c measurements and their application in the diagnostics of diabetes.

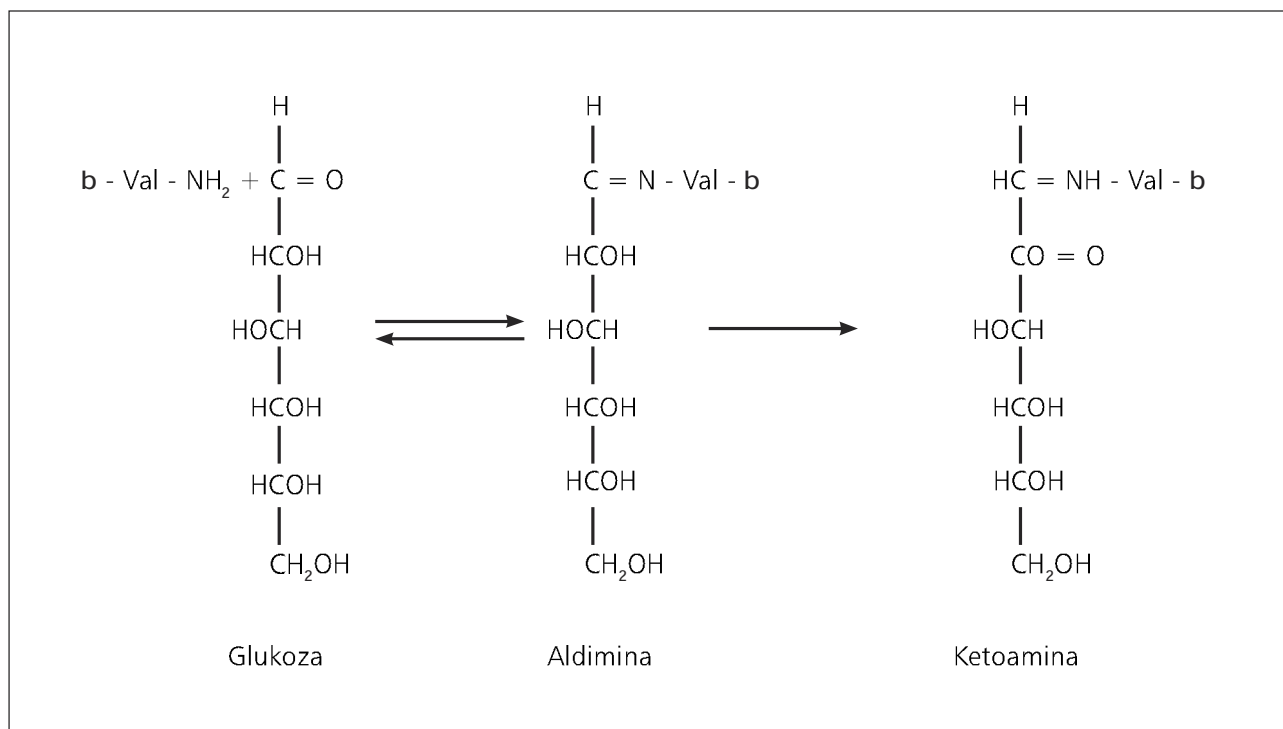
Key words

Diabetes, chronic complications, glycemic control.

Oznaczanie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) jest obecnie jednym z podstawowych narzędzi diagnostycznych w diabetologii. Zgodnie ze standardami opieki diabetologicznej badanie to powinno być wykonywane systematycznie u wszystkich chorych na cukrzycę. Wobec liczącej ponad 2,5 mln rzeszy osób z cukrzycą w naszym kraju – co przekłada się na potrzebę wykonania kilku milionów badań rocznie – oznaczanie HbA1c stwarza dla diagnostyki laboratoryjnej wiele wyzwań związanych z dostępnością badania, metodyką jego wykonywania, standaryzacją i kontrolą jakości oraz zasadami interpretacji wyników. Ostatnie kilkanaście lat to okres doskonalenia metod oznaczania HbA1c oraz tworzenia programu globalnej standaryzacji tego badania.

Glikacja hemoglobiny

Glikacja jest wszechobecnym w organizmie posttranslacyjnym procesem nieenzymatycznego przyłączania cząsteczek glukozy lub innych monisacharydów do wolnych grup aminowych białek. Glikacji ulegają wszystkie białka – strukturalne (np. kolagen), albumina, enzymy, czynniki krzepnięcia, podlega jej także hemoglobina. Najczęściej przyłączanym do białek monosacharydem jest glukoza. Glikacja jest procesem dwuetapowym. W pierwszej reakcji następuje kondensacja cząsteczki glukozy (lub innego monosacharydu) z grupą aminową białka z wytworzeniem połączenia o strukturze aldiminy (zasady Schiffa). Jest to reakcja odwracalna o szybkim prze-



Ryc. 1. Powstawanie HbA1c – reakcja glukozy z grupą aminową N-końcowej waliny łańcucha b-hemoglobiny.

biegu. W drugim etapie następuje przegrupowanie cząsteczki (Amadoriego) przekształcające aldiminę w ketoaminę – trwałą formę białka glikowanego, jak przedstawia to rycina 1 (1).

Prawidłowo 97% całkowitej hemoglobiny erytrocytów (Hb) stanowi HbA o cząsteczce zbudowanej z dwóch łańcuchów α i dwóch łańcuchów β, 2,5–3% – HbA2 (po dwa łańcuchy α i δ), a 0,5% – hemoglobina płodowa (HbF, po dwa łańcuchy α i γ). Zastosowanie diagnostyczne mają produkty glikacji HbA. Ponieważ w tetramerycznej cząsteczce HbA znajduje się kilka wolnych grup aminowych mogących łączyć się z różnymi monosacharydami, pojęcie „hemoglobina glikowana” (GHb) oznacza heterogenną grupę substancji. Można wyróżnić następujące produkty glikacji HbA:

- HbA0 – nieglikowana HbA,
- HbA1a1 – produkt przyłączenia fruktozo-1,6-di-

fosforanu do N-końcowej waliny łańcucha(ów) β,

- HbA1a2 – produkt przyłączenia glukozy-6-fosforanu do N-końcowej waliny łańcucha(ów) β,
- HbA1b – produkt przyłączenia pirogronianu do N-końcowej waliny łańcucha(ów) β,
- HbA1c – produkt przyłączenia D-glukozy do N-końcowej waliny łańcucha(ów) β,
- Pozostałe frakcje GHb (*non-HbA1 glycated hemoglobins*).

HbA1c (bN-1-deoxyfruktozylo-hemoglobina) powstaje na drodze nieenzymatycznego przyłączenia cząsteczki glukozy do wolnej grupy aminowej N-końcowej waliny jednego lub obydwóch łańcuchów cząsteczki bHbA. Do tej frakcji GHb zaliczane są cząsteczki glikowane także w innych miejscach łańcucha α lub β. HbA1c jest największą frakcją, stanowiącą 70–80% całkowitej GHb. Frakcja ta jest uważana za reprezentatywną dla całkowitej GHb

i jej oznaczanie jest powszechnie stosowane w diagnostyce cukrzycy, stąd pojęcia „hemoglobina glikowana” i „HbA1c” są w codziennej praktyce często utożsamiane (2).

Glikacja hemoglobiny jest procesem zachodzącym bez udziału enzymów. Jego kinetyka może podlegać wpływom różnych czynników, ale o ilości powstającego produktu HbA1c decyduje przede wszystkim stężenie substratów, czyli glukozy i hemoglobiny. Ponieważ glukoza przy udziale transportera GLUT1 bardzo szybko przedostaje się z osocza do wnętrza erytrocytów, jej stężenie w wodzie płynu wewnątrzkrwinkowego i w wodzie osocza są bardzo zbliżone, aczkolwiek ten proces cechuje się zmiennością międzyosobniczą. U osób wolnych od schorzeń układu krwiotwórczego stężenie hemoglobiny utrzymuje się zwykle na stałym poziomie, stąd o ilości powstającej HbA1c decyduje stężenie glukozy we krwi. Ta zależność jest podstawą diagnostycznego wykorzystania HbA1c jako retrospektywnego wskaźnika glikemii. Przyjmuje się, że przy prawidłowym okresie przeżycia erytrocytów (ok. 120 dni) poziom HbA1c odzwierciedla średnie stężenie glukozy we krwi w okresie 3–4 miesięcy przed wykonaniem oznaczenia (1, 2). Należy podkreślić, że poziom HbA1c koreluje znamienne jedynie ze średnią glikemią dobową, nie wykazuje natomiast istotnego związku ani z glikemią na czczo, ani po posiłkach, nie odzwierciedla też poposiłkowych przejściowych zwyczaj glikemii. Trzeba też pamiętać, że na proces glikacji hemoglobiny nakłada się fizjologiczny obrót erytrocytów – eliminacja starszych krwinek w układzie siateczkowo-śródbłonkowym i zastępowanie ich młodymi krwinkami w procesie hemopoezy. Z tego powodu średnia glikemia odzwierciedlana przez poziom HbA1c ma charakter średniej ważo-

nej – około 50% HbA1c obecnej we krwi powstaje w ciągu miesiąca poprzedzającego badanie, a pozostałe 50% – od 2. do 4. miesiąca przed wykonaniem oznaczenia. Znajomość tych zależności jest ważna przy interpretacji wyników i planowaniu częstości oznaczeń HbA1c.

Zagadnienia przedanalityczne

Osoba, u której ma być wykonane oznaczenie HbA1c, nie wymaga żadnego przygotowania przed pobraniem materiału, nie musi być na czczo, materiał może być pobrany o dowolnej porze dnia. Pierwotnym materiałem do oznaczania HbA1c jest pełna krew żylna pobrana na EDTA (o ile producent odczynników nie zaleca innego antykoagulantu) albo krew włośniczkowa pobierana na heparynę lub odczynnik lizujący. Oznaczenia HbA1c wykonuje się ostatecznie w hemolizacie. Hemoglobina glikowana cechuje się dużą stabilnością *in vitro* – próbki krwi mogą być przechowywane do tygodnia w temp. $+4^{\circ}\text{C}$. Dłuższe przechowywanie wymaga zamrożenia próbek w temp. -70°C lub niższej. Nie należy zabezpieczać próbek w temp. wyższej niż -70°C (np. w temp. -20°C) – może to mieć wpływ na wyniki oznaczeń HbA1c (2).

Znanych jest wiele czynników przedanalitycznych wpływających na poziom HbA1c, niezależnie od metody oznaczania, modyfikujących zależność między HbA1c a glikemią. Poziom HbA1c cechuje się małą zmiennością wewnątrzosobniczą (współczynnik zmienności rzędu 2–3%), natomiast znacznie większą zmiennością międzyosobniczą. Ta ostatnia przypisywana jest zmienności przezbłonowego transportu glukozy i gradientu stężeń pomiędzy osoczem i płynem wewnątrzkomórkowym erytrocytów. Miarą tej zmienności jest luka glikacyjna (*glycation*

gap GG) odzwierciedlająca rozbieżność pomiędzy poziomem HbA1c a stężeniem glikowanych białek osocza oznaczanych jako fruktozamina. Zwiększony przezbłonowy gradient stężeń glukozy ze wzrostem GG, będący stałą cechą osobniczą, tłumaczy międzypersonalną zmienność intensywności procesu glikacji, która może wpływać na diagnostyczne wykorzystanie oznaczeń HbA1c (3, 4).

Poziom HbA1c wzrasta z wiekiem – o ok. 0,1% na dekadę po przekroczeniu 30. r.ż. (5). Obserwuje się zmienność HbA1c zależną od rasy i czynników etnicznych. W badaniach stwierdzano większy poziom HbA1c u Afroamerykanów i Hispanoamerykanów w porównaniu z rasą kaukaską przy tych samych średnich stężeniach glukozy (6, 7). Niektórym z tych badań zarzuca się jednak niedociągnięcia metodologiczne, a kliniczne znaczenie wykazywanych w nich różnic w poziomach HbA1c pozostaje do wyjaśnienia (2).

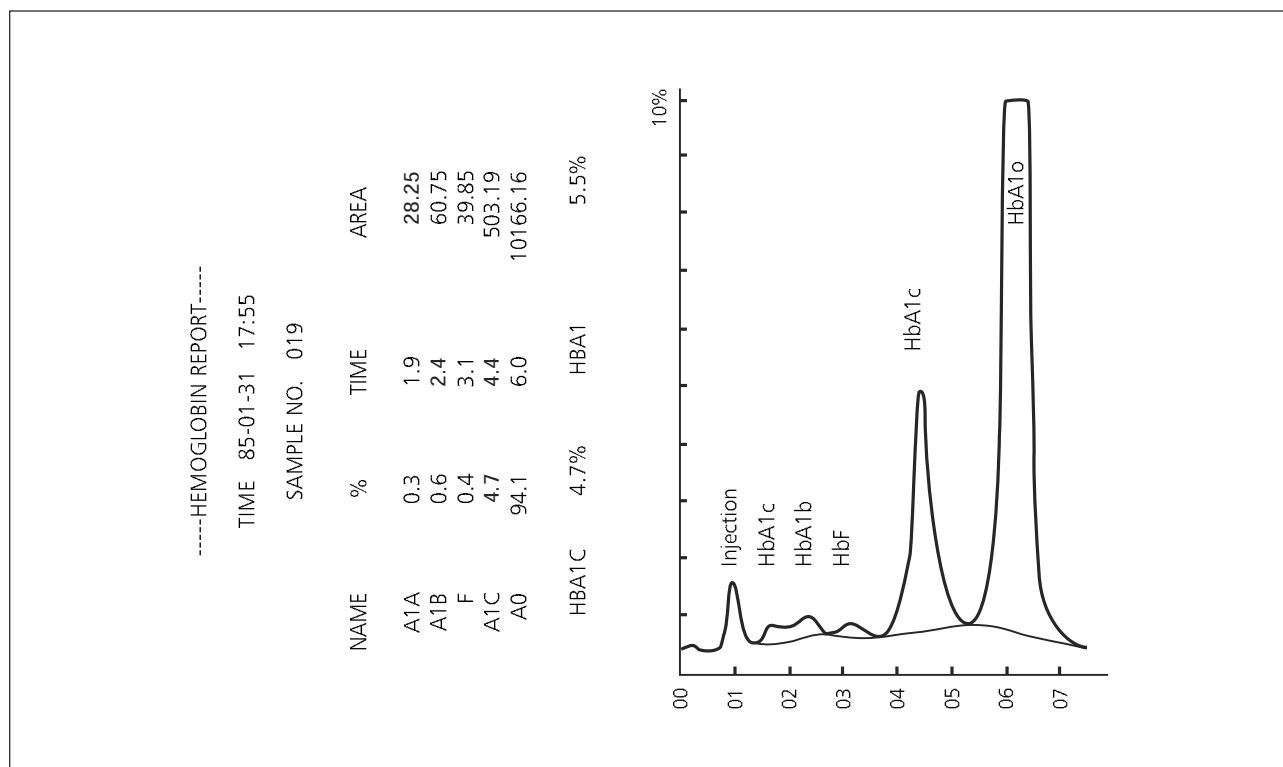
Witamina C i witamina E hamują proces glikacji, zażywane w dużych dawkach mogą powodować zaniżenie wyników oznaczeń HbA1c w relacji do średniej glikemii. Istotny z praktycznego punktu widzenia wpływ na oznaczany poziom HbA1c mają zmiany okresu przeżycia erytrocytów. Jego skrócenie, np. w niedokrwistościach hemolitycznych lub po ostrej utracie krwi, jest równoznaczne z krótszym czasem ekspozycji cząsteczek hemoglobiny na glukozę. W efekcie oznaczony poziom HbA1c jest mniejszy niż wskazywałaby na to średnia glikemia. Z drugiej strony, przedłużenie okresu przeżycia erytrocytów i czasu glikacji hemoglobiny, jak np. w niedokrwistościach niedoborowych, powoduje zawyżenie poziomu HbA1c w relacji do średniej glikemii. Ta relacja jest również zaburzona u biorców transfuzji krwinek czerwonych. Zmiany okresu przeżycia erytrocytów powodują uzyskiwanie wyników oznaczeń HbA1c,

których nie można poprawnie zinterpretować, co wyklucza stosowanie tego badania w diagnostyce i monitorowaniu leczenia cukrzycy.

Niektóre czynniki interferujące są zależne od metody oznaczania HbA1c. Należą do nich warianty hemoglobiny (HbS, HbC, HbE i in.), wpływające na wyniki oznaczeń niezależnie od ewentualnych zmian czasu przeżycia erytrocytów, oraz hemoglobiny modyfikowane chemicznie (karbamylhemoglobina, hemoglobina acetylowana). W związku z tym zaleca się, aby przy doborze metody oznaczania uwzględniać czynniki interferujące występujące u badanych w danym laboratorium pacjentów (2).

Metody oznaczania HbA1c

Metody oznaczania HbA1c wykorzystują zmianę ładunku cząsteczki lub jej struktury wywoływane procesem glikacji. W praktyce medycznych laboratoriów diagnostycznych stosuje się dwie grupy metod analitycznych – chromatograficzne i immunochemiczne. Metody elektroforetyczne mają znaczenie historyczne, trwają prace nad metodami enzymatycznymi. Chromatografia jonowymienowa, zwykle wysokociśnieniowa (*ion exchange high pressure liquid chromatography*, IE-HPLC), rozdziela i ilościowo oznacza frakcje hemoglobiny w hemolizacie krwi na podstawie różnic w ładunku cząsteczek. W metodzie tej używanej do oznaczania HbA1c stosuje się kationowe żywice jonowymienne, z ujemnie naładowanymi cząstkami. Związanie z glukozą wolnej N-końcowej grupy aminowej jednego lub obu łańcuchów b powoduje, że przy odpowiedniej sile jonowej i pH buforu stanowiącego fazę ruchomą cząsteczki HbA1c mają słabszy ładunek dodatni niż cząsteczki HbA0, a cząsteczki HbA1a1 i HbA1a2 gli-

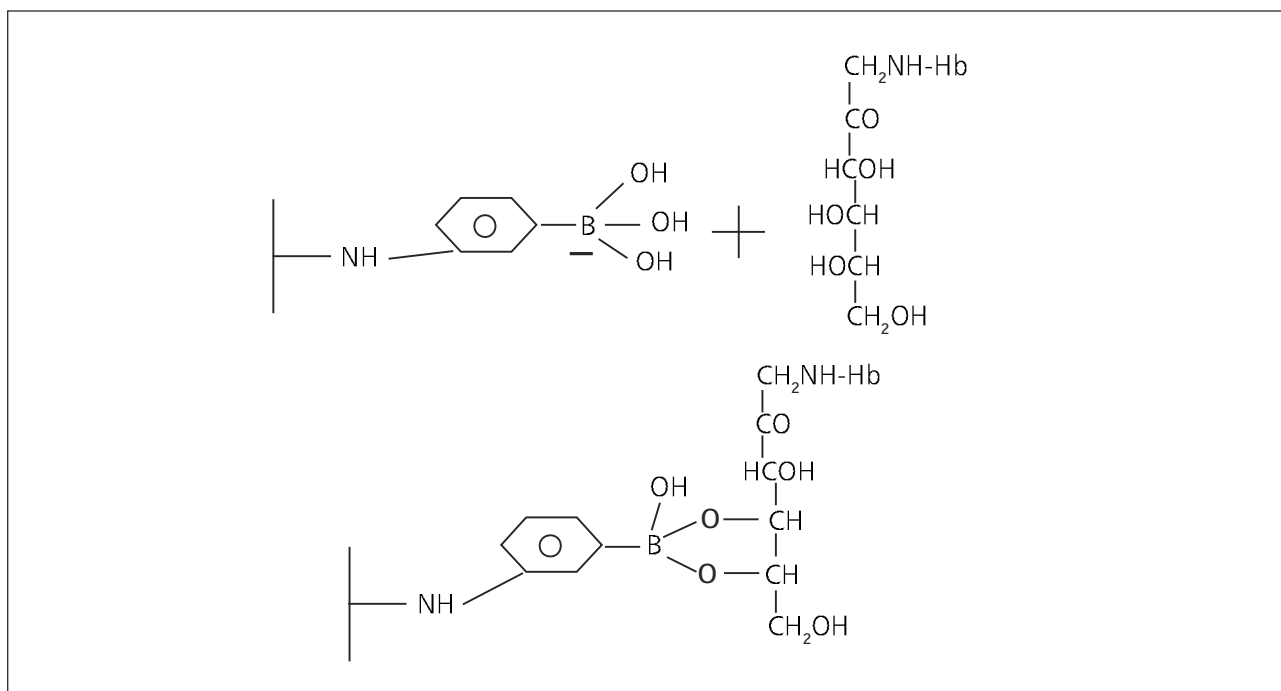


Ryc. 2. Rozdział frakcji HbA i oznaczanie HbA1c metodą jonowymiennej wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (IE-HPLC).

kowane fosforanami monosacharydów oraz HbA1b z przyłączonym pirogronianem zyskują ładunek ujemny. W efekcie najszybciej eluowane są z kolumny frakcje HbA1a1, HbA1a2 i HbA1b, następnie HbA1c i na końcu – HbA0, najsilniej związana z żywicą (rycina 2). Chromatografia jonowymien-
na jest metodą dedykowaną oznaczaniu HbA1c, znajduje szerokie zastosowanie w laboratoriach, a w niektórych programach standaryzacji oznaczeń jest metodą referencyjną. Niemniej ta metoda ma pewne ograniczenia analityczne. Oznaczenia mogą być zakłócone przez czynniki zmieniające ładunek cząsteczki hemoglobiny niezależnie od procesu glikacji. Przykładem takiego procesu może być karbamylacja hemoglobiny u chorych z mocnicą lub jej acetylacja u osób zażywających duże dawki kwasu acetylosalicylowego lub przewlekłe nadużywa-

nych alkoholu. Czynnikiem zakłócającym może być zwiększona frakcja HbF lub warianty hemoglobiny (HbS, HbC, HbE i in.), które mogą być koeluowane z różnymi frakcjami HbA, wpływając w różny sposób na ostateczny wynik rozdziału i pomiaru. Informacje na temat interferencji wariantów Hb z metodami oznaczania HbA1c są dostępne na stronie internetowej www.ngsp.org/interf.asp.

Chromatografia powinowactwa (*boronate affinity chromatography*) jest oparta na reakcji chemicznej i odwracalnym kowalencyjnym wiązaniu cząsteczek wszystkich frakcji GHb z resztami kwasu m-aminofenyloboranowego związanymi z fazą stałą w kolumnie chromatograficznej. W reakcji z cis-diolo-
wymi grupami glukozy i innych monosacharydów związanych z hemoglobina dochodzi do powstania pierścieniowego połączenia z centralnie umiesz-



Ryc. 3. Chromatografia powinowactwa – reakcja kwasu m-aminofenyloboranowego związanego w kolumnie z cis-diolowymi grupami reszty węglowodanowej cząsteczki GHb z powstaniem kowalencyjnego połączenia.

czonym atomem boru. Po elucji HbA0 to kowalencyjne połączenie ulega dysocjacji pod wpływem dodanego sorbitolu, co umożliwia elucję frakcji hemoglobiny glikowanej (rycina 3). Chromatografia powinowactwa oznacza całkowitą GHb, a poziom HbA1c jest określany pośrednio, przez automatycznie wyliczany tzw. ekwiwalent HbA1c. Metoda ta jest stosowana w laboratoriach, zwykle jako chromatografia wysokociśnieniowa. Ponieważ reakcja wiązania GHb w kolumnie obejmuje jej reszty węglowodanowe, chromatografia powinowactwa, w przeciwieństwie do jonowymiennej, nie jest podatna na zakłócenia powodowane zmianami ładunku cząsteczek Hb na skutek ich chemicznej modyfikacji ani przez warianty Hb.

Szeroko stosowane metody immunochemiczne, głównie immunoturbidymetryczne, ale również immunochemiluminescencyjne, immunoenzymatyczne i in., są oparte na monoklonalnych przeciwciałach rozpoznających epitopy obejmujące ketoaminową

formę połączonego z glukozą aminowego końca łańcucha b. Niezbędnym elementem badania z wykorzystaniem tych metod jest oznaczenie na tej samej platformie analitycznej stężenia hemoglobiny całkowitej (Hb) dla wyrażenia poziomu HbA1c jako frakcji Hb. Metody immunoturbidymetryczne polegają na wiązaniu cząsteczek HbA1c z przeciwciałami opłaszczającymi cząstki lateksu lub inny nośnik – tworzone przez aglutynację takich cząstek konglomeraty powodują zmniejszenie przejrzystości roztworu mierzonej spektrofotometrycznie. Stopień zmętnienia roztworu jest proporcjonalny do stężenia HbA1c w próbce. Innym wariantem wykorzystania tej metody są testy hamowania aglutynacji, w których cząsteczki HbA1c w próbce konkurują o miejsca wiążące przeciwciał z aglutynatorem – syntetycznym kompleksem epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała. W tych testach spektrofotometrycznie mierzone zmętnienie roztworu jest odwrot-

nie proporcjonalne do stężenia HbA1c w próbce. Metody immunochemiczne nie są podatne na zakłócenia przez chemiczne modyfikacje Hb i mniej podatne na interferencje wariantów Hb.

Od kilkunastu lat są dostępne metody i analizatory służące do oznaczania HbA1c w miejscu opieki nad pacjentem – w trybie POCT (*point-of-care testing*). Są one przeznaczone do wykonywania oznaczeń w pojedynczych próbkach krwi włośniczkowej lub żyłnej. Metody oznaczania HbA1c w trybie POCT są co do zasady tożsame z używanymi w laboratoriach i obejmują różnorodne techniki immunochemiczne oraz wykorzystujące reakcję z pochodną kwasu borowego jak w chromatografii powinowactwa.

Standaryzacja oznaczeń HbA1c

Obecnie do oznaczania HbA1c stosuje się około 100 metod analitycznych – głównie chromatograficznych i immunochemicznych. Z drugiej strony, oznaczenia HbA1c są wykonywane na coraz większą skalę, głównie z powodu gwałtownie rosnącej zachorowalności na cukrzycę, co narzuca konieczność spójności metod i powrótności (harmonizacji) wyników oznaczeń. Standaryzacja oznaczeń GHb ma wieloletnią historię i nie była procesem łatwym ze względu na różnorodność metod oznaczania grupy substancji, jaka stanowi hemoglobina glikowana. Standaryzację niewątpliwie ułatwiło wskazanie HbA1c jako frakcji GHb stosowanej w diagnostyce. Stworzyło to warunki do opracowania metod referencyjnych i materiału referencyjnego. W latach 90. XX w. w Niemczech, Szwecji i Japonii wdrożono narodowe programy standaryzacji oznaczeń HbA1c oparte na metodach chromatografii jonowymiennej jako referencyjnych. Duże znaczenie międzynarodowe

zyskał uruchomiony w 1996 r. amerykański National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). Organizatorzy tego programu, eksperci American Association for Clinical Chemistry (AACC) wykorzystali doświadczenia i metodykę oznaczania HbA1c dla potrzeb przełomowego badania chorych na cukrzycę typu 1 – DCCT (Diabetes Control and Complications Trial). W badaniu tym wykazano związek pomiędzy poziomem HbA1c a ryzykiem rozwoju mikronaczyniowych przewlekłych powikłań cukrzycy (8). W NGSP jako metodę odniesienia, porównawczą, określaną też jako referencyjna, zastosowano jonowymienną wysokociśnieniową chromatografię cieczową (HPLC) z żywicą Biorex 70. W ramach NGSP prowadzi się odrębną certyfikację metod analitycznych i laboratoriów. Do tego celu używa się sieci laboratoriów referencyjnych. Nadanie certyfikatu NGSP jest uwarunkowane kryteriami dokładności oznaczeń HbA1c wykonywanych daną metodą, przy wykorzystaniu określonych odczynników i analizatora, wyznaczonej przez porównanie z referencyjną metodą programu – IE-HPLC (9). Ocena jest oparta na wynikach oznaczeń HbA1c wykonanych metodą ocenianą i referencyjną w 40 próbkach krwi. Oceniana metoda jest obecnie uznawana za metrologicznie spójną z referencyjną, gdy 95% przedział ufności (CI) dla różnic w parach wyników mieści się w zakresie $\pm 0,75\%$ HbA1c. Zgodnie z planowanym kryterium certyfikacji NGSP, które obowiązuje od września 2012, wyniki uzyskane w 37 z 40 próbek będą mogły być obciążone błędem do $\pm 7\%$ wartości referencyjnej. Będzie to zgodne z dokładnością wymaganą w sprawdzianach organizowanych w USA przez College of American Pathologists (CAP). Certyfikat dla metody (analizator, odczynniki, kalibratory) jest przyznawany na okres

jednego roku, aktualna lista certyfikowanych metod jest publikowana na stronie internetowej NSGP <http://www.ngsp.org/certified.asp>. Warto podkreślić, że certyfikat NGSP oznacza, że dana metoda jest metrologicznie spójna z przyjętą za referencyjną jonowymienną HPLC i wyniki uzyskiwane tymi metodami są porównywalne. Innymi słowy, każda metoda analityczna certyfikowana w NGSP może być w codziennej praktyce uważana za równorzędną referencyjnej metodzie tego programu.

Niezależnie od kryteriów NGSP i CAP rekomendowane standardy jakości analitycznej oznaczeń HbA1c są publikowane w zaleceniach praktyki medycyny laboratoryjnej (Laboratory Medicine Practice Guidelines, LMPG). Zgodnie z aktualnymi rekomendacjami współczynnik zmienności (CV) wewnątrzlaboratoryjnej nie powinien przekraczać 2,0%, a międzylaboratoryjnej – 3,5%. Ponadto zaleca się codzienną kontrolę precyzyjności oznaczeń, również z wykorzystaniem własnego materiału kontrolnego, otrzymywanego przez zamrożenie w temp. -70°C dwóch rozporcjowanych próbek krwi o prawidłowym i podwyższonym poziomie HbA1c (2).

Powołana w latach 90. XX w. grupa robocza do spraw standaryzacji oznaczeń HbA1c – International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) zaproponowała następujące podejście metodyczne. Uwzględniając miejsce glikacji w HbA1c uznano, że zamiast rozdzielać i ilościowo oznaczać kompletne cząsteczki, lepiej będzie rozdzielać glikowane i nieglikowane fragmenty cząsteczek. Opracowana przez grupę metoda referencyjna jest dwuetapowa. W pierwszym etapie swoista endoproteinaza odszczepia glikowane i nieglikowane N-końcowe heksapeptydy łańcuchów b cząsteczek Hb. W drugim – odszczepione heksapeptydy są rozdzielane i ilościowo oznaczane przy użyciu HPLC

i elektroforezy kapilarnej lub HPLC i spektrometrii mas (10, 11). Oparcie oznaczenia HbA1c o odszczepione małe fragmenty cząsteczek Hb uniezależnia metodę od zakłócającego wpływu chemicznych modyfikacji i większości wariantów Hb, co warunkuje jej dużą swoistość analityczną. Grupa robocza IFCC opracowała też pierwotny materiał referencyjny będący mieszaniną chromatograficznie oczyszczonych HbA0 i HbA1c. Z powodu różnic w swoistości analitycznej wyniki oznaczeń HbA1c uzyskane metodami standaryzowanymi i certyfikowanymi w NGSP są o 1,5–2 punkty procentowe wyższe od wyników w standaryzacji IFCC. Wyniki uzyskane metodami standaryzowanymi zgodnie z obydwoma systemami można przeliczać korzystając z równania (*master equation*) publikowanego na stronie internetowej NGSP (www.ngsp.org):

$$\text{HbA1c}_{\text{NGSP}} = [0.09148 \times \text{HbA1c}_{\text{IFCC}}] + 2.152$$

Stosowanie dwóch systemów standaryzacji jest porządkowane przez systematycznie publikowane stanowiska komitetu uzgodnieniowego ds. globalnej standaryzacji oznaczeń HbA1c. Zgodnie ze stanowiskiem z 2010 r. oznaczenia HbA1c powinny być standaryzowane na całym świecie z wykorzystaniem systemu IFCC. Oznacza to, że obecne i wprowadzane na rynek metody oznaczania HbA1c powinny być metrologicznie spójne z referencyjną metodą IFCC. Zaleca się wyrażanie wyników w jednostkach SI – mmol HbA1c na mol Hb (mmol/mol) i jednostkach tradycyjnych (%). Ta sama zasada obowiązuje w przypadku publikacji naukowych. Zaleca się także rozpowszechnianie tabel pomocnych w przeliczaniu wyników z jednych jednostek na drugie, jak tabela w załączeniu (12). W niektórych krajach wyrażanie poziomu HbA1c w mmol/mol wdrożono decyzją administracyjną.

Tabela. Przeliczanie poziomu HbA1c w jednostkach tradycyjnych (%) i jednostkach układu SI (mmol/mol).

HbA1c (%)	HbA1c (mmol/mol)
4,0	20
4,5	26
5,0	31
5,5	37
6,0	42
6,5	48
7,0	53
7,5	58
8,0	64
8,5	69
9,0	75
9,5	80
10,0	86
10,5	91
11,0	97
11,5	102
12,0	108

Istotnym problemem we wdrażaniu nowego programu standaryzacji oznaczeń HbA1c niosącego zmiany jednostek i wyników jest przekazanie stosownych informacji szerokiej rzeszy użytkowników wyników, obejmującej zarówno lekarzy, jak i osoby z cukrzycą. Szczególną trudność może sprawiać edukacja pacjentów od lat przyzwyczajonych do jednostek i wyników wg standaryzacji NGSP. Za próbę rozwiązania tych problemów można uznać przeliczanie poziomu HbA1c na szacowaną średnią glikemię (*estimated average glucose*, eAG), jako że chorzy na cukrzycę, szczególnie ci prowadzący samokontrolę glikemii, są obeznani ze stężeniami glukozy i jednostkami, w jakich są wyrażane. Podstawą

dla takiego postępowania są wyniki badania ADAG (*A1c-derived average glucose*), w którym potwierdzono znamiennej korelację pomiędzy poziomem HbA1c i średnią glikemią u osób z cukrzycą typu 1 i typu 2 oraz wolnych od cukrzycy i zaproponowano wzory do wyliczania eAG (13):

$$eAG_{mg/dl} = 28,7 \times HbA1c - 46,7$$

$$eAG_{mmol/l} = 1,59 \times HbA1c - 2,59$$

Należy jednak podkreślić, że w przypadku indywidualnego pacjenta eAG jest podatna na te same czynniki zakłócające, co oznaczenie HbA1c. Jest to jeden z powodów, dla których wyliczana z poziomu HbA1c średnia glikemia nie może zastąpić jej samokontroli. Wyliczanie eAG nie jest rekomendowane w zaleceniach praktyki klinicznej, w powszechnej opinii wymaga dalszych badań, zgłaszane są też wobec niego zastrzeżenia (14).

Zastosowanie oznaczeń HbA1c w diagnostyce cukrzycy

Wyniki takich badań jak DCCT, UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) i wielu innych usankcjonowały stosowanie HbA1c jako retrospektywnego wskaźnika wyrównania metabolicznego cukrzycy i niezależnego czynnika ryzyka jej przewlekłych powikłań, stworzyły też podstawy do określania stężeń HbA1c będących celem leczenia cukrzycy (8, 15). Systematyczne oznaczanie HbA1c jako retrospektywnego wskaźnika glikemii w monitorowaniu leczenia cukrzycy jest w zaleceniach praktyki klinicznej towarzystw diabetologicznych uznawane za obligatoryjne (14, 16). Rekomendowana częstość wykonywania oznaczeń zależy od przebiegu

choroby, jej wyrównania metabolicznego, wyedukowania pacjenta, jego współpracy i in. Zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego (PTD) z 2012 r. u pacjentów ze stabilnym przebiegiem choroby, osiągających cele leczenia, HbA1c należy oznaczać raz w roku, natomiast u chorych nieosiągających celów leczenia lub w przypadku zmiany postępowania terapeutycznego oznaczenia HbA1c należy wykonywać co najmniej raz na kwartał (16).

Interpretując wyniki oznaczeń w HbA1c w monitorowaniu leczenia cukrzycy, nie należy ich odnosić do żadnych zakresów wartości referencyjnych lub „oczekiwanych” dotyczących ludzi zdrowych, ale do docelowego poziomu HbA1c będącego wartością graniczną, powyżej której narasta ryzyko rozwoju przewlekłych powikłań cukrzycy. W większości zaleceń praktyki klinicznej mieści się on w zakresie 6–7% (standaryzacja NGSP). Ostatnio zaznacza się tendencja do indywidualizacji celów leczenia, w tym poziomu HbA1c. American Diabetes Association rekomenduje HbA1c < 7% jako docelowy poziom u większości chorych, poziom < 6,5% – u osób z krótkotrwałą chorobą, bez współistniejących schorzeń sercowo-naczyniowych, u których ten cel leczenia można osiągnąć bez istotnego ryzyka hipoglikemii, natomiast u chorych z wieloletnią cukrzycą, zaawansowanymi powikłaniami i krótkim oczekiwanym okresem przeżycia zaleca się utrzymywanie HbA1c < 8% (14). W zaleceniach PTD poziom HbA1c ≤ 6,5% jest celem leczenia w cukrzycy typu 1, krótkotrwałej cukrzycy typu 2 oraz u dzieci i młodzieży niezależnie od typu cukrzycy; HbA1c ≤ 6,1% – u kobiet planujących ciążę i będących w ciąży; HbA1c ≤ 8% – u chorych w wieku > 70 lat, z wieloletnią cukrzycą powikłaną chorobami sercowo-naczyniowymi (16).

HbA1c jako retrospektywny wskaźnik glikemii była od dawna uważana za test potencjalnie przydatny w rozpoznawaniu cukrzycy. Badania nad takim jej zastosowaniem prowadzono od lat 90. XX w. W wielu z nich wykazano korzystną charakterystykę diagnostyczną HbA1c w rozpoznawaniu cukrzycy; stosowana jako pojedynczy test lub łącznie z badaniem glikemii poprawiała efektywność wykrywania tej choroby (17, 18, 19). Pomimo zachęcających wyników badań naukowych oznaczanie HbA1c w celach diagnostycznych długo nie było wprowadzane do praktyki klinicznej, głównie z powodu problemów metodycznych. Prace nad standaryzacją dopiero się rozpoczynały, metody oznaczania HbA1c były obciążone dużą zmiennością analityczną, a harmonizacja wyników była niewystarczająca. Opracowanie i wdrożenie na przełomie ubiegłego i bieżącego stulecia programów standaryzacji oznaczeń i schematów kontroli jakości analitycznej stworzyły warunki do ponownego rozważenia możliwości stosowania oznaczeń HbA1c dla celów diagnostycznych. W 2008 r. powołano Międzynarodowy Komitet Ekspertów, którego zadaniem był przegląd aktualnego stanu wiedzy i ocena możliwości wykorzystania oznaczeń HbA1c do rozpoznawania cukrzycy i stanów przedcukrzycowych. Komitet w swoim raporcie opublikowanym w 2009 r. wskazał na zalety HbA1c jako testu diagnostycznego w porównaniu do oznaczeń glikemii. W opinii ekspertów HbA1c jako retrospektywny wskaźnik glikemii zapewnia zintegrowaną jej ocenę, cechuje się małą zmiennością wewnątrzsobniczą, a jej oznaczenia są mniej podatne na interferencje czynników przedanalizacyjnych. Komitet ostatecznie zarekomendował stosowanie oznaczeń HbA1c w celach diagno-

stycznych oraz zaproponował wartości decyzyjne poziomu HbA1c w rozpoznawaniu cukrzycy i stanów zwiększonego ryzyka zachorowania – przedcukrzycowych (20). Wartości decyzyjne określono na podstawie analizy danych opisujących związek pomiędzy poziomem HbA1c a częstością (ryzykiem) retinopatii cukrzycowej – powikłania, którego rozwój zależy praktycznie wyłącznie od hiperglikemii. Konkluzje raportu Komitetu Ekspertów stały się podstawą dodania w zaleceniach praktyki klinicznej ADA z 2010 r. HbA1c do grupy badań dotychczas stosowanych w rozpoznawaniu cukrzycy (glikemia na czczo, w 2 godz. doustnego testu tolerancji glukozy DTTG i przygodna). Zgodnie z tymi zaleceniami kryterium rozpoznania cukrzycy jest poziom HbA1c $\geq 6,5\%$, a stanu przedcukrzycowego – HbA1c w zakresie 5,7–6,4% (przy użyciu metod standaryzowanych w NGSP). Zalecenie takiego wykorzystania oznaczeń HbA1c zostało utrzymane w zaleceniach na rok 2011 i 2012 (14, 21).

Propozycja stosowania oznaczeń HbA1c przy rozpoznawaniu cukrzycy wzbudziła szeroką dyskusję. Zwraca się w niej uwagę na znane, omówione powyżej czynniki przedanalizyczne wpływające na poziom HbA1c niezależnie od glikemii, ale również na zależność HbA1c od czynników rasowych i etnicznych oraz wieku, co może ograniczać powszechne stosowanie jednej wartości odcięcia (22, 23). Zwraca się też uwagę na brak zgodności pomiędzy rozpoznaniem cukrzycy na podstawie poziomu HbA1c i wyników DTTG i/lub glikemii na czczo – te rozbieżności również wykazują zależność od rasy (24). Warto w tym miejscu zwrócić uwagę, że choć cukrzyca jest rozpoznawana na podstawie wyników

trzech (czterech) badań laboratoryjnych, to żadne z nich nie spełnia warunków złotego standardu diagnostycznego. Zarówno oznaczenia glikemii, jak i HbA1c mają swoje ograniczenia, a rekomendowane obecnie wartości decyzyjne są oparte na analizie związku tych parametrów z ryzykiem rozwoju retinopatii cukrzycowej. Dlatego wyznaczanie czułości i swoistości diagnostycznej oraz wartości predykcyjnej wyników oznaczeń HbA1c poprzez zestawienie ich z wynikami DTTG nie wydaje się poprawne. Należy też podkreślić, że w zaleceniach ADA poziom HbA1c $\geq 6,5\%$ jest jednym z kryteriów diagnostycznych i wymaga potwierdzenia [14, 21]. Eksperti Światowej Organizacji Zdrowia w swoim stanowisku, popartym przez prezesów ADA, European Association for the Study of Diabetes (EASD) i International Diabetes Federation (IDF), określają HbA1c jako narzędzie diagnostyczne mogące być przydatne w rozpoznawaniu cukrzycy, ale nie powinno ono zastąpić dotychczas wykonywanych badań glikemii i nie powinno być wykorzystywane przy występowaniu czynników zakłócających, np. zmian okresu przeżycia erytrocytów (25). Obecnie jedynym krajem, w którym poziom HbA1c jest kryterium rozpoznawania cukrzycy „równoważnym” glikemii, są Stany Zjednoczone. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego jest ujęte w zapisie zamieszczonym w tegorocznych zaleceniach klinicznych: „Obecnie PTD nie zaleca stosowania oznaczenia hemoglobiny glikowanej (HbA1c) do diagnostyki cukrzycy, ze względu na brak wystarczającej standaryzacji metod laboratoryjnych w Polsce oraz nieustaloną wartość diagnostyczną HbA1c w rozpoznaniu cukrzycy dla polskiej populacji” (16).

Piśmiennictwo:

1. Niederau C.M., Reinauer H.: Glycohemoglobins. (w:) Thomas L. (red.): Clinical Laboratory Diagnostics Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Mein 1998, 142–148.
2. Sacks D.B., Arnold M., Bakris G.L. et al.: Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus Clin. Chem. 2011, 57, e1–e47.
3. Khera P.K., Joiner C.H., Carruthers A. et al.: Evidence for Interindividual Heterogeneity in the Glucose Gradient across the Human Red Blood Cell Membrane and Its Relationship to Hemoglobin Glycation. Diabetes 2008, 57, 2445–2452.
4. Nayak A.U., Holland M.R., Macdonald D.R. et al.: Evidence for Consistency of the Glycation Gap in Diabetes. Diabetes Care 2011, 34, 1712–1716.
5. Pani L.N., Korenda L., Meigs J.B. et al.: Effect of aging on A1C levels in individuals without diabetes: evidence from the Framingham Offspring Study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2004. Diabetes Care 2008, 31, 1991–1996.
6. Ziemer D.C., Kolm P., Weintraub W.S. et al.: Glucose independent, black-white differences in hemoglobin A1c levels: a cross-sectional analysis of 2 studies. Ann. Intern. Med. 2010, 152, 770–777.
7. Saaddine J.B., Fagot-Campagna A., Rolka D. et al.: Distribution of HbA1c levels for children and young adults in the U.S.: Third National Health and Nutrition Examination Survey. Diabetes Care 2002, 25, 326–330.
8. The Diabetes Control and Complications Trial 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, 977–986.
9. Little R.R., Rohlfing C.L., Wiedmeyer H.-M., Myers G.L., Sacks D.B., Goldstein D.E. and for the NGSP Steering Committee. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A Five-Year Progress Report. Clin. Chem. 2001, 47, 1985–1992.
10. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Scientific Division Working Group on HbA1c. Standardisation and Network of Reference Laboratories for HbA1c. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood. Clin. Chem. Lab. Med. 2002, 40 (1), 78–89.
11. Weykamp C., John G., Mosca A. et al.: The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: A 6-Year Progress Report. Clin. Chem. 2008, 54, 240–248.
12. Hanas R., John G. on behalf of the International HbA1c Consensus Committee. 2010 Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1c Measurement. Clin. Chem. 2010, 56, 1362–1364.
13. Nathan D.M., Kuenen J., Borg R. et al.: Translating the A1C Assay into Estimated Average Glucose Values. Diabetes Care 2008, 31, 1473–1478.
14. American Diabetes Association Position Statement. Standards of Medical Care in Diabetes – 2012. Diabetes Care 2012, 35, suppl. 1, s11–s64.
15. American Diabetes Association Position Statement. Implications of the United Kingdom Prospective Diabetes Study. Diabetes Care 2002, 25, suppl. 1, s28–s33.
16. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2012. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. Diabetologia Kliniczna 2012, 1, supl. A.
17. Rohlfing C.L., Little R.R., Wiedmeyer H.M. et al.: Use of GHb (HbA1c) in Screening for Undiagnosed Diabetes in the U.S. Population. Diabetes Care 2000, 23, 187–191.
18. Perry R.C., Shankar R.R., Fineberg N. et al.: HbA1c Measurement Improves the Detection of Type 2 Diabetes in High-Risk Individuals With Nondiagnostic Levels of Fasting Plasma Glucose: The Early Diabetes Intervention Program (EDIP) Diabetes Care 2001, 24, 465–471.
19. Wang W., Lee E.T., Fabsitz R. et al.: Using HbA1c to Improve Efficacy of the American Diabetes Association Fasting Plasma Glucose Criterion in Screening for New Type 2 Diabetes in American Indians: The Strong Heart Study. Diabetes Care 2002, 25, 1365–1370.
20. The International Expert Committee. International Expert Committee Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. Diabetes Care 2009, 32, 1327–1335.
21. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2012, 35, S64–S71.
22. Davidson M.B., Schriger D.L.: Effect of age and race/ethnicity on HbA1c levels in people without known diabetes mellitus: Implications for the diagnosis of diabetes. Diab. Res. Clin. Pract. 2010, 87, 415–421.
23. Tay T.L., Foo J.P., Tan E. et al.: HbA1c may not be a sensitive determinant of diabetic status in the elderly. Diab. Res. Clin. Pract. 2011, 92, e31–e33.
24. Christensen D.L., Witte D.R., Kaduka L. et al.: Moving to an A1C-Based Diagnosis of Diabetes Has a Different Impact on Prevalence in Different Ethnic Groups. Diabetes Care 2010, 33, 580–582.
25. Presidents' statement on WHO recommendation on HbA1c for diabetes diagnosis. Diab. Res. Clin. Pract. 2011, 93, 310–311.

dr hab. n.med. Bogdan Solnica prof. UJ
Zakład Diagnostyki
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
Kraków

OCENA W PEŁNI ZAUTOMATYZOWANEGO ANALIZATORA CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING DO OZNACZANIA HbA1c METODĄ ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ

EVALUATION OF FULLY AUTOMATED ANALYZER CAPILLARYS 2 FLEX PIERCING TO MEASURE HbA1c
USING CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Anna Rodziewicz-Lurzyńska, Dagna Bobilewicz

Streszczenie

Obecnie w laboratoriach medycznych hemoglobina glikowana jest oznaczana metodami immunochemicznymi i chromatograficznymi (HPLC), jednakże można ją również wykrywać wykorzystując technikę elektroforezy, do niedawna uważaną za kosztowną i pracochłonną. Capillarys 2 Flex Piercing jest w pełni zautomatyzowanym analizatorem do oznaczania hemoglobiny glikowanej, wykorzystującym technikę elektroforezy kapilarnej. Uzyskano bardzo dobre wyniki korelacji (Vitros 5600), powtarzalności i odtwarzalności. Analizator może być stosowany w rutynowej pracy w laboratorium medycznym.

Słowa kluczowe

HbA1c, elektroforeza kapilarna, Capillarys 2 Flex Piercing.

Summary

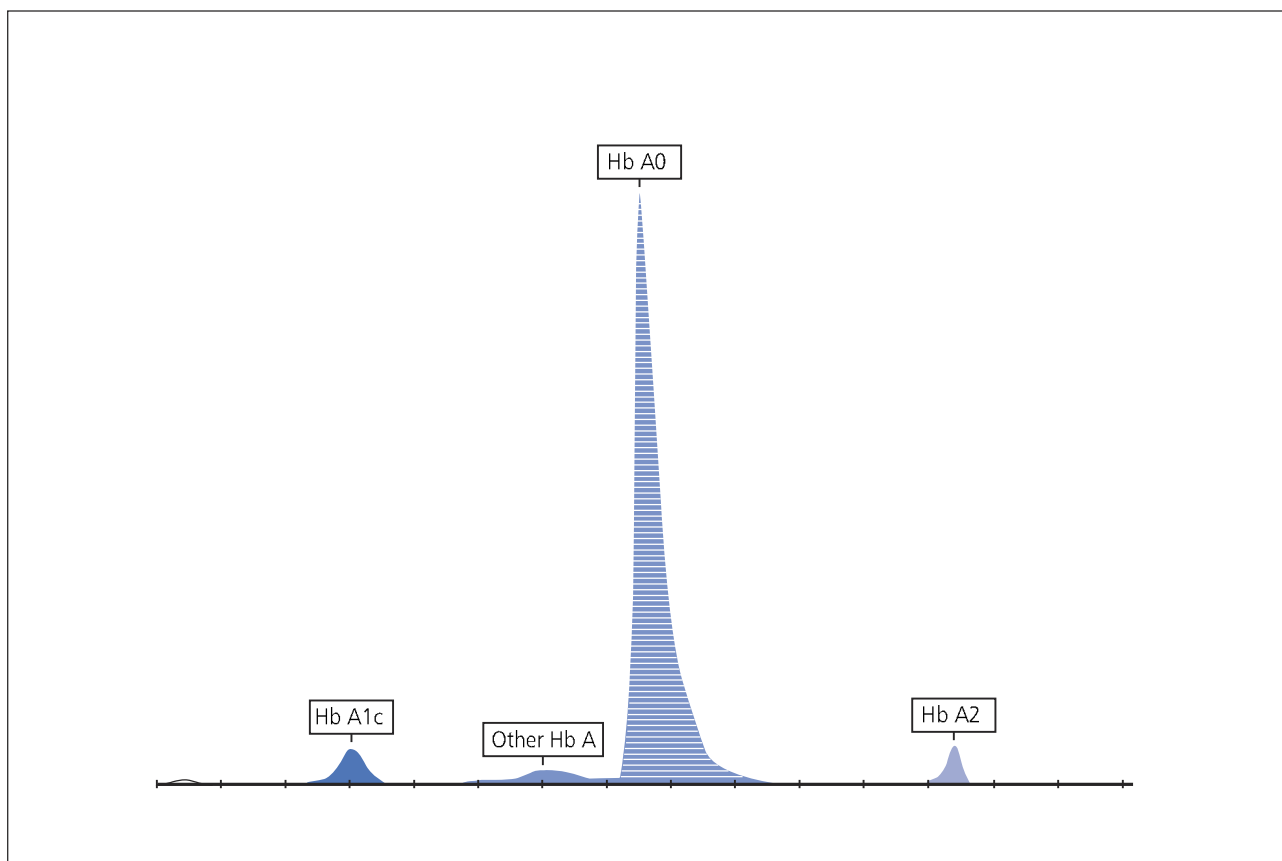
Nowadays HbA1c is measured in medical laboratories by means of immunochemical and chromatography (HPLC) methods, however it can also be assessed with the use of the electrophoretic technique. Capillarys 2 Flex Piercing is a fully automatic analyzer for measuring HbA1c using capillary electrophoresis. Tests have shown very good correlation (Vitros 5600), repeatability, and [HYPERLINK „http://dict.pl/dict?word=reproducibility&lang=EN”](http://dict.pl/dict?word=reproducibility&lang=EN) reproducibility. The analyzer may be used in medical laboratories in routine practice.

Key words

HbA1c, capillary electrophoresis, Capillarys 2 Flex Piercing.

Capillarys 2 Flex Piercing jest w pełni zautomatyzowanym analizatorem do oznaczania hemoglobiny glikowanej, wykorzystującym technikę elektroforezy kapilarnej w roztworze. Analizator wyposażony jest w 8 równocześnie działających kapilar zbudowanych z krzemu. Hemoglobiny rozdzielane są według ruchliwości elektrycznej, jak i przepływu elektroosmotycznego w buforze zasadowym. Wykrywanie hemoglobin następuje bezpośrednio na końcu katodowym kapilary przy długości fali absorpcji 415 nm. Identyfikacja frakcji jest przeprowadzana automatycznie przez program Phoresis (wykres 1). Wyniki wyrażane są zarówno w % (NGSP), jak i w mmol/mol (IFCC), ponadto wyliczane jest średnie stężenie glukozy (eAG). Minimalna ilość krwi pełnej wymaganej do badania to 1 ml dla próbek okrągłodennych i 100 µl dla próbek stożkowych ze specjalnym adapterem. Pojemność podstawowa aparatu, niezakłócająca przepustowości aparatu, to 104 próbki. Analizator w ciągu godziny wykonuje 37 badań.

tyfikacja frakcji jest przeprowadzana automatycznie przez program Phoresis (wykres 1). Wyniki wyrażane są zarówno w % (NGSP), jak i w mmol/mol (IFCC), ponadto wyliczane jest średnie stężenie glukozy (eAG). Minimalna ilość krwi pełnej wymaganej do badania to 1 ml dla próbek okrągłodennych i 100 µl dla próbek stożkowych ze specjalnym adapterem. Pojemność podstawowa aparatu, niezakłócająca przepustowości aparatu, to 104 próbki. Analizator w ciągu godziny wykonuje 37 badań.



Wykres 1. Prawidłowy rozdział elektroforetyczny hemoglobiny wykonany w analizatorze Capillarys 2 Flex Piercing.

Badania zostały przeprowadzone w ciągu 3 miesięcy (czerwiec, lipiec, sierpień 2012 roku) w siedzibie firmy HORIBA ABX Sp. z o.o. Materiałem była krew pełna pobrana na antykoagulant EDTA, pozyskana od pacjentów SP CSK w Warszawie. Próbkę krwi mrożono w temperaturze -80°C , a następnie rozmrażano w dniu badania. Do zestawu odczynników były dołączone kalibratory i kontrole – 2 poziomy, umożliwiające sprawdzenie pracy analizatora. Oznaczenia wykonywano zgodnie z instrukcją producenta. Badaniu podano 320 próbek krwi pełnej. Do opracowania wyników wykorzystano program STATISTICA 10.

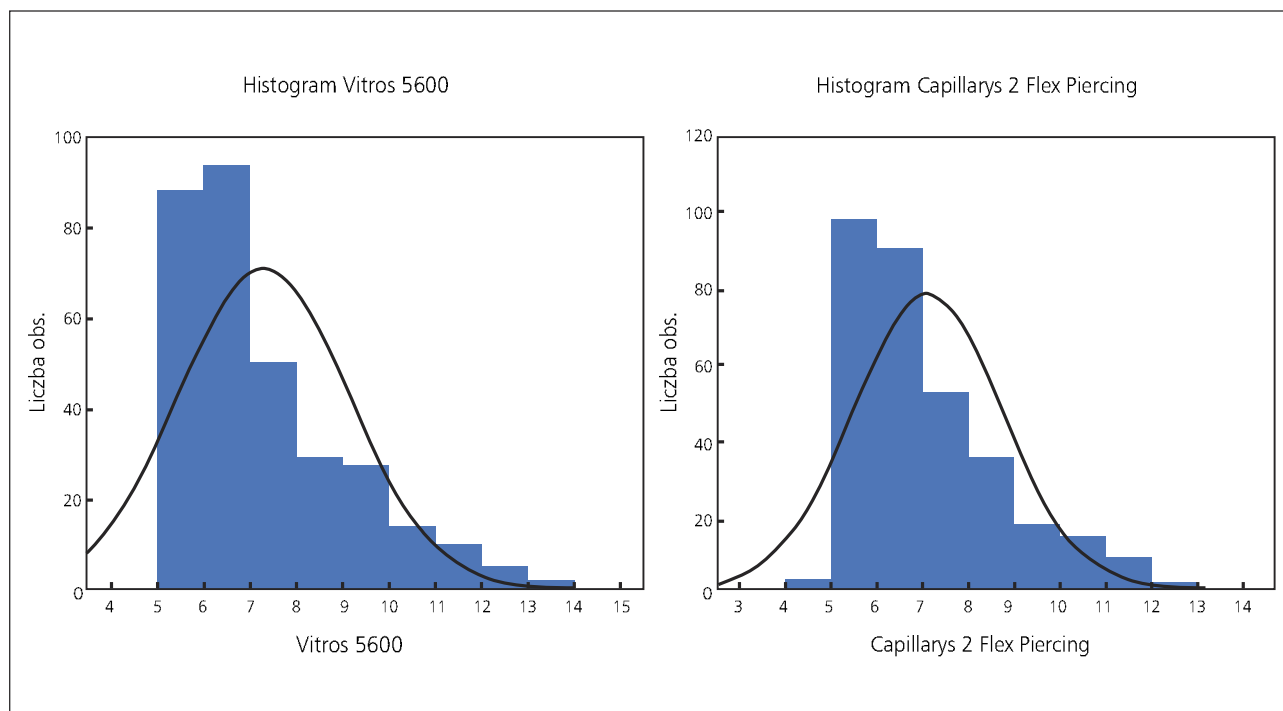
Przeprowadzono ocenę:

- korelacji wyników (Vitros 5600 vs. Capillarys 2 Flex Piercing),
- precyzji aparatu (3 poziomy HbA1c),
- odtwarzalności (materiał kontrolny, oznaczany w różnych odstępach czasu).

WYNIKI

Korelacja

Badanie zostało przeprowadzone w 320 próbkach krwi pełnej. Jako metodę odniesienia przyjęto stosowaną w rutynowej pracy metodę turbidymetryczną immunoinhibicji, stosowaną w analizato-



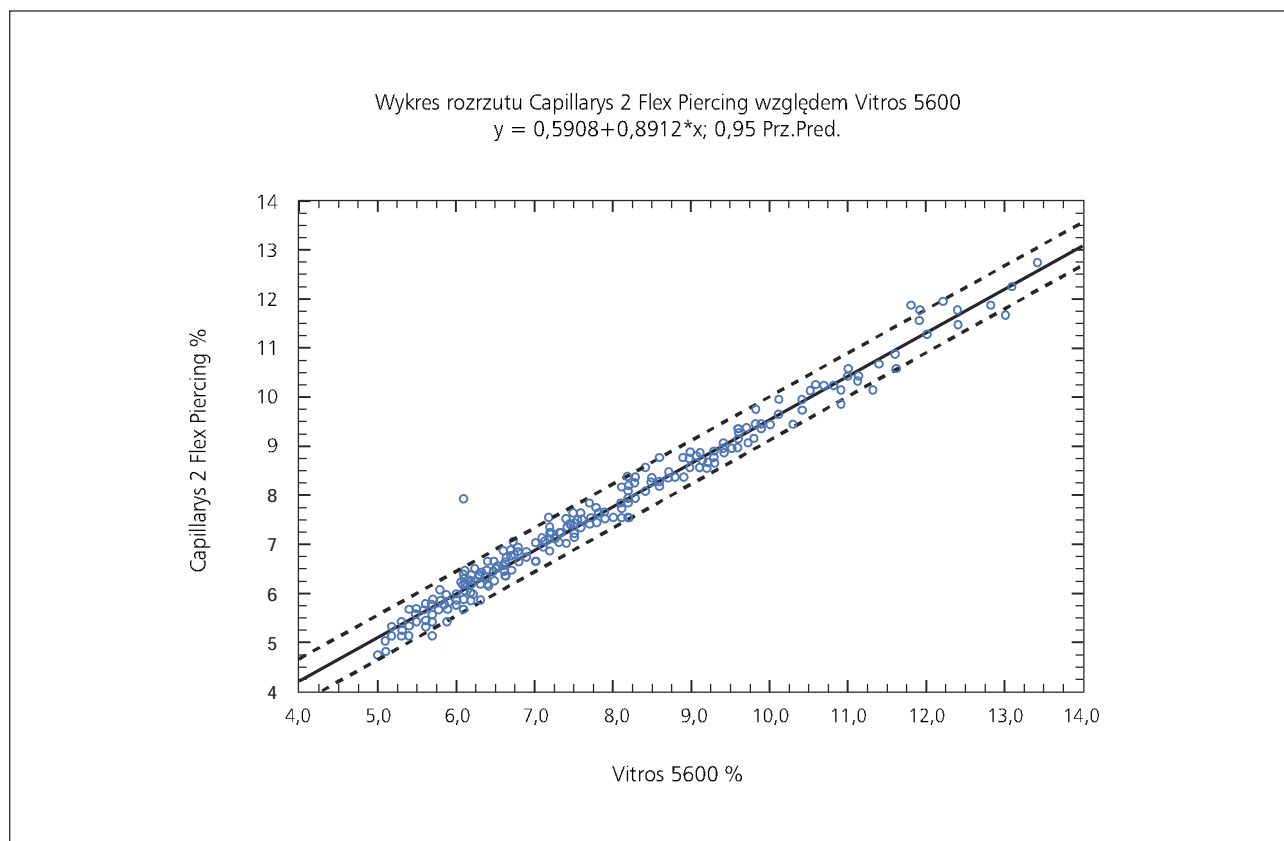
Ryc. 1. Przedstawienie graficzne rozkładu wyników oznaczeń HbA1c uzyskanych w aparatach Vitros 5600 i Capillars 2 Flex Piercing.

rze VITROS 5600, gdzie % HbA1c jest obliczany na podstawie oznaczeń ilościowych hemoglobiny oraz hemoglobiny A1c. Badania korelacji wykonywano w oparciu o wyniki uzyskane z tej samej próbki krwi, przy czym po oznaczeniu hemoglobiny glikowanej w analizatorze VITROS 5600 materiał był mrożony w temperaturze -80°C . Temperatura ta miała zapewnić trwałość próbki przez 3 miesiące. Następnie w dniu badania w aparacie Capillars 2 Flex Piercing próbki były rozmrażane. Wyniki wyrażono

w %. Przedstawienie graficzne rozkładu wyników oznaczeń HbA1c uzyskanych w aparatach Vitros 5600 i Capillars 2 Flex Piercing przedstawia rycina 1. Porównanie wyników oznaczeń hemoglobiny glikowanej wykonanych w obu aparatach ujęto w tabeli 1. Dla 134 próbek uzyskano wyniki w normie (poniżej 6,4% HbA1c), co stanowiło 42% wszystkich próbek. Natomiast wyniki patologiczne (powyżej 6,4% HbA1c) stanowiły 58% (186) wszystkich badanych próbek.

Tabela 1. Porównanie wyników oznaczeń hemoglobiny glikowanej wykonanych w analizatorze Vitros 5600 i Capillars 2 Flex Piercing (N = 320).

Analizator	Wartość średnia %	Min. – max.	Odchylenie standard. SD	Równanie regresji	Współczynnik korelacji r
VITROS 5600	7,3	5,0 – 13,4	1,8	$y = 0,59 + 0,89$	0,991
Capillars 2 Flex Piercing	7,1	4,7 – 12,7	1,6		



Ryc. 2. Wykres rozrzutu wyników oznaczeń hemoglobiny glikowanej (%) we krwi pełnej wykonanych w analizatorze Vitros 5600 i Capillarys 2 Flex Piercing – prosta regresji z 95% przedziałem ufności (N = 320).

Współczynnik korelacji $r = 0,991$

Uzyskane wyniki wykazywały dużą zgodność, a wysoki współczynnik korelacji mieści się w oczekiwanych granicach tego rodzaju porównań (rycina 2, tabela 2).

Średni procent hemoglobiny glikowanej oznaczanej w analizatorze Vitros 5600 był istotnie większy

(równy 7,3) niż jej wartość w analizatorze Capillarys 2 Flex Piercing (równy 7,1); $t(319) = 12,566$; $p < 0,001$. Wynika to najprawdopodobniej z różnic w stosowanych metodach. Jednakże za wyniki bardziej wiarygodne należy przyjąć oznaczenia wykonane w analizatorze Capillarys 2 Flex Piercing.

Tabela 2. Test t Studenta dla grup zależnych (danych sparowanych) policzony w kategorii % HbA1c.

% HbA1c	Średnia %	Odchylenie standard.	Różnica	statystyka t	df	Istotność testu t (2 strona)	95% przedział ufności różnicy	
							min.	max.
VITROS 5600	7,3	1,8	0,2	12,566	319	0,000†	0,17	0,24
Capillarys 2 Flex Piercing	7,1	1,6						

Tabela 3. Zestawienie wyników powtórzeń oznaczeń krwi 3 pacjentów o różnej zawartości HbA1c.

L. p.	HbA1c (%)		
1	5,0	8,0	11,0
2	5,0	7,8	10,9
3	5,0	8,0	11,2
4	4,9	7,8	10,9
5	5,1	8,0	11,3
6	5,1	7,9	10,9
7	5,0	7,8	10,8
8	4,9	7,9	11,0
9	5,1	8,0	11,2
10	5,0	7,8	10,9
11	4,9	7,9	11,2
12	4,9	7,8	11,0
13	5,1	8,0	11,2
14	5,1	7,9	10,9
15	5,0	7,8	10,8
16	4,9	7,8	11,1
17	5,1	8,0	11,2
18	5,0	7,9	11,0
19	4,9	7,9	11,2
20	4,9	7,8	11,0
21	5,1	8,1	11,3
22	5,2	*	11,0
23	5,0	7,8	10,8
24	5,0	8,0	11,1

Precyzja aparatu

Badanie wykonano na 3 poziomach krwi pełnej (5,0%, 8,0%, 11,0 % HbA1c) w ciągu jednego dnia. Powtórzenia (łącznie 24) wykonano w statywie kontrolnym, w którym jedna próbka krwi była badana 8-krotnie. Każdy statyw analizowano 3-krotnie. Wyniki oznaczeń podsumowano obok (tabela 3).

Wyliczone wyniki współczynników zmienności (1,20–1,76 %) wskazują na bardzo dobrą powtarzalność aparatu Capillarys 2 Flex Piercing (tabela 4).

Odtwarzalność

Badanie wykonano w materiale kontrolnym na dwóch poziomach. Materiał kontrolny był mrożony w temperaturze –20°C i rozmrażany w dniu badania. Powtórzenia wykonano w różnych odstępach czasu (6.06, 22.06, 28.06, 9.08 i 14.08) na tym samym materiale kontrolnym. Wyniki oznaczeń przedstawiono w tabeli 5.

Współczynnik zmienności (2,48–2,82%) wskazuje na bardzo dobrą odtwarzalność aparatu (tabela 6).

Tabela 4. Ocena nieprecyzyjności oznaczeń HbA1c (Capillarys 2 Flex Piercing).

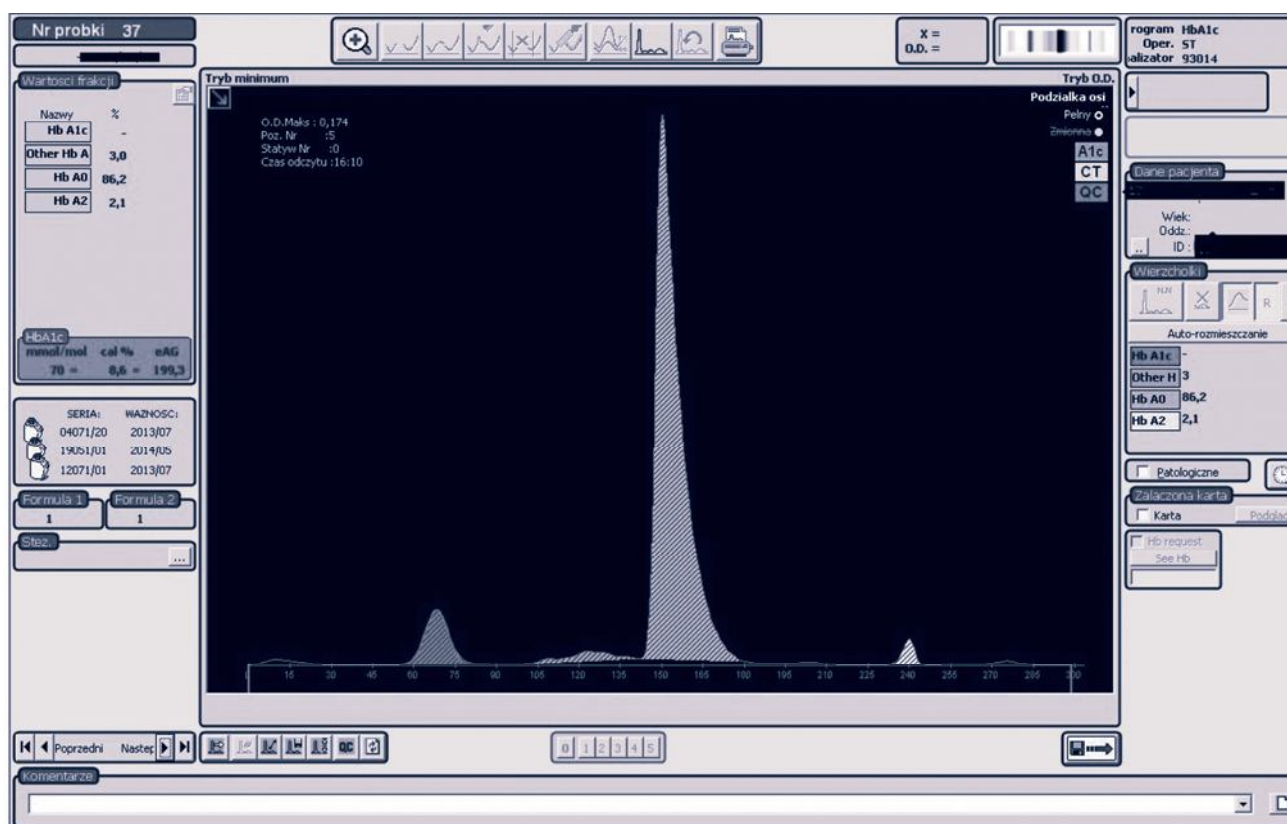
% HbA1c	Średnia x	Min. – max.	Odchylenie standard. SD	Współczynnik zmienności CV %
5,0	5,0	4,9 – 5,2	0,09	1,76
8,0	7,9	7,8 – 8,1	0,09	1,20
11,0	11,0	10,8 – 11,3	0,16	1,43

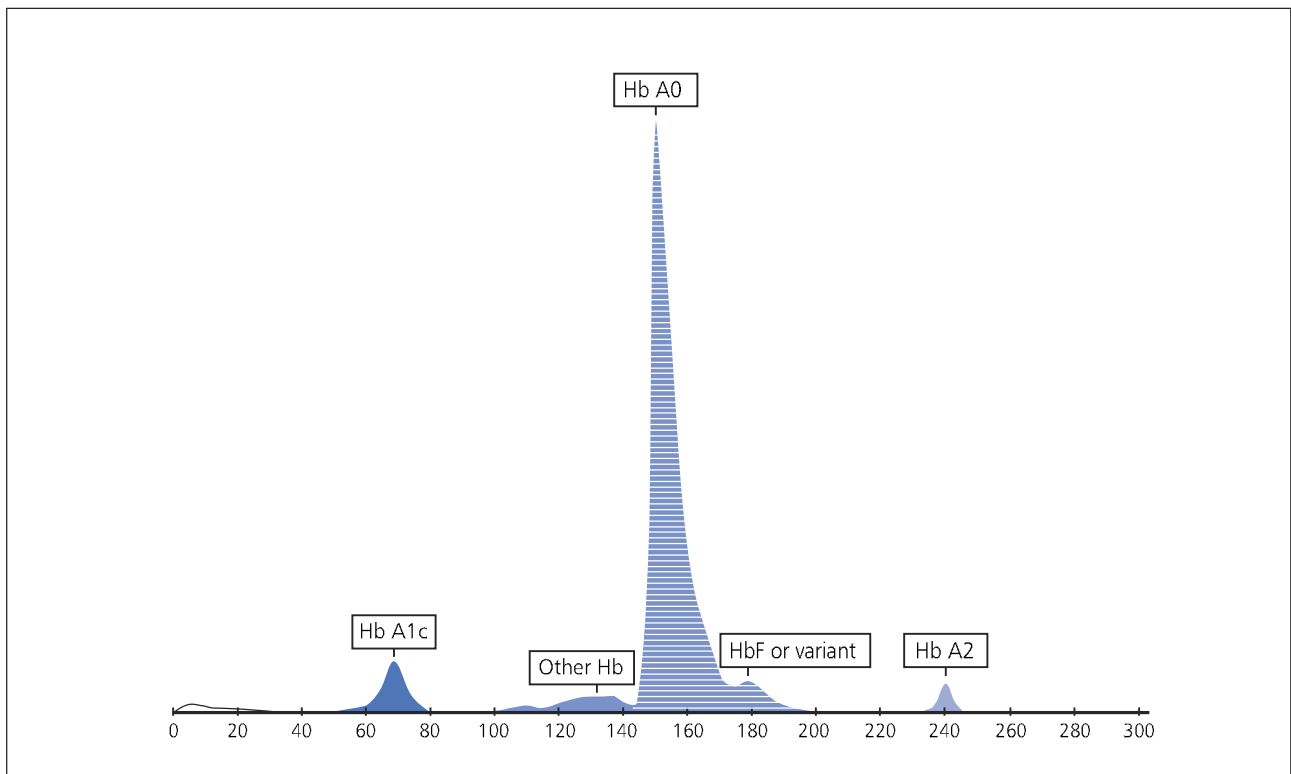
Tabela 5. Zestawienie wyników powtórzeń oznaczeń HbA1c w materiale kontrolnym (Capillars 2 Flex Piercing).

L. p.	Data badania									
	6.06	22.06	28.06	9.08	14.08	6.06	22.06	28.06	9.08	14.08
1	5,6	5,6	5,6	5,4	5,3	8,6	8,6	8,8	8,3	8,3
2	5,5	5,6	5,8	5,5	5,4	8,5	8,7	8,7	8,3	8,2
3	5,6	5,7	5,6	5,5	5,4	8,4	8,8	8,9	8,2	8,2
4	5,4	5,6	5,5	5,4	5,3	8,4	8,5	8,6	8,1	8,1
5	5,5	5,6	5,8	5,4	5,3	8,6	8,5	8,8	8,4	8,3
6	5,6	5,8	5,7	5,5	5,5	8,4	8,6	8,6	8,2	8,1
7	5,5	5,6	5,7	5,4	5,4	8,3	8,6	8,6	8,2	7,9
8	5,5	5,6	5,6	5,4	5,3	8,5	8,6	8,6	8,2	8,1

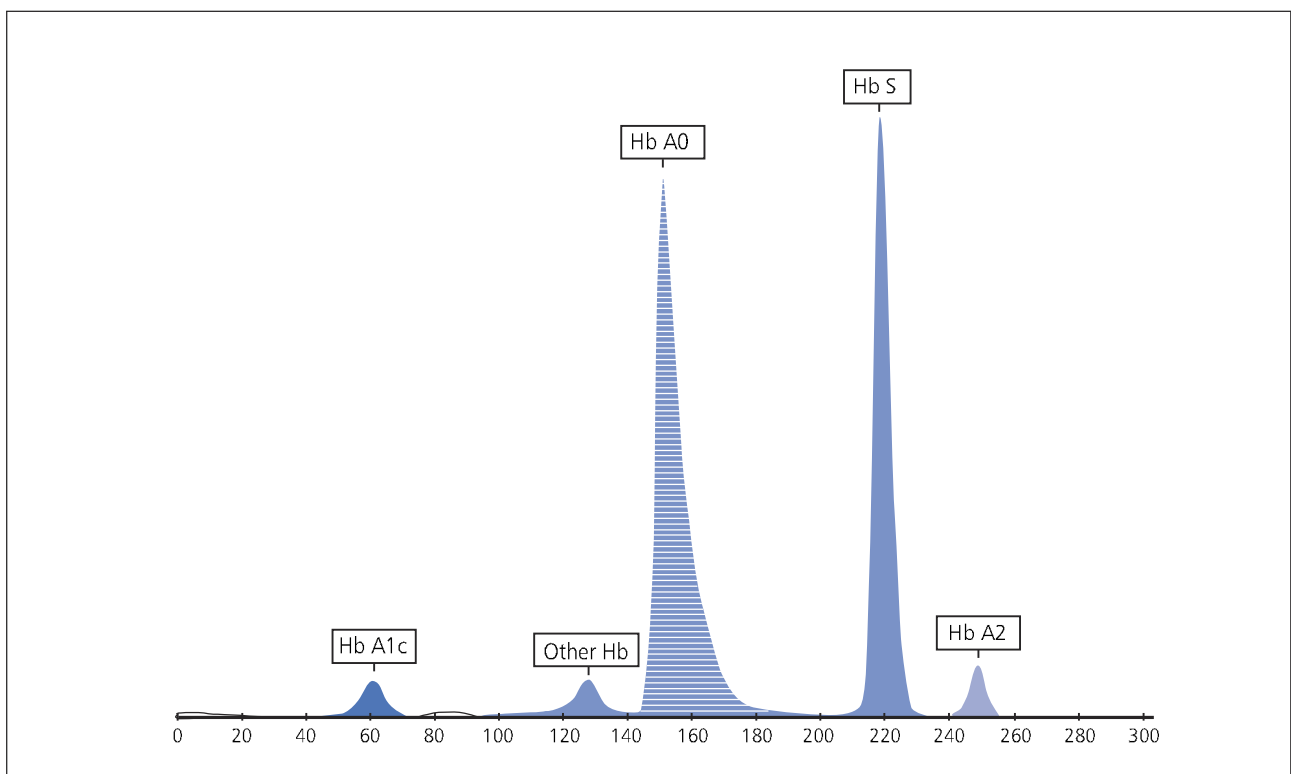
Tabela 6. Ocena nieprecyzyjności oznaczeń HbA1c w materiale kontrolnym (Capillars 2 Flex Piercing).

% HbA1c	Średnia x	Min. – max.	Odchylenie standard. SD	Współczynnik zmienności CV %
Poziom 1	5,5	5,4 – 5,8	0,14	2,48
Poziom 2	8,4	8,1 – 8,9	0,24	2,82

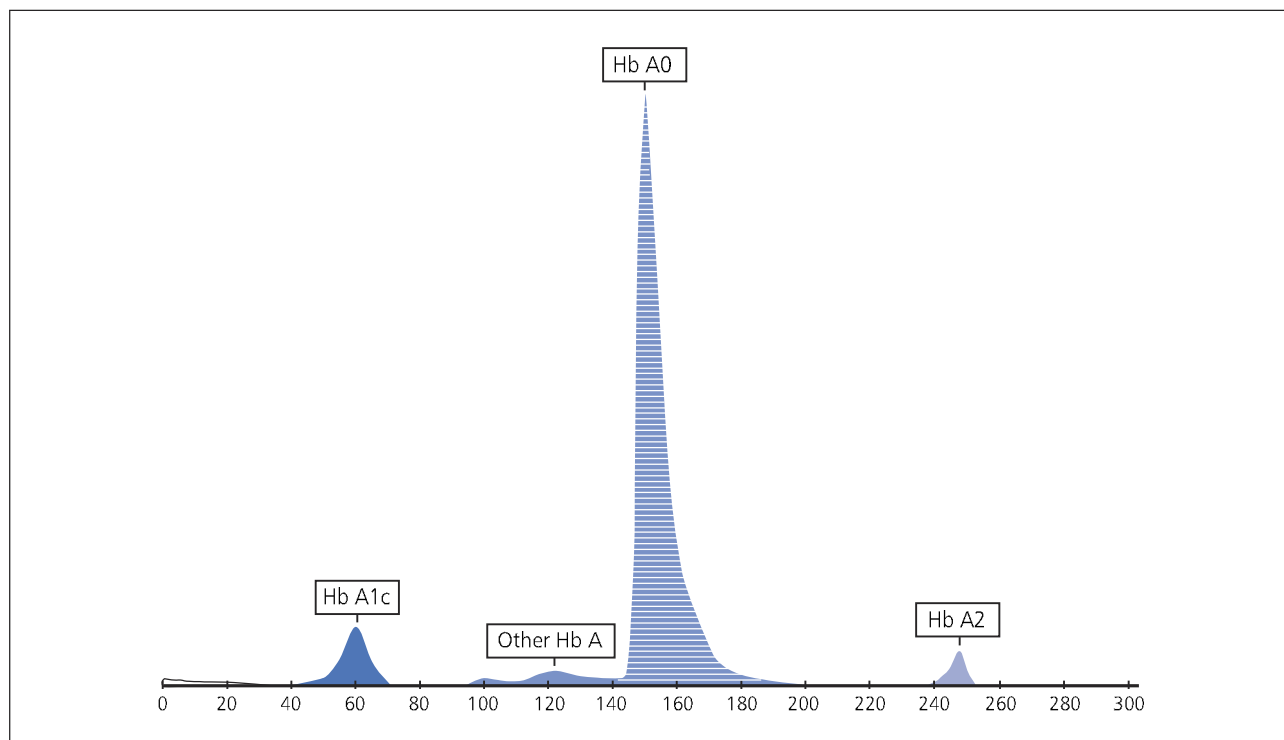
**Fot. 1.** Widok z ekranu Capillars 2 Flex Piercing przedstawiający rozdział elektroforetyczny hemoglobiny.



Wykres 2. Rozdział elektroforetyczny hemoglobinu – obecna hemoglobina F.



Wykres 3. Rozdział elektroforetyczny hemoglobinu – obecna hemoglobina S.



Wykres 4. Rozdział elektroforetyczny hemoglobin – podwyższone stężenie hemoglobiny glikowanej.

Podsumowanie

- Analizator automatycznie miesza, pobiera i hemolizuje krew. Dzięki oprogramowaniu Phoresis możliwa jest automatyczna identyfikacja poszczególnych frakcji, a praca operatora jest ograniczona do wizualnej oceny uzyskanego wyniku. Program oflagowuje wyniki, w których jest podwyższony % HbA1c oraz obecne są nietypowe warianty hemoglobin.
- Do pracy wykorzystywane są próbki zamknięte gumowym korkiem.
- Aparat prosty w obsłudze, nieskomplikowana konserwacja i wymiana odczynników. Kontrole i kalibratory można mrozić (od -18 do -20°C) i rozmrażać 8-krotnie przez okres 6 miesięcy.
- Prosty do interpretacji wynik w postaci wykresu i wartości liczbowych; uzyskane wyniki mogą być wyrażane zarówno w %, jak i w mmol/mol.
- Stosunkowo krótki czas analizy: ok. 18 min. – możliwa jest praca aparatu przez 24 godziny.
- Brak interferencji ze strony hemoglobiny acetylowanej ($\leq 9,0\%$), karbamylowanej ($\leq 8,1\%$), HbF ($\leq 15\%$), HbS ($\leq 40\%$), HbC ($\leq 44\%$) oraz HbE ($\leq 32\%$), a także wysokiego stężenia triglicerydów oraz bilirubiny (wykresy 2, 3 i 4).
- Wykorzystywana metoda jest referencyjna.
- Możliwość badań przesiewowych pacjentów z podejrzeniem hemoglobinopatii.
- Możliwość centralnej walidacji wyników z kilku analizatorów poprzez SQL Client/Server.
- Certyfikat NGSP-IFCC.
- Wady – brak czujnika skrzepów.

mgr Anna Rodziewicz-Lurzyńska
prof. dr hab. n.med. Dagna Bobilewicz
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
Wydziału Nauki o Zdrowiu
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

EUROMEDLAB MILANO 2013

RELACJA Z 20. KONGRESU IFCC-EFLM W MEDIOLANIE

W dniach 18–23 maja 2013 r. odbył się w Mediolanie **20. Kongres Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej IFCC-EFLM** (IFCC – International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, EFLM – European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), który ma miejsce co 2 lata i jest najważniejszym wydarzeniem w tej dziedzinie w Europie. W tym roku uczestniczyli w nim przedstawiciele wszystkich członków ww. organizacji, w tym również duża grupa z Polski.

Wygłoszono 4 wykłady plenarne, przeprowadzono 23 sympozja i 48 warsztatów organizowanych przy współudziale firm diagnostycznych, a także zaprezentowano około 1300 plakatów. W wystawie uczestniczyło 130 wystawców. Nowością było ograniczenie sesji wykładowych do godzin przedpołudniowych (9.00–11.45) i oparcie programu w dużej mierze na warsztatach edukacyjnych, odbywających się w godzinach 14.30–18.30.

Wykładowcy reprezentowali wysoki poziom wiedzy i doświadczenia. Każdy z uczestników mógł znaleźć problematykę szczególnie go interesującą.

Oto tytuły wykładów plenarnych:

- 1. Iron metabolism and pathophysiology** (*Tomas Ganz, USA*), w którym poruszona została między innymi rola hepcydyny tak w niedoborach, jak i w stanach przeładowania żelazem;
- 2. Sick molecules and amyloidosis** (*Giampaolo Merlini, Włochy*), w którym omówiono konsekwencje zmian w białkach i peptydach związane z ich przejściem ze stanu rozpuszczalnego do wysoko zorganizowanych struktur fibrylarnych określanych jako „amyloid”;
- 3. Molecular basis and clonal evolution of myeloproliferative neoplasm** (*Robert Kralovics, Austria*), w którym przedstawiono rolę badań molekularnych w rozpoznawaniu i wyborze opcji terapeutycznych w MPN;
- 4. Acute coronary syndrome: the present and future role of biomarkers** (*Berti Lindahl, Szwecja*), w którym potwierdzono kliniczną użyteczność oznaczeń troponin, wskazując jednocześnie na celowość opracowania markerów dla niestabilnej choroby wieńcowej.

W warsztatach organizowanych przy współudziale firmy Horiba Medical wzięła udział pani prof. Dagna Bobilewicz, przedstawiając wykład na temat rzadko poruszanego, lecz istotnego problemu rhabdomyolizy – „**The laboratory contribution to diagnosis and management of rhabdomyolysis**”. Wykład ten spotkał się z dużym uznaniem. Drugim wykładowcą reprezentującym firmę Horiba Medical była pani dr M. Hur z Korei, której wystąpienie było zatytułowane „**Umbilical cord blood analysis by automatic hematology analyzers**”.

Streszczenia wszystkich wykładów i plakatów są dostępne na stronie internetowej www.milan2013.org pod hasłem „Euromedlab 2013 Milano”.

Redakcja

PYTANIA TESTOWE

PRZYKŁADY PYTAŃ TESTOWYCH WYKORZYSTANYCH DLA STUDENTÓW KIERUNKU DIETETYKA (KURS MAGISTERSKI)
WARSZAWSKIEGO UNIwersYTETU MEDYCZNEGO

Zaznacz jedną prawidłową odpowiedź

1. Niedokrwistość z niedoboru żelaza u osób bez ostrych schorzeń charakteryzuje:

1. niskie stężenie ferrytyny
2. niskie stężenie transferyny
3. niska wartość MCV
4. współistniejący niedobór witaminy B₁₂
5. podwyższona wartość MCV

- a. 1, 3
- b. 1, 2, 3
- c. 1, 3, 5
- d. 1, 3, 4

2. Markery niedożywienia to wszystkie z wyjątkiem:

- a. transferyny
- b. albuminy
- c. prealbuminy
- d. białka CRP

3. Wszystkie poniższe stwierdzenia dotyczące stężenia hemoglobiny są prawdziwe z wyjątkiem:

- a. Jest obniżone we wszystkich rodzajach niedokrwistości.
- b. Może być podwyższone u osób mieszkających na dużych wysokościach.
- c. Może być kompensacyjnie podwyższone u osób z przewlekłą niewydolnością oddechową.
- d. Jest obniżone głównie w niedokrwistościach z niedoboru witaminy B₁₂.
- e. Jest podwyższone w czerwienicy rzekomej.

4. Który z poniższych parametrów jest dodatnio skorelowany z ryzykiem rozwoju miażdżycy?

- a. małe gęste LDL
- b. chol LDL
- c. chol non-HDL
- d. hCRP
- e. wszystkie ww.

5. Który z poniższych parametrów jest najwcześniejszym wskaźnikiem przewlekłej niewydolności nerek?

- a. kreatynina w surowicy
- b. wartość przesączania kłębuszkowego (eGFR)
- c. mocznik w surowicy
- d. dobowe wydalanie białka przekraczające 2 g.

6. Zakres wartości prawidłowych, podawany na wynikach badań laboratoryjnych, obejmuje:

- a. całą zdrową populację
- b. 95% zdrowej populacji
- c. 99% zdrowej populacji
- d. w zależności od wieku 66–95%.

7. Podwyższone wartości których z poniżej wymienionych parametrów są najbardziej charakterystyczne dla zewnątrzwątrobowego zastoj żółci?

- a. bilirubina związana, aminotransferazy, bilirubina w moczu
- b. bilirubina związana, enzymy błonowe
- c. bilirubina wolna, aminotransferazy, urobilinogen w moczu
- d. bilirubina wolna, enzymy błonowe.

8. Wszystkie poniższe stwierdzenia, dotyczące witaminy B₁₂ są prawdziwe z wyjątkiem:

- a. Jej działanie jest możliwe jedynie w obecności jonów żelaza.
- b. Przyczyną powstania jej niedoboru może być dieta wegetariańska.
- c. Zakażenia bruzdogłowcem szerokim jest jedną z przyczyn jej niedoboru.
- d. Jej niedobór może dawać objawy neurologiczne.

9. Które z poniższych stwierdzeń jest prawdziwe?

- a. Wszystkie zakażenia wirusem HCV mają gwałtowny przebieg kliniczny.
- b. W kamicy przewodów żółciowych aktywność aminotransferaz jest wybitnie podwyższona.
- c. Obecność przeciwciał anti-HBs jest najczęściej wyrazem odpowiedzi poszczepiennej.
- d. Laboratoryjnym testem potwierdzenia dla wątpliwych wyników anti-HCV jest dodatni wynik HCV RNA.
- e. Wszystkie powyższe odpowiedzi prawidłowe.

Odpowiedzi prawidłowe:

1a, 2d, 3d, 4e, 5b, 6b, 7b, 8a, 9c.

Opracowanie: **Dagna Bobilewicz**

KIEDY WARTOŚCI eGFR MOGĄ BYĆ PODWYŻSZONE?

Ustalenia międzynarodowe zalecają podawanie eGFR wyliczone z równania MDRD, równolegle ze stężeniami kreatyniny, z zaznaczeniem jednak, że dokładne wartości liczbowe należy podawać tylko wówczas, gdy są one niższe niż 60 ml/min, co zostało przyjęte jako wartość graniczna. W pozostałych przypadkach laboratorium powinno ograniczyć się do określenia > 60 ml/min. Przesączanie kłębuszkowe może być zwiększone nawet do 40% w pewnych sytuacjach klinicznych, do których m.in. zalicza się cukrzycę młodzieńczą jeszcze przed rozpoczęciem leczenia insuliną. Dochodzi wówczas do zwiększenia objętości całych nerek (zarówno kanalików, jak i kłębuszków). Jest to zjawisko niekorzystne i w dłuższym czasie prowadzi do uszkodzenia nerek.

Należy pamiętać, że eGFR (tzw. szacowany) daje ogólne informacje, natomiast punktem odniesienia jest określanie przesączania metodą bezpośrednią z zastosowaniem substancji egzogennych.

nefrologia.mp.pl 30.04.2012

ŚWIATOWY DZIEŃ NERKI

11 marca 2013 r. po raz siódmy był obchodzony Światowy Dzień Nerki, będący inicjatywą Międzynarodowego Towarzystwa Nefrologicznego i Międzynarodowej Federacji Fundacji Nerek. Jest on okazją do rozpropagowania wiedzy o przewlekłej chorobie nerek, na którą choruje około 12% społeczeństwa, a która ze względu na to, że przebiega w pierwszym okresie bezobjawowo, jest rozpoznawana zbyt późno, co utrudnia zapobieganie rozwojowi objawów klinicznych. W ramach kampanii edukacyjnej w wielu szpitalach organizowane są akcje informacyjne skierowane zarówno do osób z przewlekłą chorobą nerek, jak i tych, u których może ona występować jako współistniejąca bądź będąca powikłaniem innych jednostek chorobowych. Około 10 tys. osób zostało objętych akcją NEFROTEST prowadzoną w 15 miastach Polski, której celem były również przesiewowe badania laboratoryjne w kierunku chorób nerek.

nefrologia.mp.pl/aktualności 14.03.2013

CZY PUNKT ODCIĘCIA DLA HEMOGLOBINY A1c POWINIEN BYĆ TAKI SAM DLA WSZYSTKICH?

Jest szereg doniesień świadczących o tym, że u osób rasy czarnej zawartość HbA1c jest o 0,2–0,4% wyższa niż u osób rasy kaukaskiej bez względu na stężenie glukozy. Wykazano jednocześnie, że u rasy czarnej do rozwoju nefropatii dochodziło przy niższych wartościach hemoglobiny A1c, co przemawia przeciwko ustaleniu niższego punktu odcięcia dla tej grupy. Problem nadal pozostaje otwarty.

Ann. Intern. Med. Published on line 6.08.2012

CO TO JEST ADQI?

Acute Dialysis Quality Initiative – ADQI to organizacja powstała w wyniku poszukiwań konsensusu i rekomendacji w odniesieniu do ostrego uszkodzenia nerek (AKI), które może pojawić się nagle pod wpływem jednorazowego bodźca, a jednocześnie stanowi relatywnie częste powikłanie u chorych w stanie ciężkim. Stan ten jest trudny do rozpoznania w okresie, kiedy istnieje jeszcze możliwość wczesnego zastosowania interwencji terapeutycznej.

ADQI istotnie przyczyniła się do wprowadzenia klasyfikacji RIFLE (R – risk, I – injury, F – failure, L – loss of function, E – end stage), a także pojęcia zespołu kardio-nerkowego (cardiorenal syndrome) i nerkowo-wątrobowego (hepatorenal syndrome). Celem działań ADQI jest:

- standaryzacja postępowania diagnostycznego, terapeutycznego i prewencyjnego u chorych z AKI w stanie ciężkim;
- opracowanie odpowiednich rekomendacji zgodnych z zasadami medycyny opartej na faktach (*evidence based medicine* – EBM);
- wytyczenie dalszego kierunku prac związanych z tym problemem.

Ann. Intern. Med. Published on line 6.08.2012

[illegible]

HbA1c

Pentra C 200 i Pentra 400 umożliwiają szybki i wiarygodny pomiar hemoglobiny glikowanej metodą immunoturbidymetryczną

- hemoliza krwi pełnej: automatyczna (na pokładzie analizatora) lub manualna
- automatyczne przeliczanie wyników na % HbA1c
- odczynnik w kasetach (Pentra C 200) lub w fiolkach odczynnikowych (Pentra 400)
- stabilność kalibracji 30 dni



Pentra C 200



Pentra 400

HORIBA
Medical

HbA1c

HORIBA Medical oferuje wszystkie dostępne technologie pomiaru hemoglobiny glikowanej do monitorowania cukrzycy



Pentra C 200

Biochemia **HORIBA**
Medical



Pentra 400



Minicap Flex Piercing

Elektroforeza kapilarna
sebia



Capillars 2 Flex Piercing

HORIBA
Medical



GX

Wysokociśnieniowa
chromatografia
cieczowa HPLC



TOSOH

HORIBA ABX Sp. z o.o., Wał Miedzeszyński 598, 03-994 Warszawa, tel. +48 22 673 20 22, fax +48 22 673 20 26, www.horiba-abx.com.pl