



GHbA_{1c}-määrittysten vertailua kolmella eri analysaattorilla

**Bio-Rad Variant™ II Hemoglobiin Testing System,
Bio-Rad D-10™ Dual Program ja DCA 2000®+**

Päivi Erkkola

Maarit Somppi

Opinnäytetyö

Toukokuu 2006

Terveysala

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu/

Jyväskylän ammattikorkeakoulu

TIIVISTELMÄ

Pirkanmaan ammattikorkeakoulu/Jyväskylän ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma

ERKKOLA, PÄIVI & SOMPPI, MAARIT:

GHbA_{1c}-määritysten vertailua kolmella eri analysaattorilla.
Bio-Rad Variant™ II Haemoglobin Testing System, Bio-Rad D-10™ Dual Program ja
DCA 2000®+.

Opinnäytetyö 55s.

Toukokuu 2006

Diabetes on aineenvaihdunnan sairaus, jossa veren glukoosipitoisuus kasvaa liian suureksi. Diabeteksen kaksi päämuotoa ovat tyypin 1 diabetes ja tyypin 2 diabetes. Pitkäaikainen liian korkea verensokeri johtaa elimistön proteiinien glykoitumiseen, mikä voi aiheuttaa elinmuutoksia silmissä, munuaisissa ja hermoissa sekä sydän- ja verenkiertoelimistössä. Terveysten kannalta on tärkeää, ettei glukoosin määrä veressä vaihtele liikaa. Siksi diabeteksen hoidossa puhutaan paljon hyvästä hoitotasapainosta. Hyvä hoitotasapaino on paras keino torjua komplikaatioita. Diabeteksen hoitotasoa seurataan hemoglobiinin glykoitumista kuvaavalla laboratoriotutkimuksella (GHbA_{1c}).

GHbA_{1c}:n määritysmenetelmiä on käytössä noin viisitoista. Menetelmien suuri määrä ja standardisoinnin puute aiheuttavat sen, että GHbA_{1c}-tulokset eri laboratorioiden välillä vaihtelevat huomattavasti menetelmästä riippuen. Lisäksi GHbA_{1c}:n määrittämistä vaikeuttaa hemoglobiinivarianttien esiintyminen tutkittavissa näytteissä. Nämä hemoglobiinivariantit voivat joko nostaa tai laskea GHbA_{1c}-tulosta riippuen käytetystä määritysmenetelmästä. Diabeetikon hoitotasapainon kannalta on erittäin tärkeää, että saadut GHbA_{1c}-tulokset ovat luotettavia.

Tässä opinnäytetyössä verrataan kolmen eri analysaattorin tulostasoa ja toistettavuutta määrittämällä GHbA_{1c}-pitoisuutta plasmanäytteistä. Nämä analysaattorit ovat Bio-Rad Variant™ II Hemoglobin Testing System, Bio-Rad D-10™ Dual Program ja DCA 2000®+. DCA 2000®+ -analysaattori perustuu immunokemialliseen menetelmään ja kaksi ensimmäistä korkean erotuskyvyn nestekromatografiseen menetelmään (HPLC). Työhön kuuluu myös Keski-Suomen alueella esiintyvän tuntemattoman hemoglobiinivariantin erottaminen ja selvittäminen.

Tuloksia tarkastellaan lineaarisen regression avulla. Tutkimuksessamme käy ilmi, että Variant II™ ja D-10™ antavat samantasoisia tuloksia. Näiden analysaattoreiden heikkoutena on, että ne eivät pysty erottamaan Keski-Suomen alueella esiintyvää hemoglobiinivarianttia. DCA 2000®+ on kolmesta vertailtavasta laitteesta luotettavin, jos näytteessä esiintyy hemoglobiinivariantti.

Avainsanat: HbA_{1c}, hemoglobiinivariantti, kromatografia, toistettavuus, menetelmävertailu

ABSTRACT

Pirkanmaa Polytechnic, University of Applied Sciences / Jyväskylä Polytechnic, University of Applied Sciences.

Degree Programme in Biomedical Laboratory Science

ERKKOLA, PÄIVI & SOMPPI, MAARIT:

Comparison of GHbA_{1c} -measurements by three different analyzers.

Bio-Rad Variant™ II Haemoglobin Testing System, Bio-Rad D-10™ Dual Program and DCA 2000®+.

Bachelor's Thesis 55 pages

May 2006

Diabetes is a metabolic condition in which the amount of glucose in blood is too high. There are two main types of diabetes: type 1 diabetes and type 2 diabetes. Long-term high blood glucose level leads to protein glycation in vivo, which can cause damage to eyes, kidneys, nerves, heart and major arteries. The main aim of treatment of diabetes is to achieve blood glucose as near to normal as possible. A good long-term glycaemia control is the best way to prevent complications related to diabetes. Measurement of glycated haemoglobin (GHbA_{1c}) is a common procedure for evaluating long-term control of diabetes.

About fifteen methods for the determination of GHbA_{1c} are commercially available to clinical laboratories. Due to large number of methods and the lack of international standardization GHbA_{1c} values vary considerably between methods. The measurement of GHbA_{1c} can be affected by haemoglobin variants present in diabetic patients. These haemoglobin variants may falsely increase or decrease GHbA_{1c} results depending on the method used. The optimal therapy of diabetic patients requires validated GHbA_{1c} methods.

In this thesis we compare GHbA_{1c} results by three different analyzers. These analyzers are Bio-Rad Variant™ II Haemoglobin Testing System, Bio-Rad D-10™ Dual Program and DCA 2000®+. The DCA 2000®+ is based on immunoassay and the first two are based on high performance liquid chromatography (HPLC). This study also includes the separation and identification of haemoglobin variant existing in Central Finland.

The results are examined by linear regression. Our study shows that Variant II™ and D-10™ give very similar results but they lack the resolution necessary to differentiate the haemoglobin variant existing in Central Finland. The DCA 2000®+ is the most reliable analyzer if haemoglobin variant is present in the sample.

Key words: HbA_{1c}, haemoglobin variant, reproducibility, method comparison

SISÄLLYS

1 JOHDANTO	1
2 DIABETES.....	3
2.1 Diabeteksen seuranta	3
2.2 Komplikaatiot	4
3 GLYKOITUNUT HEMOGLOBIINI ELI GHb.....	5
3.1 Hemoglobiini	5
3.2 Glykoitunut hemoglobiini, GHb.....	5
3.3 HbA _{1c}	7
4 GHb:N MÄÄRITYSMENETELMÄT.....	10
4.1 Kromatografiset menetelmät	11
4.2 Immunokemialliset menetelmät	11
5 HbA_{1c} MÄÄRITYSTEN ONGELMAT.....	12
5.1 Hemoglobiinopatiat.....	13
5.1.1 Varianttien vaikutus kromatografisiin menetelmiin	16
5.1.2 Varianttien vaikutus immunokemiallisiin menetelmiin	18
5.2 Hemoglobiinijohdannaiset	19
5.3 Vaihtoehtoiset menetelmät HbA _{1c} :n määrittämiseen.....	20
6 STANDARDISOINTI.....	21
7 TUTKIMUSTAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT.....	23
8 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS.....	24

8.1 Tutkimuksen kulku	24
8.2 Näyte	25
8.3 Käytetyt reagenssit.....	25
8.4 Käytetyt mittalaitteet.....	26
8.4.1 Mittalaitteiden toimintaperiaate.....	26
9 TILASTOLLISET MENETELMÄT.....	29
10 TULOKSET.....	31
10.1 Bio-Rad D-10™ -analysointilaitteen sisäinen tasovertailu.....	31
10.1.1 Lyhyt ajo.....	31
10.1.2 Pitkä ajo	32
10.2 Bio-Rad D-10™ -analysointilaitteen sarjojen välinen tasovertailu.....	33
10.3 Bio-Rad D-10™ -analysointilaitteen pitkän ja lyhyen ajo-ohjelman välinen vertailu	34
10.4 Bio-Rad Variant™ II ja Bio-Rad D-10™ -analysointilaitteiden välinen vertailu	35
10.5 Varianttinäytteiden vertailu	37
11 TULOSTEN TARKASTELU.....	39
12 POHDINTA	42
LÄHTEET	45

1 JOHDANTO

Diabetes on aineenvaihduntasairaus, jossa insuliinin tuotanto on loppunut tai sen vaikutus on heikentynyt (insuliiniresistenssi). Diabetes jaetaan kahteen pääryhmään, nuoruustyyppin eli tyypin 1 ja aikuistyyppin eli tyypin 2 diabetekseen. Hoitamattomana diabetes aiheuttaa vakavia komplikaatioita. Tyypin 1 diabeetikoita on Suomessa noin 40 000 ja tyypin 2 diabeetikoita yli 200 000. Diagnoisimattomia tyypin 2 diabeetikoita arvellaan olevan noin 200 000. (Saraheimo & Kangas 2003, 12.)

Diabeteksen hoidon perustavoite on haittavaikutusten ehkäiseminen pyrkimällä pitämään diabeetikon verensokeri niin lähellä normaalia verensokeriarvoa kuin mahdollista. Jotta vakavilta komplikaatioilta vältyttäisiin, on veren sokeritasapainon seuranta erityisen tärkeää. Mittaushetkellä vallitsevaa veren glukoosiarvoa seurataan kotimittarilla ja pitkäaikaista glukoositasapainoa glykoituneen hemoglobiinin (GHb) määrää mittaavalla laboratoriotutkimuksella. (Saraheimo & Kangas 2003, 12.)

Glykoituminen voi tapahtua useiden eri hemoglobiinien, esimerkiksi HbA:n monen eri aminohappopäätteen kanssa, jolloin lopputuloksena on GHb. HbA:n kromatografinen analyysi paljastaa lisäksi useita glykoituneita alalajeja kuten HbA_{1a}, HbA_{1b} ja HbA_{1c}. (Bry, Chen & Sacks 2001, 153–163.)

HbA_{1c}-määrityksiä häiritsevät hemoglobiinivarianttien ja -johdannaisten esiintyminen sekä erilaiset tautitilat. Keski-Suomen alueella esiintyy tuntematon hemoglobiinivariantti, jonka tiedetään häiritsevän GHbA_{1c}-fraktion mittaamista. Tämä tuntematon variantti vaikuttaa eri analysaattorien tuloksiin vaihtelevasti, joten tulokset eivät ole keskenään vertailukelpoisia. Opinnäytetyössä pyrimme erottamaan ja selvittämään tämän variantin. Tällöin rutiinikäyttöön voidaan valita analysaattori, jota kyseinen variantti ei häiritse.

Opinnäytetyössämme teemme menetelmävertailun kolmen eri analysaattorin kesken määrittämällä GHbA_{1c}-pitoisuutta plasmanäytteistä. Käytössämme ovat Bio-Rad Variant™ II Hemoglobin Testing System, Bio-Rad D-10™ Dual Program sekä DCA 2000®+ analysaattorit. DCA 2000®+-analysaattori perustuu immunokemialliseen menetelmään ja kaksi ensimmäistä korkean erotuskyvyn nestekromatografiseen

menetelmään (HPLC). Lisäksi tutkimme Bio-Rad D-10™ Dual Program-analysaattorin tulostasoa sekä toistettavuutta potilasnäytteiden ja kaupallisten kontrollien avulla. DCA 2000®+ ja Bio-Rad Variant™ II Hemoglobin Testing System ovat käytössä Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa. Bio-Rad D-10™ Dual Program saadaan koekäyttöön tutkimuksemme ajaksi.

Selvitämme määrityksissä käytettävien analysaattoreiden periaatteet ja miten eri hemoglobiinifraktiot vaikuttavat kyseisissä analyyseissä. Laadimme saaduista tuloksista taulukot, analysoimme tuloksia lineaarisen regression avulla ja laadimme tuloksista yhteenvedon. Teoreettisena taustana tulemme käyttämään alan uusimpia arvostettuja ulkomaisia ja kotimaisia julkaisuja, kuten esimerkiksi Clinical Chemistry, The New England Journal of Medicine, Kliinlab, Moodi sekä Duodecimin julkaisemaa teosta nimeltä Diabetes.

Saimme opinnäytetyömme aiheen Keski-Suomen sairaanhoitopiirin kliinisen kemian laboratoriosta ja yhteyshenkilönämme toimii kemisti Marja-Leena Ruopuro. Vastaavaa tutkimusta ei ole Keski-Suomen sairaanhoitopiirissä ennen tehty. Opinnäytetyömme on kvantitatiivinen tutkimus, jossa analysoimme eri henkilöiltä otettuja GHbA_{1c}-näytteitä. Valitsimme GHbA_{1c}-näytteet työtämme varten laboratorion jo analysoiduista näytteistä. Eettistä ongelmaa ei ole, koska näytteitä käsitellään tuntemattomina.

2 DIABETES

Diabetes on joukko erilaisia ja -asteisia sairauksia, joille on yhteistä se, että veren sokeripitoisuus kasvaa liian suureksi. Diabetes on sokeriaineenvaihdunnan häiriö, jossa insuliinihormonin tuotanto on riittämätöntä tai se on loppunut haiman insuliinia tuottavien solujen tuhoutumisen takia tai insuliinin vaikutus on heikentynyt (insuliiniresistenssi). (Saraheimo & Kangas 2003, 8; Kansanterveyslaitos 2005.) Pitkäaikainen liian korkea verensokeri johtaa elimistön valkuaisaineiden sokeroitumiseen, mikä voi aiheuttaa elinmuutoksia silmissä, munuaisissa ja hermoissa sekä sydän- ja verenkiertoelimistössä (Saraheimo & Kangas 2003, 9.)

Diabeteksen kaksi päämuotoa ovat tyypin 1 (nuoruustyyppin) diabetes ja tyypin 2 (aikuistyyppin) diabetes. Tyypin 1 diabeteksessa elimistön puuttuva insuliinineritys on korvattava elinikäisellä insuliinihoidolla ja tyypin 2 diabeteksessa ydinasia on valtimotautivaaran vähentäminen verensokerin, verenpaineen, veren rasvojen ja hyytymistekijöiden hoidolla. (Saraheimo & Kangas 2003, 9.)

2.1 Diabeteksen seuranta

Normaali paastoverensokeriarvo (fB-Gluk) terveellä henkilöllä kokoverestä mitattuna on 3,3–5,5 mmol/l ja noin kahden tunnin kuluttua aterian jälkeen noin 7,8 mmol/l. Paastoplasman (fP-Gluk) sokeripitoisuus terveellä henkilöllä on 4,0–6,0 mmol/l. (Ilanne-Parikka 2003, 46.)

Veren sokeritasapainoa voidaan seurata laboratoriotutkimuksella, jossa näytteestä määritetään veren hemoglobiiniin kiinnittyneen glukoosin määrä. Tämä niin sanottu sokerihemoglobiini-testi, pitkäaikaisten sokeri tai HbA_{1c} kertoo keskimääräisen verensokeripitoisuuden takautuvasti noin 2-3 kuukauden ajalta. (Ilanne-Parikka 2003, 46.) Muutokset HbA_{1c}:n arvoissa ovat melko hitaita. Glukoositasapainon paraneminen näkyy HbA_{1c}-arvon pienenemisenä 4–6 viikon kuluessa, mutta huononeminen arvon suurentumisena jo seitsemän vuorokauden kuluttua. HbA_{1c}-arvon määrittäminen on

erityisen arvokas raskauden aikaisen diabeteksen hoidon seurannassa ja on vakiintunut rutiinimenetelmäksi sekä tyypin 1 että tyypin 2 diabeteshoidon seurannassa.

Diabeteksen hoidon tavoitteena on päästä GHbA_{1c}-arvoissa normaalitasolle, joka terveellä aikuisella on 4,0–6,0 %. Hyvänä tasona voidaan pitää GHbA_{1c}-arvoja, jotka ovat pienempiä kuin 7,0–7,5 % ja välttävänä, kun hoitotulos on 7,5–8,5 % välillä. GHbA_{1c}-arvon ollessa edellä mainittuja arvoja korkeampi hoitotasapaino on huono. Jos GHbA_{1c}-arvot ovat paastoverensokerimittauksiin nähden suhteettoman alhaiset kertovat ne havaitsematta jääneistä hypoglykemiatioista. (Yhtyneet laboratoriot laboratorioskäsiokirja 2006–2007.)

2.2 Komplikaatiot

Glukoosi yhdistyy kemiallisesti elimistön valkuaisaineisiin, jolloin niiden rakenne ja toiminta muuttuu. Proteiinien glykoituminen on sitä runsaampaa, mitä enemmän veressä ja muissa kudoksneesteissä on glukoosia. Liiallinen glykoituminen aiheuttaa elinmuutoksia silmiin (retinopatia), hermoihin (neuropatia) ja munuaisiin (nefropatia). Varsinkin kakkostyyppin diabeteksessä on lisääntynyt sydän- ja verisuonisairauksien riski, korkea verenpaine, rasva-aineenvaihdunnan häiriöitä ja lisääntynyt veren hyytymistäipumus. Diabetekseen liittyy usein myös elimistön heikentynyt kyky puolustautua infektioita vastaan sekä lisääntynyt tulehdusalttius. (Saraheimo ym. 2003, 9; Kilpatric 2000, 335–339.)

Intensiivisen verensokerin kontrolloinnin ja diabeteksen aiheuttamien komplikaatioiden yhteyttä on tutkittu kahdessa laajassa tutkimuksessa, joita ovat Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ja United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. 1993, 977–986; Kilpatric 2000, 335–339). Tutkimukset osoittavat selvästi, että mitä paremmin verensokeri pysyy normaaliarvoissa, niin sitä pienempi riski on sairastua diabeteksen aiheuttamiin komplikaatioihin. Lääkäreiden tulisikin hoitaa diabetesta sairastavia potilaita intensiivisillä verensokerin kontrollointiohjelmilla. Tämä asettaa paineita kliinisille laboratorioille, koska laboratorioden tulisi tuottaa toistettavia ja standardisoituja glykohemoglobiinin määrittäyksiä. (Benjamin & Sacks 1994, 683–687; Schnedl, Liebming, Roller, Lipp & Krejs 2001, 94–98.)

3 GLYKOITUNUT HEMOGLOBIINI ELI GHb

3.1 Hemoglobiini

Hemoglobiini (Hb) on proteiini, joka muodostuu neljästä punaisesta pigmenttiosasta eli hemistä ja neljästä värittömästä proteiiniosasta eli globiinista (Hänninen & Mahlamäki 2004, 263–268). Hemoglobiinin pääasiallinen tehtävä on kuljettaa happea keuhkoista kudoksiin (Lehtinen 2000, 161).

Terveen aikuisen veressä esiintyy pääasiassa kolmea eri hemoglobiiniketjua. Suurin osa terveiden aikuisten hemoglobiinista on hemoglobiini A:ta (HbA), joka muodostuu kahdesta α -ketjusta ja kahdesta β -ketjusta ($\alpha_2\beta_2$). HbA:n osuus kaikesta aikuisen hemoglobiinista on noin 95–98%. Noin 1,5–3,5 % aikuisen hemoglobiinista on HbA₂:a, joka sisältää kaksi alfa- ja kaksi deltaglobiiniketjua ($\alpha_2\delta_2$). Fetaalihemoglobiini eli HbF sisältää kaksi alfa- ja kaksi gammaglobiiniketjua ($\alpha_2\gamma_2$). HbF on sikiökauden pääasiallinen hemoglobiinin muoto, joka vähenee ensimmäisen ikävuoden aikana aikuisten tasolle eli 0,5 %:iin. (Hänninen ym. 2004, 265–266; Huhti 1999.)

Normaali hemoglobiinimolekyyli on liukoinen, stabiili ja sillä on hyvä hapenkuljetuskyky (Huhti 1999). Normaalisti α - ja β -ryhmittymien tuotteet ovat tasapainossa koko kehityksen ajan. Jos jompaakumpaa ketjua tuotetaan vähemmän tai se puuttuu kokonaan, seurauksena on globiiniketjujen epätasapaino ja punasolupoiikkeavuudet. (Lehtinen 2000, 161.)

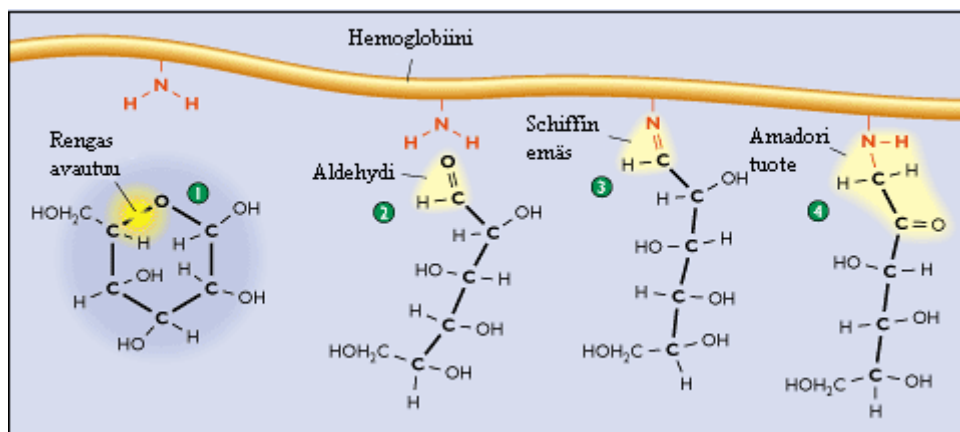
3.2 Glykoitunut hemoglobiini, GHb

Glykoituneet proteiinit syntyvät hitaassa ei-entsymaattisessa reaktiossa sokeriryksikön ja proteiinin aminoryhmien välillä. Lukemattomia elimistön proteiineja glykoituu, mutta veren GHb on kliinisesti käytetyin glykemia- ja sokeritason mittari. (Sacks 2003, 1245–1247.) Glykoituneiden proteiinien, lähinnä GHb, määrityksiä käytetään rutiinomaisesti diabetes mellitusta sairastavien henkilöiden pitkän ajan

sokeritasapainon seurannassa (Sacks, Burns, Goldstein, Maclaren, McDonald & Parrott 2002, 426–472). GHb:n konsentraatio on suoraan verrannollinen verensokerin keskikonsentraatioon ja punasolujen keskielinikään. GHb:n konsentraatio ilmaisee glukoosin keskimääräisen pitoisuuden edeltäviltä 2–3 kuukaudelta. Glukoosin aineenvaihdunnallisilla heilahduksilla, urheilusuorituksilla tai ruokailulla ei ole vaikutusta GHb:n tuloksiin. (Sacks 2003, 1245–1247.)

Proteiinien glykoituminen on kolmivaiheinen tapahtuma (Kuvio 1):

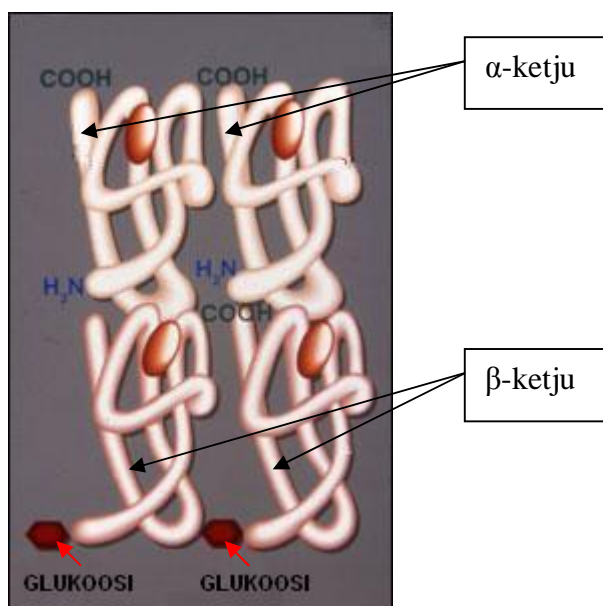
- 1) Proteiinien glykoituminen on ei-entsymaattinen reversiibeli sitoutuminen, jossa sokerialdehydi tai ketoniryhmä yhdistyy proteiinin vapaiden aminoryhmien kanssa muodostaen labiilin Schiffin emäksen. Tasapaino saavutetaan muutaman tunnin kuluessa, ja se on suoraan verrannollinen vallitsevaan glukoositasapainoon. Solun ulkopuolisissa molekyyleissä aminoryhmään liittyvä sokeryyksikkö on lähes aina glukoosi, kun taas solunsisäiset proteiinit voivat reagoida useiden eri natiivisokereiden tai fosforyloitujen sokereiden kanssa. Soluissa, joissa glukoosi läpäisee vapaasti solukalvon, esim. punasolu, on glukoosi glykoitumistuotteiden päälähde. (Benjamin & Sacks 1994, 683–687.)
- 2) Schiffin emäs johdannaiset järjestyvät hitaasti uudelleen, jolloin muodostuu stabiilimpia ketoamiineja eli Amadori-tuotteita. Tasapaino saavutetaan noin 4–6 viikossa. (Benjamin ym. 1994, 683–687.)
- 3) Kuukausien kuluessa Amadori-tuotteissa tapahtuu irreversiibeliä uudelleenjärjestäytymistä, jolloin ne reagoivat vapaiden aminoryhmien kanssa muodostaen pitkälle kehittyneitä glykoituneita lopputuotteita (AGE=advanced glycation end products). Nämä rakenteet ovat hyvin heterogeenisiä ja ne havaitaan helposti proteiineista, kuten hemoglobiini ja kollageeni. AGE:t kerääntyvät iän myötä, kuvastaen kohonnutta verensokeria ja lisääntyvät potilailla, joiden diabetes on huonossa hoitotasapainossa. Joissakin tutkimuksissa AGE-tuotteiden on havaittu häiritsevät verisuonten normaalia toimintaa ja siten olevan yksi pääsyy diabeteksen aiheuttamien komplikaatioiden syntymiseen. (Benjamin ym. 1994, 683–687.)



KUVIO 1. Hemoglobiinin glykoituminen. 1) rengasmuotoinen glukoosimolekyyli 2) glukoosimolekyyli muuttuu spontaanisti lineaariseksi 3) glukoosin reaktiivinen aldehydiryhmä liittyy hemoglobiinin vapaaseen aminoryhmään ja syntyy Schiffin emäs 4) Schiffiin emäs muuttuu spontaanisti Amadori-tuotteeksi. (Hospital Practice)

3.3 HbA_{1c}

Glykoituminen voi tapahtua useiden eri hemoglobiinien (esim. HbA, HbA₂ ja HbF) monen eri aminohappopääteen kanssa, jolloin lopputuloksena on glykoitunut Hb eli GHb. HbA:n kromatografinen analyysi paljastaa useita glykoituneita alalajeja (HbA_{1a}, HbA_{1b} ja HbA_{1c}), joita kutsutaan HbA₁:ksi tai nopeiksi hemoglobiineiksi. HbA_{1c}:ssä glukoosi on yhdistynyt HbA:n β-ketjun N-terminaalisen valiinin kanssa, mikä on yleisin glykoitumisen tapahtumapaikka Hb tetrameerissä. Kuviossa 2 on esitetty glukoosin liittyminen hemoglobiinin β-ketjun päässä olevaan NH₂-ryhmään. Noin 80 % HbA₁:stä on HbA_{1c}:tä ja HbA_{1c} fraktio korreloikin parhaiten keskimääräisen verensokerikonsentraation kanssa. (Bry ym. 2001, 153–163; Benjamin ym. 1994, 683–687.)



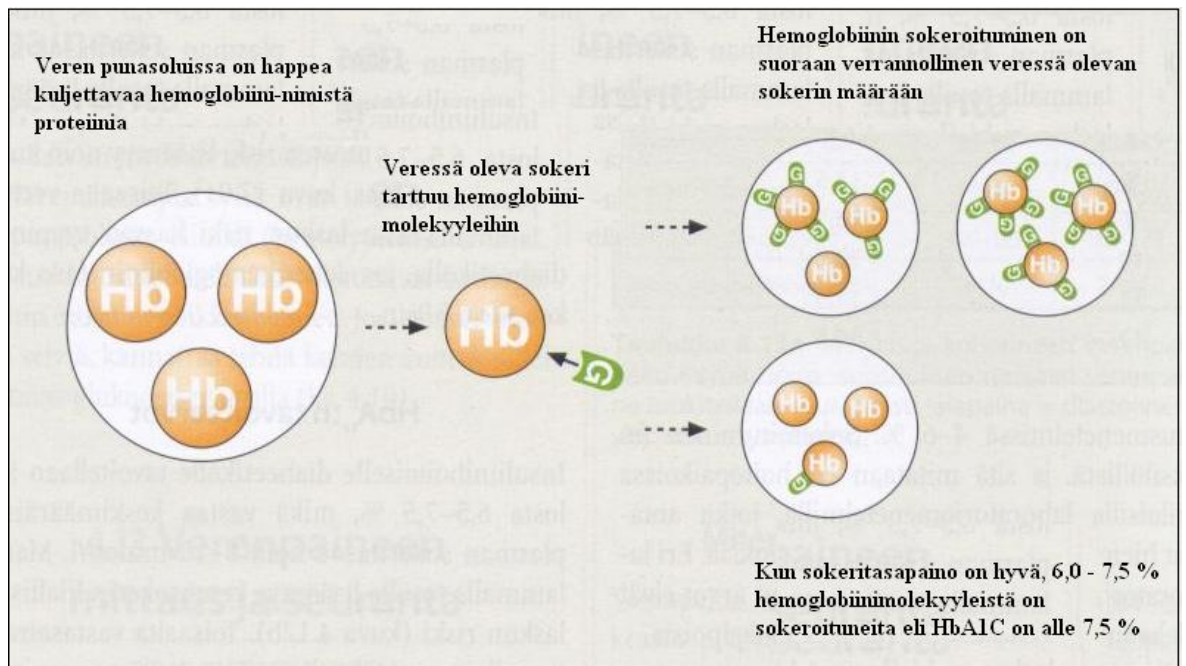
KUVIO 2. HbA_{1c}:n rakenne. Glukoosi liittyy hemoglobiinin β-ketjun N-terminaaliseen aminohappoon. (Makita, Z.)

International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) määrittelee HbA_{1c}:n siten, että se on hemoglobiini, jonka β-ketjun joko yksi tai molemmat N-terminaaliset valiinit ovat peruuttamattomasti glykoituneet. Muissa GHb:ssa glukoosi, glukoosi-6-fosfaatti, fruktoosi-1,6-difosfaatti tai pyruvaattihappo on sitoutunut johonkin muuhun aminohappoon β-ketjussa tai α-ketjun NH₂-päähän. (Bry ym. 2001, 153–163.)

Glykoitumisen laajuus sekä α- ja β-ketjujen suhteet glykoitumistapahtumassa ovat vielä epäselviä. Kokonais-GHb:n määrä on kaikkien mahdollisten glykoitumispaikkojen täyttymisen vuoksi noin 50 % korkeampi kuin yksin HbA_{1c}:n määrä. (Schnedl, Liebinger, Roller, Lipp & Krejs 2001, 94–98.) HbA_{1c}-tulos ilmoitetaan prosentteina kokonaihemoglobiinista, jonka johdosta jo pienet heitot mittauksissa aiheuttavat suuret muutokset tuloksissa. Käytetystä määrittämenetelmästä riippuen, HbA_{1c}-konsentraatio terveellä henkilöllä on noin 4–6 %. (Schnedl ym. 2001, 94–98; Lahousen, Roller, Lipp & Schnedl 2002, 699–703.)

HbA_{1c}:n muodostuminen tapahtuu erytrosyyttien keskimääräisen eliniän aikana (noin 120 päivää) ja HbA_{1c}:n määrä riippuu tänä aikana olleesta glukoosin pitoisuudesta (Kuvio 3). Eniten vaikutusta HbA_{1c}-arvoon on ennen näytteenottoa tapahtuneella glykoitumisella. HbA_{1c}:n huono puoli on siinä, että se ei välttämättä ilmaise glykeemistä tasapainoa. Teoriassa potilaalla, jonka glukoositasapaino vaihtelee paljon

päivän aikana, voi olla sama HbA_{1c} arvo kuin potilaalla, jonka glukoosi vaihtelee hyvin vähän päivän aikana. (Kilpatric 2000, 335–339.)



KUVIO 3. Veressä olevaa sokeria kiinnittyy punasolujen hemoglobiinin pintaan sitä enemmän mitä korkeampi verensokeritaso on. (Ilanne-Parikka 2003, 61.)

4 GHb:N MÄÄRITYSMENETELMÄT

Glykoitunut hemoglobiini kuvastaa elimistön pitkän aikavälin sokeritasapainoa eli mitä korkeampi veren glukoosi on, sitä enemmän glukoosia liittyy hemoglobiiniin. Tulos ilmoitetaan yleensä glykoituneen fraktion prosentuaalisena osuutena kokonahemoglobiinista. (Penttilä & Tiikkanen 2004, 99–102.) Glykohemoglobiinin määrittäminen on tehokas tutkimus diabetesta sairastavien potilaiden diagnosoinnissa ja hoidossa (Bry ym. 2001, 153–163).

Hemoglobiinin glykoituminen muuttaa Hb-molekyylin rakennetta ja alentaa sen positiivista varausta. Monet testimenetelmät perustuvat joko toiseen tai molempiin näihin muutoksiin. (Bry ym. 2001, 153–163.) Nykyään käytössä on yli 30 eri GHb:n määrittämetodia. Suurin osa menetelmistä kuuluu kahteen eri pääluokkaan. Ensimmäinen pääluokka sisältää menetelmät, joilla mitataan GHb:tä perustuen glykoituneiden ja ei-glykoituneiden komponenttien väliseen varaueroon. Esimerkkejä ovat ioninvaihtokromatografia ja elektroforeesi. Toiseen pääluokkaan kuuluvat menetelmät, jotka erottavat eri komponentit glykoituneiden ja ei-glykoituneiden komponenttien erilaisen rakenteen perusteella. Esimerkkejä ovat muun muassa boronaattiaffiniteettikromatografia ja immunokemialliset menetelmät. Varauksen ja immunokemiaan perustuvat menetelmät mittaavat HbA_{1c}:ta eli HbA:ta, jossa glukoosi on liittynyt hemoglobiinin beetaketjun N-terminaaliseen päähän. Muut menetelmät mittaavat glykoituneiden hemoglobiinien kokonaismäärää, joka sisältää sekä HbA_{1c}:n että muut hemoglobiini-glukoosi yhdistelmät. Yleisesti ottaen eri menetelmät korreloivat hyvin keskenään eikä jonkin menetelmän ylivoimaisuudesta ole mitään näyttöä. (Sacks ym. 2002, 426–472; Sacks 2003, 1245–1247.)

4.1 Kromatografiset menetelmät

Suomessa HbA_{1c}:n määrittämiseen käytetään yleisimmin kationinvaihtopylväällä varustettuja nestekromatografisia menetelmiä (Koskinen 1997, 81–82).

Kationinvaihtokromatografia erottelee hemoglobiinin alalajit perustuen niiden varausten eroon. Hemoglobiinin alalajit eluoituvat kationinvaihtopylväältä eri ajassa riippuen puskurina käytetyn liuoksen ionivahvuudesta. Spektrofotometri mittaa Hb:n konsentraation jokaisesta kerätystä fraktiosta ja tuloksena saadaan kromatogrammi, jossa eri fraktiot näkyvät piikkeinä. Konsentraatio saadaan laskemalla jokaisen piikin pinta-ala. (Bry ym. 2001, 153–163.)

HbA_{1c}-pitoisuus lasketaan näytteestä seuraavalla kaavalla (Bry ym. 2001, 153–163).

$$\% HbA_{1c} = 100 \times \frac{HbA_{1c}}{HbA + HbA_{1c}}$$

jossa

%HbA_{1c} = HbA_{1c}:n prosentuaalinen osuus näytteessä

HbA_{1c} = HbA_{1c}:n pitoisuus näytteessä

HbA = Hb:A:n pitoisuus näytteessä

4.2 Immunokemialliset menetelmät

Useat kaupalliset immunokemialliset menetelmät mittaavat HbA_{1c}:tä vasta-ainevälitteisellä latex-agglutinaation inhibitiolla tai immunoturbidometrisillä menetelmillä. Vasta-aineet tunnistavat spesifisesti hemoglobiinin β-ketjun 4–10 ensimmäistä aminohappoa sekä ketjun N-terminaaliseen päähän sitoutuneen glukoosin. Nämä vasta-aineet eivät tunnista Schiffin emästä tai muita glykoituneita hemoglobiineja, kuten kemiallisesti muodostuneita johdannaisia. (Bry ym. 2001, 153–163.)

5 HbA_{1c} MÄÄRITYSTEN ONGELMAT

Glykohemoglobiinin mittaaminen on tavallinen tapa mitata diabetesta sairastavien henkilöiden pitkän ajan sokeritasapainoa (Bry ym. 2001, 153–163). GHb:n testituloksiin eivät vaikuta ikä, sukupuoli, vuodenaika tai etninen tausta (Sacks ym. 2002, 426–472).

HbA_{1c} -määrittelyyn liittyy sen käyttökelpoisuudesta huolimatta lukuisia ongelmia (Kilpatric 2000, 335–339). Kaikki sairaudet/tilat, jotka lyhentävät punasolujen elinikää (esimerkiksi hemolyyttinen anemia, akuutti verenvuoto) alentavat virheellisesti GHb:n tuloksia riippumatta siitä mikä menetelmä on käytössä. C- ja E-vitamiinien on havaittu laskevan testituloksia, johtuen mahdollisesta glykoitumisen estymisestä. Toisaalta C-vitamiini voi nostaa tuloksia joissakin menetelmissä. Raudanpuuteanemian on havaittu nostavan tuloksia, johtuen luultavasti vanhojen punasolujen lisääntyneestä osuudesta. (Sacks ym. 2002, 426–472.)

Hypertriglyseridemia, hyperbilirubinemia, uremia, munuaisten vajaatoiminta, krooninen alkoholismi, krooninen salisylaattien käyttö ja opiaattiriippuvuus häiritsevät joitain menetelmiä, nostaten virheellisesti tuloksia (Sacks ym. 2002, 426–472; Benjamin ym. 1994, 683–687; Kilpatric 2000, 335–339). Geneettiset variantit ja kemiallisesti syntyneet hemoglobiinijohdannaiset voivat vaikuttaa huomattavasti mittauksiin riippuen käytössä olevasta kaupallisesta menetelmästä (Bry ym. 2001, 153–163). Useat hemoglobiнопатiat vaikuttavat useimpiin määrittelymenetelmiin ja varsinkin HbF voi vaihdella huomattavasti diabeteksessä ja raskauden aikana. Riippuen hemoglobiнопатista ja käytössä olevasta menetelmästä, tulokset voivat joko laskea tai nousta virheellisesti. (Sacks ym. 2002, 426–472; Benjamin ym. 1994, 683–687.)

Kliinisten laboratoriodien ja vierianalytiikkaa suorittavien yksiköiden tulee olla tietoisia hemoglobiinivarianttien ja -johdannaisten sekä erilaisten tautitilojen aiheuttamista häiriöistä. Hemoglobiinivarianttien tai -johdannaisten tunnistaminen ennen määrittelyä voi auttaa valitsemaan menetelmän, johon kyseessä oleva variantti tai johdannainen ei vaikuta. Laboratorioilla tulisi olla käytössä myös vaihtoehtoinen

pitkän ajan sokeritasapainon määrittäminen henkilöille, joilla jokin variantti tai sairaus vääristää tuloksia. (Bry ym. 2001, 153–163.)

5.1 Hemoglobiнопатiat

Perinnölliset hemoglobiinisynteesin häiriöt jaetaan talassemioihin ja hemoglobiнопатioihin, jotka ovat tavallisin geneettisten sairauksien ryhmä ihmisillä. Talassemioissa rakenteeltaan normaalien hemoglobiiniketjujen tuotanto on vähentynyt, hemoglobiнопатioissa hemoglobiinimolekyyli on rakenteeltaan epänormaali. (Schnedl ym. 2001, 94–98; Lehtinen 2000, 163.) Hemoglobiнопатioissa hemoglobiinimolekyylin rakenne on epänormaali johtuen globiiniketjugeenin pistemutaatiosta. Pistemutaatioissa yksi emäspari vaihtuu DNA-ketjussa, mikä johtaa aminohapon muuttumiseen toiseksi aminohapoksi. Tällaisia muuntuneita hemoglobiineja kutsutaan varianteiksi. (Schnedl ym. 2001, 94–98.) Suurin osa tunnetuista hemoglobiinimuunnoksista on β -ketjuvariantteja (Lehtinen 2000, 172). Hemoglobiнопатioita tavataan sekä heterotsygoottisessa että homotsygoottisessa muodossa. Heterotsygoottien punasolut sisältävät sekä HbA:ta että varianttihemoglobiinia. Koska näillä henkilöillä on harvoin oireita, heterotsygoottien taudista käytetään nimitystä trait (poikkeava piirre). Homotsygooteilta HbA puuttuu täysin ja taudin kliiniset ilmenemismuodot vaihtelevat. Tilaa kutsutaan anemiaksi. (Lehtinen 2000, 172.)

Helmikuun 2006 alkuun mennessä variantteja on tunnistettu 928 kappaletta (HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias). Ajantasainen tietokanta tunnistetuista varianteista on saatavilla www-muodossa osoitteessa:

<http://globin.cse.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter>. Suurin osa varianteista on syntynyt α , β , γ tai δ hemoglobiiniketjujen pistemutaatioista (Bry ym. 2001, 153–163).

Varianttihemoglobiinin toiminta voi olla normaali, mutta usein se on kuitenkin poikkeava, johtaen punasolujen hemolyysiin ja anemisoitumiseen (Huhti 1999). Löydetyistä varianteista noin puolet eivät aiheuta mitään kliinisiä oireita eli ne ovat kliinisesti hiljaisia mutaatioita. Varianttihemoglobiini aiheuttaa kliinisiä muutoksia yleensä happiaffiniteetissa tai syntyy fysikaalisesti epävakaa Hb-molekyyli. (Schnedl ym. 2001, 94–98; Lahousen ym. 2002, 699–703.)

Varianttien aiheuttama häiriö riippuu käytettävästä menetelmästä ja voi vaihdella jopa saman menetelmän eri modifikaatioissa (Schnedl ym. 2001, 94–98). Näytteestä tulisi tutkia mahdollisen variantin läsnäolo, jos potilaan glykoitunut hemoglobiiniarvo on yli 15 %, HbA_{1c}-tulokset ovat viitevälien alapuolella tai jos tulokset ovat selvästi erilaiset verrattuna muihin glukoositasapainon mittareihin. (Bry ym. 2001, 153–163; Sacks 2003, 1245–1247). Samoin jos eri menetelmillä saadut tulokset eroavat merkittävästi toisistaan, tulisi arvioida, onko näytteessä mahdollisesti variantti tai jokin hemoglobiinin johdannainen. Tiedossa täytyisi olla potilaan sairaushistoria, josta selviää mahdollinen hemoglobinopatia, punasolujen eliniässä tapahtuneet muutokset tai tila, joka suosii hemoglobiinin kemiallisia muutoksia. Kromatogrammien manuaalinen tarkastelu voi paljastaa varianttien aiheuttamien poikkeavien piikkien läsnäolon. Jos variantti huomataan, tulisi näyte ajaa eri määrittämenetelmällä ja tavallisimmat variantit tulisi tunnistaa kromatografisesti tai elektroforeesilla. (Bry ym. 2001, 153–163.)

GHb:n moninaiset määrittäystavat ovat tuoneet esille uusia variantteja, joista useat eivät tuota mitään fenotyypistä epänormaaliutta. 16 miljoonasta Amerikan diabeetikosta on arvioitu, että yli 150 000:lla on jokin geneettinen variantti. Maapallon joissakin osissa on havaittu varianttihemoglobiinien osuuden olevan niinkin suuri kuin yksi kolmasosa testatuista diabeetikoista. (Bry ym. 2001, 153–163.) Tavallisimpia hemoglobinopatioita ovat HbS, C, D Punjab ja E, joita jokaista esiintyy miljoonilla ihmisillä (Huhti 1999).

HbS ($\beta 6\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$) on yleisin epänormaali hemoglobiini. Sitä esiintyy erityisesti päiväntasaajan alueella Afrikassa. Etelä-Turkin vallitsevuus on 25 %, eräissä Kreikan kylissä 32 % ja Yhdysvaltain mustaihoisella väestöllä keskimäärin 8 %. (Lehtinen 2000, 173.) HbS:n vaikutukset kationinvaihtokromatografiaan vaihtelevat riippuen käytetystä menetelmästä ja menetelmän parametreista. Tutkimukset ovat osoittaneet, että HbS variantti nostaa tuloksia Bio-Radin Variant™ HPLC-menetelmällä. DCA-2000® menetelmään HbS ei vaikuta, koska mutaatio ei ole tapahtunut vasta-aineiden tunnistuskohdassa. (Bry ym. 2001, 153–163.)

HbC ($\beta 6\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$) esiintyy 2-3 %:lla Amerikan afrikkalaisista ja jopa noin 30 %:lla Länsi-Afrikan väestöstä. HbC variantti vaikuttaa useisiin menetelmiin samalla tavalla kuin HbS variantti. (Lehtinen 2000, 176–177; Bry ym. 2001, 153–163.)

HbD Punjab on yleisin Intiassa Punjabin osavaltion sikeillä, joilla vallitsevuus on 2 %. Sitä tavataan myös USA:n mustaihoisilla ja intiaaneilla sekä yksittäisillä valkoihoisilla ympäri maailmaa. HbD heterotsygoottisuus ei aiheuta kliinisiä eikä hematologisia poikkeavuuksia. (Lehtinen 2000, 177.)

HbE on maapallon toiseksi yleisin hemoglobiinivariantti (Lehtinen 2000, 177). HbE ($\beta 26\text{Glu}\rightarrow\text{Lys}$) esiintyy yleisimmin Kaakkois-Aasiassa, jossa sen esiintyvyys voi olla jopa 30 % väestöstä. HbE_{1c} eluoituu usein HbA_{1c}:n kyljessä useimmissa HPLC- tai kationinvaihtokromatografiamenetelmissä. Ilman tulosten korjausta menetelmät antavat vääriä HbA_{1c}-tuloksia, jotka voivat olla merkittävästi liian korkeita tai matalia riippuen käytetystä menetelmästä. Immunologisiin menetelmiin variantilla ei ole vaikutusta, koska mutaatio tapahtuu vasta-aineiden tunnistuskohdan ulkopuolella. (Bry ym. 2001, 153–163.)

HbF:n osuus lapsen syntyessä on 70 % kokonaishemoglobiinista. Kuuden kuukauden ikään mennessä HbF osuus laskee alle 5 %. Perinnöllisyydestä johtuen joillakin yksilöillä HbF:n osuus voi olla aikuisenakin jopa 30 % kokonaishemoglobiinista. β -talassemia ja sirppisoluanemia potilailla HbF:n osuus kokonaishemoglobiinista voi olla 2–20 % välillä. HbF voi nousta vähän myös raskauden aikana, vakavissa anemioissa ja joissakin leukemioissa. Alle 5 % HbF konsentraatiolla ei pitäisi olla merkittävää vaikutusta suurimpaan osaan GHb menetelmistä. Useimmat kationinvaihtokromatografiatekniikat erottavat HbF:n HbA:sta ja GHbF:n HbA_{1c}:stä, jolloin saadaan oikea HbA_{1c}-tulos. Jotkin immunologiset menetelmät voivat antaa virheellisen matalia HbA_{1c}-tuloksia. (Bry ym. 2001, 153–163.)

5.1.1 Varianttien vaikutus kromatografisiin menetelmiin

HPLC-menetelmät yleensä osoittavat hemoglobiinivariantin läsnäolon, mutta niiden erotuskyky ei ole tarpeeksi hyvä erottamaan varianttipiikkiä näytepiikistä.

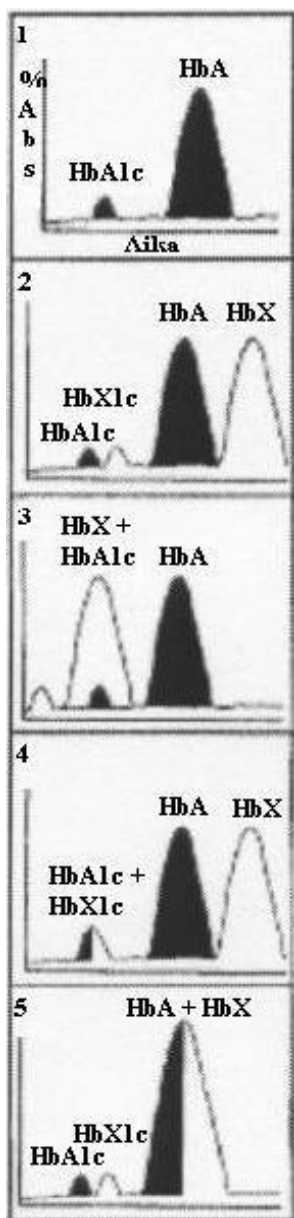
Kromatogrammeissa voi näkyä ylimääräisiä piikkejä variantin läsnäollessa, jolloin HbA_{1c}:n tulokset ovat kliinisesti joko liian korkeita tai matalia. (Schnedl ym. 2001, 94–98; Lahousen ym. 2002, 699–703.) Kromatogrammien manuaalinen tarkastelu varsinkin HPLC-menetelmiä käytettäessä antaa viitteitä siitä, että kyseessä voisi olla joko hemoglobiнопатia tai jokin muu määrittystä häiritsevä tila. Koska häiriöt ovat menetelmäkohtaisia, tulee valmistajan antamat ohjeet käydä huolellisesti läpi ennen menetelmän valintaa. Menetelmää valittaessa laboratorion tulee ottaa huomioon alueen potilaskannan mahdolliset erikoisuudet, kuten eri hemoglobiнопатioiden korkea esiintyminen. (Sacks ym. 2002, 426–472.)

Useat Hb-variantit korvaavat neutraalilla aminohapolla α - tai β -ketjun positiivisesti varautuneen pään. Muutos vähentää glykoitumattoman variantti-Hb:n retentioaikaa, jolloin se eluoituu yhdessä HbA_{1c}:n kanssa ja saatu HbA_{1c} tulos on selvästi liian korkea. Joidenkin potilaiden tuloksen on ilmoitettu olevan jopa 54 %. (Bry ym. 2001, 153–163.)

Hb-variantin eluaatio yhdessä HbA_{1c}:n kanssa tai variantin eroaminen HbA_{1c}-piikistä riippuu usein käytössä olevasta menetelmästä tai sen modifikaatiosta. Tämä johtuu käytetyistä liuossekoituksista, pylvästä ja muista eluaatio-olosuhteista, muun muassa lämpötilasta, paineesta, virtausnopeudesta ja ohjelma-ajasta, jotka kussakin menetelmässä ja laitteessa voivat olla erilaiset. Sama Hb-variantti voi siis aiheuttaa hyvin erilaisia HbA_{1c}-tuloksia riippuen käytetystä menetelmästä. Lisäksi HbA_{1c} -tulosten laskemiseen käytetyt yhtälöt voivat johtaa väriin tuloksiin, jos ne eivät tunnista poikkeavia piikkejä. Tällaisissa tapauksissa laitteen tulisi antaa varoitusmerkki tai mahdollistaa korjauksin oikean tuloksen saaminen. (Bry ym. 2001, 153–163.)

Variantti-Hb tai Hb:n johdannaiset, jotka eluoituvat erillään HbA:sta tai HbA_{1c}:stä eivät yleensä vaikuta HbA_{1c}-mittauksiin. Vääriä HbA_{1c}-tuloksia esiintyy, kun Hb-varianttia tai hemoglobiinijohdannaista ei voi erottaa HbA- tai HbA_{1c}-piikistä. Sama

variantti voi joko virheellisesti nostaa tai laskea HbA_{1c}-tulosta riippuen käytetystä menetelmästä. (Bry ym. 2001, 153–163.) Kuvioissa 1–5 on esitetty eri tapoja, miten varianttihemoglobiini voi muuttaa HbA_{1c}-tulosta.



KUVIO 4. Varianttien vaikutus HbA_{1c}:n tulokseen kromatografisessa menetelmässä (Bry ym. 2001, 153–163).

- 1) HbA erottuu HbA_{1c}:stä, varianttia ei ole läsnä, % HbA_{1c}-tulos on oikein
- 2) Glykoitunut variantti HbX_{1c} on läsnä, mutta variantilla ei ole vaikutusta % HbA_{1c}-tulokseen, koska piikit erottuvat toisistaan selvästi
- 3) Hemoglobiinivariantti HbX eluoituu yhdessä HbA_{1c}:n kanssa, jolloin % HbA_{1c}-pitoisuus on virheellisesti liian korkea
- 4) Glykoitunut HbX_{1c} eluoituu yhdessä HbA_{1c}:n kanssa, jolloin % HbA_{1c}-pitoisuus on virheellisesti hieman kohonnut
- 5) Kokonais-HbA ja kokonais-HbX eluoituvat yhdessä, jolloin % HbA_{1c}-pitoisuus on virheellisesti liian matala.

Muita kromatografiaan häiritsevästi vaikuttavia hemoglobiinifraktioita ovat fetaalihemoglobiini (HbF), hemoglobiinin glutationi-addukti (HbA3) sekä labiili HbA_{1c}, jos labiilin fraktion poistomenetelmä on epätäydellinen (Koskinen 1997, 81–82). HbF eluoituu yhdessä HbA_{1c}:n kanssa ja voi aiheuttaa virheellisesti kohonneita HbA_{1c}-arvoja aikuisilla diabeetikoilla (Schnedl ym. 2001, 94–98).

Fetaalihemoglobiiniongelmia on käytännössä jäänyt pois uusien HbA_{1c}-menetelmien korvattua vanhemmat HbA1-menetelmät. Kuitenkin tapauksissa, joissa

fetaalihemoglobiinitaso on niin korkea, että merkittävä osa glykoituneesta hemoglobiinista on glykoitunutta fetaalihemoglobiinia, joudutaan HbA_{1c} suhteuttamaan HbA₀-fraktioon totaalihemoglobiinin sijaan. Hemoglobiinin glutationi-addukti on piikki, joka nousee HbA_{1c}:n ja HbA₀:n väliin näytteen vanhetessa. Se voi vaikuttaa HbA_{1c}-tulostukseen, jos kromatografian erotuskyky tällä alueella on huono. GHbA_{1c}-fraktion luotettavien tulosten saaminen edellyttää, että menetelmiin on liitetty joko preanalyttinen tai analyysivaiheessa tapahtuva labiilin fraktion poisto, jolloin satunnaiset korkeat arvot, esimerkiksi paaston puuttuminen eivät vaikuta tuloksiin. (Penttilä & Tiikkanen 2004, 99–102.)

5.1.2 Varianttien vaikutus immunokemiallisiin menetelmiin

Immunokemiallisia glykohemoglobiininmenetelmiä pidetään glukoosispesifisinä ja pitkälle automatisoituina. Niiden on toivottu ratkaisevan glykohemoglobiinin mittauseron silloin, kun potilaan hemoglobiini on osittain tai kokonaan muuta kuin normaalia hemoglobiini A:ta. Tämä on erityisesti eteläisempien maiden ongelma, mutta väestön sekoittumisen vuoksi varianttien määrä on lisääntynyt muuallakin. (Koskinen 1997, 82.)

Immunokemialliset hemoglobiinin määrittämenetelmät perustuvat spesifisten vasta-aineiden käyttöön, jotka tunnistavat hemoglobiinin β -ketjun N-terminaalisen glykoituneen aminohapon sekä ketjun 4–10 ensimmäistä aminohappoa. Jos jokin näistä 4–10 aminohaposta vaihtuu mutaation seurauksena, ei vasta-aine tunnista sitoutumispaikkaansa ja HbA_{1c} tulokset voivat olla virheellisen matalia. Esimerkiksi Hb Raleighin tapauksessa Val→Ala substituutiossa N-terminaalinen aminohappo asetyloituu, jolloin glykoituminen estyy ja tulokset laskevat. Myös muut N-terminaalisen päään aminohapposubstituutiot aiheuttavat saman ongelman, eikä näiden potilaiden pitkän ajan sokeritasapainoa tulisi määrittää immunokemiallisella menetelmällä. (Bry ym. 2001, 153–163.)

5.2 Hemoglobiinijohdannaiset

GHB:n määrittämiseen voi geneettisten varianttien ohella vaikuttaa myös hemoglobiinin kemialliset muutokset. Nämä muutokset voivat jäljitellä GHB:tä fysikaalisesti ja kemiallisesti ja aiheuttaa GHB:n epätarkkoja määrittäyksiä, varsinkin jos erotusmenetelmät perustuvat varauseroihin. Tavallisimpia johdannaisia ovat karbamyloitunut hemoglobiini ja asetyloitunut hemoglobiini. (Bry ym. 2001, 153–163.)

Karbamyloitus tapahtuu terveissä yksilöissä, mutta on yleisempää potilailla, joilla on alentunut munuaisten toiminta ja kohonneet seerumin ureapitoisuudet (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) 2002, 78–89). Karbamyloituksessa urea hajoaa spontaanisti elimistössä ammoniakiksi ja syanaatiksi. Syanaatin protonaatio johtaa isosyanaattihapon syntymiseen, joka reagoi proteiinien α - ja ϵ -aminoryhmien kanssa muodostaen karbamyylidistein. Hemoglobiinin β -ketjun N-terminaalinen valiini on erityisen reaktiivinen isosyanaattihappoa kohtaan, jolloin syntyy stabiili karbamyyl-Hb. Uremiapotilailla karbamyyl-Hb:n osuus voi olla jopa 3 % kokonaishemoglobiinista. Karbamyyl-Hb:n isoelektrinen piste on hyvin lähellä HbA_{1c}:n vastaavaa, joten se voi häiritä varaukseen perustuvia GHB:n määrittäyksiä. Immunokemiallisiin ja boronaattiaffiniteettimenetelmiin ei karbamyyl-Hb:llä ole osoitettu olevan vaikutusta uremiapotilailla. (Bry ym. 2001, 153–163.)

Asetyloitunutta hemoglobiinia esiintyy potilailla, jotka saavat suuria annoksia aspiriinia (IFCC 2002, 78–89). HbA:n α - ja β -ketjujen lysiini-aminohappojen asetyloitus aspiriinin vaikutuksesta muuttaa asetyloituneen hemoglobiinin varausta negatiivisemmaksi. Asetyloitus muuttaa hemoglobiinin kromatografisia ominaisuuksia, minkä seurauksena HbA_{1c} pitoisuus kohoaa virheellisesti. (John 2003, 1199–1212.)

5.3 Vaihtoehtoiset menetelmät HbA_{1c}:n määrittämiseen

Punasolujen elinikää lyhentävät patofysiologiset tilat ja hemoglobiinopatioiden esiintyminen rajoittavat GHb-testien käyttöä pitkän aikavälin sokeritasapainon tarkkailussa. Edellä mainituissa tapauksissa tulisi käyttää vaihtoehtoisia testejä, kuten glykoituneiden seerumin proteiinien (GSP) määrittystä ja glykoituneen seerumin albumiinin (GSA) määrittystä. Näiden testien käytössä tulee kuitenkin huomata seuraavat asiat: 1) Nämä testit heijastavat glykeemista tilaa vain noin 2 viikon ajalta ja 2) kumpaakaan testiä ei ole tutkittu, korreloivatko tulokset diabeteksen aiheuttamien komplikaatioiden kanssa samalla tavalla kuin GHb. (Bry ym. 2001, 153–163; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993, 977–986.)

Glykoituneiden seerumin proteiinien määrittymenetelmät käsittävät erilaisia kolorimetrisiä ja kromatografisia menetelmiä. Tarkemmin on tutkittu fruktoamiinimenetelmää ja fenyliboronaattiaffiniteetikromatografiaa, mutta näiden käyttö kliinisesti on vielä kiistanalaista. (Benjamin ym. 1994, 683–687.) Suositeltavin vaihtoehto on fruktoamiinimenetelmä. Fruktoamiinitesti ilmoittaa potilaan glykeemisen tilan noin 1-2 viikon ajalta. Testin tulos riippuu seerumin proteiinien glykoitumisesta ja tulokseen ei vaikuta hemoglobiinivariantin läsnäolo. (Schnedl ym. 2001, 94–98.)

6 STANDARDISOINTI

Kliinisissä laboratorioissa on käytössä nykyään noin viisitoista eri HbA_{1c}:n määrittymenetelmää, jotka perustuvat ioninvaihto- tai affiniteettikromatografiaan, elektroforeesiin ja immunologisiin periaatteisiin. Kansainvälisesti ei ole käytössä sovittua referenssimenetelmää tai referenssimateriaalia, johon laboratorioiden rutiinimääritykset voitaisiin jäljittää. Useita kansallisia aloitteita menetelmien yhtenäistämiseksi on kuitenkin olemassa, esimerkiksi USA:ssa NGSP (the National Glycohemoglobin Standardization Program) sekä omat ohjelmat Japanissa ja Ruotsissa. Nämä standardisointiohjelmat perustuvat kuitenkin eri menetelmiin. (IFCC 2002, 78–89.) Kaupallisesti saatavilla olevat eri menetelmät mittaavat GHb:n eri fraktioita, jolloin saatu HbA_{1c}-tulos riippuu käytetystä menetelmästä (Schnedl ym. 2001, 94–98). Kansainvälisen standardoinnin puutteen vuoksi HbA_{1c}-tulokset vaihtelevat huomattavasti menetelmästä riippuen (IFCC 2002, 78–89).

Usein rutiinimääritysten referenssimenetelmänä käytetään kationinvaihto-HPLC:tä, koska laajaa arvostusta saaneessa DCCT-tutkimuksessa on käytetty kyseistä menetelmää HbA_{1c}-pitoisuuksien määrittämiseen. HPLC:llä on hyvä toistettavuus ja pitkän ajan stabiilius, mutta toisaalta melko huono herkkyys. Saman verinäytteen HbA_{1c}-tulokset voivat vaihdella riippuen kromatografisesta systeemistä, esimerkiksi pylvään koosta, puskurien koostumuksesta ja eluaatioajoista. HbA_{1c}:ksi ajateltu piikki saattaa sisältää vaihtelevia määriä yhdisteitä, joilla on sama eluaatioaika kuin HbA_{1c}:llä. (IFCC 2002, 78–89; Lahousen ym. 2002, 699–703.) Tämän epäspesifisyyden vuoksi IFCC:n toimesta ryhdyttiin kehittämään vakiota, jonka avulla eri menetelmiä voitaisiin paremmin verrata keskenään ja poistaa analyysistä häiritsevät tekijät. Tämä vakio valmistui vuonna 1998. Näin saatiin aikaan lähes puhtaat HbA₀- ja HbA_{1c}-fraktiot. Näitä vakioita suositellaan primaarivakioiksi kaikille glykoituneen hemoglobiinin menetelmiä käyttäville referenssilaboratorioille ja luonnollisesti myös menetelmiä ja menetelmien reagensseja valmistaville yrityksille. (Penttilä ym. 2004, 99–102.)

Samaan aikaan vakioiden kehittämisen kanssa IFCC ryhtyi kehittämään menetelmää, jonka avulla voitaisiin spesifisesti määrittää HbA_{1c}-fraktion glykoitunutta osaa.

Menetelmän avulla eliminoitaisiin potilaan sairauksien tai niiden hoidon aiheuttamat virheelliset tulokset samoin kuin poikkeavien hemoglobiinien antamat virheelliset arvot. Menetelmässä käsitellään alumiinista vapaata hemoglobiiniliuosta endoproteinaasi Glu-C:llä, joka lohkaisee kuuden aminohapon pituiset peptidit sekä HbA₀-fraktion että HbA_{1c}-fraktion β-ketjujen päistä. Peptidien suhde määritetään sitten nestekromatografialla käyttäen analyysiin joko massaspektrometriaa tai kapillaarielektroforeesia. (Penttilä ym. 2004, 99–102; John 2003, 1199–1212.)

Variantit ja hemoglobiinijohdannaiset eivät vaikuta tämän menetelmän tuloksiin, ja sitä voidaan käyttää myös varianttien tunnistukseen (Bry ym. 2001, 153–163).

Referenssimenetelmän paremman herkkyyden takia tulokset ovat alhaisempia, kuin nykyisillä käytössä olevilla kaupallisilla menetelmillä. Uuden referenssimenetelmän käyttöönotto muuttaisi siten viitearvoja, ja vaatisi käytössä olevien rutiinimenetelmien uudelleen kalibroinnin referenssimenetelmää vastaavalle tasolle. (Koskinen 1997, 81–82.) Uusi referenssimenetelmä on hyväksytty IFCC:n jäsenien kesken vuonna 2002 ja menetelmä voi osoittautua GHb määritysten maailmanlaajuisen standardisoinnin perustaksi (Sacks 2003, 1245–1247; John 2003, 1199–1212). Referenssimenetelmä tulisi ottaa käyttöön, mutta se tuskin tulee kysymykseen rutiinianalytiikassa, koska laitteisto on kallis sekä monimutkainen asentaa että käyttää (Penttilä ym. 2004, 99–102; Sacks 2003, 1245–1247).

7 TUTKIMUSTAVOITE JA TUTKIMUSTEHTÄVÄT

Opinnäytetyön tavoitteena on tehdä menetelmävertailua kolmen GHbA_{1c}:tä määrittävän analysaattorin kesken. Menetelmävertailut suoritetaan eritasoisilla potilasnäytteillä. Käytettävät analysaattorit ovat Bio-Rad Variant™ II ja Bio-Rad D-10™ Dual Program ja DCA 2000®+. Työssä tutkitaan myös Bio-Rad D-10™ Dual Program -laitteen tulostasoa ja toistettavuutta eritasoisten potilasnäytteiden ja kaupallisten kontrollien avulla.

Opinnäytetyömme yhtenä tavoitteena on erottaa ja tunnistaa uuden analysaattorin eli Bio-Radin D-10™ Dual Program -laitteen avulla Keski-Suomen alueella esiintyvä HbA_{1c}-analyysejä häiritsevä hemoglobiinifraktio.

Tutkimustehtävät:

1. Miten eri GHbA_{1c}-analysaattorit eroavat toisistaan periaatteiltaan ja tuloksiltaan?
2. Mikä glykoituneen hemoglobiinin fraktio esiintyy Keski-Suomen alueella?
3. Mikä merkitys tällä fraktiolla on eri GHbA_{1c}-analyyseissä?

8 TUTKIMUKSEN TOTEUTUS

8.1 Tutkimuksen kulku

Analyysit suoritettiin Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriossa 26.6.–11.7.2005. Näytteet analyysijä varten kerättiin Bio-Rad Variant™ II Hemoglobiin Testing System -analysaattorin edellisenä päivänä analysoiduista näytteistä. Näytteistä pyrittiin valikoimaan mahdollisimman eritasoisia HbA_{1c}-tuloksia. Kaikki kolmen viikon aikana tulleet varianttinäytteet otettiin mukaan tutkimukseen. Nämä näytteet oli Variant II -analysaattorin lisäksi analysoitu myös Bayerin DCA 2000[®] +-analysaattorilla.

Bio-Rad D-10™ Dual Program -laite oli kliinisen kemian laboratoriossa lainassa tutkimuksemme ajan. Bio-Rad D-10™ Dual Program on nestekromatografinen menetelmä, joka perustuu hemoglobiinimolekyylien erilaisiin varauksiin. Bio-Rad D-10™ Dual Program -analysaattoriin kuuluu kaksi ohjelmaa. Lyhyellä ohjelmalla määritetään HbA_{1c}:n prosentuaalinen pitoisuus kokonaishemoglobiinista ja pitkällä ohjelmalla A₂:n, F:n ja A_{1c}:n prosenttiosuudet kokonaishemoglobiinista. Pitkä ohjelma soveltuu myös joidenkin epänormaalien hemoglobiinien havaitsemiseen. Molemmat ohjelmat käyttävät samaa pylvästä ja samoja puskuri- ja pesuliuoksia. Lyhyen ohjelman kesto on 3 minuuttia ja pitkän ohjelman kesto 6,5 minuuttia per näyte.

Testasimme Bio-Rad D-10™ Dual Program -laitteen toistettavuutta eritasoisilla potilasnäytteillä sekä sarjojen välistä tulostasoa kaupallisten kontrollien avulla. Vertasimme Bio-Rad D-10™ -analysaattorin lyhyttä ja pitkää ohjelmaa toisiinsa potilasnäytteiden avulla. Molempien ajo-ohjelmien tuloksia verrattiin myös Bio-Rad Variant™ II:n antamiin HbA_{1c}-tuloksiin. Varianttinäytteitä analysoitaessa mukaan laitevertailuun otettiin DCA 2000[®] +, joka mittaa HbA_{1c}-pitoisuutta täysin toisella periaatteella kuin kaksi muuta analysaattoria. Kaikki näyteajot suoritettiin laitevalmistajan ohjeen mukaisesti.

8.2 Näyte

Verinäyte GHbA_{1c} -määrittystä varten voidaan ottaa laskimosta tai kapillaarinäytteenä sormenpästä. Näyte B-GHb-A_{1c}:n analysointia varten otetaan K2-EDTA-antikoagulanttia sisältävään näyteputkeen. Näytteenotto ei edellytä paastoa, koska glykohemoglobiinin taso kuvastaa diabeteksen keskimääräistä tasapainoa 2-8 viikon ajalta ennen näytteenottoa. Se ei siis kuvaa näytteenottohetkellä vallitsevaa veren glukoositasoa. Näyte säilyy huoneenlämmössä yhden vuorokauden ja + 4 °C:ssa yhden viikon. (Yhtyneet laboratoriot käsikirja; Sacks ym. 2002, 426–472.)

Potilasnäytteitä tutkimuksessamme oli 42 kappaletta, joista teimme yhteensä 104 määrittystä Bio-Rad D-10™ Dual Program -analysointilaitteella. Rinnakkaismääritykset Bio-Rad Variant™ II Hemoglobiini A_{1c} Program -analysointilaitteella ja DCA 2000® + -analysointilaitteella teki Keski-Suomen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorion henkilökunta. Näytteet eivät vaatineet esikäsittelyä.

8.3 Käytetyt reagenssit

Tutkimuksessa käytetyt kontrolli- ja kalibraatioliuokset näkyvät taulukossa 1.

TAULUKKO 1. Analyseissä käytetyt reagenssit ja niiden valmistaja

<u>Reagenssi</u>	<u>Valmistaja</u>
Lyphochek® Diabetes Control Tasot 1 ja 2	Bio-Rad Laboratoriot
Lyphochek® Hemoglobiini A ₂ Control Tasot 1 ja 2	Bio-Rad Laboratoriot
HbA _{1c} Calibrator/Diluent Set	Bio-Rad Laboratoriot
HbA ₂ /F/A _{1c} Calibrator/Diluent Set	Bio-Rad Laboratoriot

Kontrollien valmistus:

Kaikki kontrollit valmistettiin samalla tavalla laitteen työohjeen mukaisesti siten, että kontrollin ja diluentin (laimennusneste) suhde oli 1:301. Laimennos tehtiin pipetoimalla diluenttia 900 µl näytekuppiin ja 3 µl kontrolliliuosta jonka jälkeen näyteseos sekoitettiin hyvin.

Kalibraattorien laimennus:

Kalibraattorit 1 ja 2 valmistettiin valmistajan ohjeen mukaisesti lisäämällä 7 ml diluenttia kylmäkuivattua reagenssia sisältävään pulloon.

8.4 Käytetyt mittalaitteet

Tutkimuksessa käytetyt laitteet ovat taulukossa 2.

TAULUKKO 2. Analyyseissä käytetyt mittalaitteet, niiden valmistajat ja tyypit

Mittalaite	Valmistaja	Tyyppi
Kationinvaihto HPLC	Bio-Rad	Variant™ II Hemoglobiin A _{1c} Program
Kationinvaihto HPLC	Bio-Rad	D-10™ Dual Program
Latex-agglutinaation inhibiitio	Bayer	DCA 2000®+

8.4.1 Mittalaitteiden toimintaperiaate

Kationinvaihto HPLC:

Kationinvaihtokromatografian erotuskyky perustuu hemoglobiinimolekyylien erilaisiin sähköisiin varauksiin. Laitteessa oleva pylväs on täytetty silikapartikkeleilla, jotka on päällystetty negatiivisesti varautuneella stationäärifaasilla, johon positiivisesti

varautuneet hemoglobiinimolekyylit sitoutuvat. Kationinvaihtokromatografiassa liikkuva faasi sisältää kaksi puskuriliuosta, joista puskuri A:ssa on matala suolapitoisuus ja puskuri B:ssä korkea. Hemoglobiinin alalajit eluoituvat kationinvaihtopylvästä eri ajassa riippuen puskurina käytetyn liuoksen ionivahvuudesta. Ensimmäiseksi irtoavat pienemmän positiivisen varauksen omaavat Hb-molekyylit. Spektrofotometri mittaa Hb:n konsentraation jokaisesta kerätystä fraktiosta laskemalla kunkin piikin pinta-alan. Hb-fragmenttien absorbanssi mitataan aallonpituudella 415 nm ja jokaisen fragmentin prosenttiosuus lasketaan vertaamalla sen määrää totaali-Hb:n määrään. Kationinvaihtokromatografit ovat täysin automaattisia, eivätkä vaadi labiilin fraktion poistoa tai hemolysointia. Näytteessä olevat poikkeavuudet voidaan havaita kromatogrammista. Kaikki automaattiset HPLC- menetelmät toimivat samankaltaisella periaatteella. (Bry ym. 2001, 153–163.) Tässä opinnäytetyössä kationinvaihtokromatografisia menetelmiä olivat Bio Rad Variant™ II Hemoglobin Testing System (kuva 1) ja Bio-Rad D-10™ Dual Program (kuva 2).



Kuva. M. Somppi

KUVA 1. Bio-Rad Variant II™ Hemoglobin Testing System



KUVA 2. Bio-Rad D-10™ Dual Program (Bio-Rad Laboratories 2006)

Latex-agglutinaation inhibitio:

DCA 2000[®]+ analysaattorin toiminta perustuu latex-agglutinaation inhibitioon, joka on immunologinen menetelmä. DCA 2000[®]+ analysaattori (kuva 3) määrittää HbA_{1c}:n ja kokonahemoglobiinin konsentraation, ja antaa HbA_{1c}:n tuloksen näiden suhteena. Näytteet analysoidaan yksitellen käyttäen kertakäyttöisiä reagenssikasetteja, joissa on kaikki reagenssit valmiina. Yhden näytteen analysointi-aika on 6 minuuttia. Analysaattorilla on hyvä sarjojen sisäinen ja -välinen tarkkuus ja menetelmä ovat

kalibroitu reagenssivalmistajan toimesta HPLC-referenssimenetelmää vastaan. (John 2003, 1199–1212.)

Periaatteena kokonaishemoglobiinimäärityksessä on, että kaliumferrosyanidi hapettaa näytteen hemoglobiinin methemoglobiiniksi, joka yhdistyy tiosyanaatin kanssa. Muodostuneen tiosyanaatti-methemoglobiinikompleksin värin intensiteetti 531 nm:ssä on suoraan verrannollinen näytteen Hb-pitoisuuteen. (John 2003, 1199–1212.)

HbA_{1c}:n pitoisuus näytteestä mitataan latex-agglutinaation inhibitiomenetelmällä. Menetelmässä HbA_{1c}:n immunoreaktiivisesta osasta kopioidut synteettiset polymeerit agglutinoivat HbA_{1c}-spesifisellä vasta-aineella päällystettyjä latex-partikkeleita. Agglutinaatio aiheuttaa valon sirontaa, joka mitataan absorbanssin kasvuna aallonpituudella 531 nm. Näytteessä oleva HbA_{1c} kilpailee synteettisen polymeerin kanssa rajoitetuista HbA_{1c} vasta-aineiden sitoutumiskohdista, jolloin agglutinaatio estyy ja valon sironta vähenee. Valon sirontaan väheneminen on verrannollinen näytteessä olevan HbA_{1c}:n määrään. Lopuksi laite laskee HbA_{1c}:n % -osuuden kokonaishemoglobiinista. (John 2003, 1199–1212.)



Kuva. M. Somppi

KUVA 3. DCA 2000[®]+

9 TILASTOLLISET MENETELMÄT

Keskiarvot laskettiin seuraavalla kaavalla (Miller & Miller 2000, 20):

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n},$$

missä

\bar{x}_i = yksittäisen näytteen mittaustulos

n = näytteiden lukumäärä

Standardipoikkeamat laskettiin seuraavasti (Miller & Miller 2000, 21):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$

missä

\bar{x} = keskiarvo

\bar{x}_i = yksittäisen näytteen mittaustulos

n = näytteiden lukumäärä

Variaatiokerroin eli CV % laskettiin seuraavasti (Miller & Miller 2000, 23):

$$\text{CV \%} = \frac{s}{\bar{x}} * 100,$$

missä

s = standardipoikkeama

\bar{x} = keskiarvo

Luottamusväli laskettiin seuraavalla kaavalla (Miller & Miller 2000, 29–31):

$$\mu = \bar{x} \pm t_{0,05(n)} \frac{s}{\sqrt{n}},$$

jossa t riippuu sekä vapausasteesta (n-1) että vaaditusta luottamustasosta

\bar{x} = keskiarvo

t = t-jakauman taulukoitu arvo 95 %:n luottamustason mukaan

s = standardipoikkeama

n = näytemäärä

Tässä opinnäytetyössä menetelmävertailu suoritettiin lineaarisen regression (R^2) avulla. Linearisella regressiolla voidaan verrata kahta eri menetelmää, joissa näytekonsentraatiot ovat hyvin erilaisia. Menetelmässä x-akselille sijoitetaan referenssimenetelmän tulokset ja y-akselille uuden menetelmän tulokset. Jokainen saatu piste kuvastaa siten tulosta kahdella eri menetelmällä. (Miller & Miller 2000, 126–130.)

Lineaarisuutta kuvastaa korrelaatiokerroin (r), joka voi saada arvoja välillä $-1 < r < +1$ (Miller & Miller 2000, 111).

r = -1 täydellinen negatiivinen korrelaatio

r = 1 täydellinen positiivinen korrelaatio

r = 0 x:n ja y:n välillä ei lineaarista riippuvuutta

10 TULOKSET

10.1 Bio-Rad D-10™ -analyssaattorin sisäinen tasovertailu

10.1.1 Lyhyt ajo

Bio-Rad D-10™ Dual Program –laitteen lyhyen ajon sisäinen vertailu suoritettiin kahdella eritasoisella potilasnäytteellä. Rinnakkaisia määrittämiä suoritettiin molemmilla näytteillä 13 kappaletta. (Taulukko 3) Näytteen 1 HbA_{1c}-arvo oli 5,4 %, joten se oli normaalirajoissa (4,0–6,0 %). Näytteen 2 HbA_{1c}-arvo 8,3 % viittaa huonoon diabeteksen hoitotasapainoon (7,5–8,5 %). Näytteissä ei Bio-Rad Variant™ II -analyssaattorin kromatogrammin perusteella esiintynyt hemoglobiinivarianttia (liite 2). Molempien näytteiden rinnakkaismäärittämisistä laskettiin keskiarvon lisäksi standardipoikkeama (s), variaatiokerroin (CV%) ja luottamusväli (μ). Näytteen 1 standardipoikkeamaksi saatiin 0,05, variaatiokertoimeksi 0,92 ja luottamusväliksi 5,39 ± 0,03. Näytteelle 2 vastaavat tulokset olivat s = 0,12, CV% = 1,45 ja μ = 8,25 ± 0,08.

TAULUKKO 3. Bio-Rad D-10™: Lyhyen ajon sisäinen vertailu kahdella eritasoisella potilasnäytteellä

	Näyte 1	Näyte 2
1	5,4	8,5
2	5,3	8,0
3	5,3	8,1
4	5,4	8,2
5	5,4	8,2
6	5,4	8,3
7	5,4	8,3
8	5,4	8,3
9	5,4	8,3
10	5,4	8,3
11	5,4	8,3
12	5,5	8,3
13	5,4	8,2
Keskiarvo, \bar{x}	5,392308	8,253846
Standardipoikkeama, s	0,049355	0,119829
Variaatiokerroin, CV%	0,92	1,45
Luottamusväli, μ	5,39 ± 0,03	8,25 ± 0,08

10.1.2 Pitkä ajo

Bio-Rad D-10™ Dual Program -analysointilaitteen pitkän ajon sisäinen vertailu suoritettiin kahdella eritasoisella potilasnäytteellä. Rinnakkaisia määrittämiä suoritettiin 10 kappaletta molemmilla potilasnäytteillä. (Taulukko 4) Näytteen 1 HbA_{1c}-arvo (5,3 %) oli normaalirajoissa (4,0–6,0 %) ja näytteen 2 arvo (8,6 %) normaalirajojen yläpuolella huonon hoitotasapainon alueella (7,5–8,5 %). Näytteissä ei Bio-Rad Variant™ II –analysointilaitteen kromatogrammin perusteella esiintynyt hemoglobiinivarianttia. Molempien näytteiden rinnakkaismäärittämisistä laskettiin keskiarvon lisäksi standardipoikkeama (s), variaatiokerroin (CV%) ja luottamusväli (μ). Näytteen 1 standardipoikkeamaksi saatiin 0,10, variaatiokertoimeksi 1,84 ja

luottamusväliksi $5,26 \pm 0,07$. Näytteelle 2 vastaavat tulokset olivat $s = 0,05$, $CV\% = 0,60$ ja $\mu = 8,56 \pm 0,04$.

TAULUKKO 4. Bio-Rad D-10™: Pitkän ajon sisäinen vertailu kahdella eritasoisella potilasnäytteellä

	Näyte 1	Näyte 2
1	5,3	8,6
2	5,3	8,6
3	5,3	8,6
4	5,3	8,6
5	5,1	8,6
6	5,1	8,5
7	5,4	8,6
8	5,2	8,5
9	5,3	8,5
10	5,3	8,5
Keskiarvo, \bar{x}	5,26	8,56
Standardipoikkeama, s	0,096609	0,05164
Variaatiokerroin, $CV\%$	1,84	0,60
Luottamusväli, μ	$5,26 \pm 0,07$	$8,56 \pm 0,04$

10.2 Bio-Rad D-10™ -analysointisarjojen välinen tasoverailu

Bio-Rad D-10™ Dual Program -laitteen sarjojen välinen vertailu sekä lyhyelle että pitkälle ajolle toteutettiin kaupallisten kontrollinäytteiden avulla. Lyhyen ajon kontroleina käytettiin Lyphochek® Diabetes Bi-level Control -liuoksia, joita oli kahta eri tasoa: Low ja High. Pitkän ajon kontrollikitti oli Lyphochek® Hemoglobiin A2 Bi-level Control, joka sisälsi kaksi eritasoista kontrollia: Low ja High. Kontrollit ajettiin jokaisena mittauspäivänä ennen varsinaista näyteajoa. Lyhyelle ajolle erillisiä mittausarjoja suoritettiin 5 kappaletta ja pitkälle ajolle 8 kappaletta (Taulukko 5). Eri päivinä saaduista rinnakkaistuloksista laskettiin jokaiselle kontrolliliuokselle keskiarvo, keskihajonta, variaatiokerroin ja luottamusväli. Lyhyen ajon matalan

kontrollin (Low) keskiarvoksi saatiin 5,3 %, standardipoikkeamaksi 0,07, variaatiokertoimeksi 1,33 ja luottamusväliksi $5,30 \pm 0,09$. Lyhyen ajon korkean kontrollin (High) vastaavat arvot olivat $\bar{x} = 9,7$ %, $s = 0,04$, CV% 0,46 ja $\mu = 9,68 \pm 0,06$. Pitkän ajon matalan kontrollin (Low) keskiarvoksi saatiin 5,0 % ja standardipoikkeamaksi 0,63. Variaatiokerroin oli 12,61 ja luottamusväli $5,0 \pm 0,5$. Pitkän ajon korkean kontrollin (High) rinnakkaistulosten arvoiksi saatiin vastaavasti $\bar{x} = 6,9$ %, $s = 1,72$, CV% 25,19 ja $\mu = 6,9 \pm 1,4$.

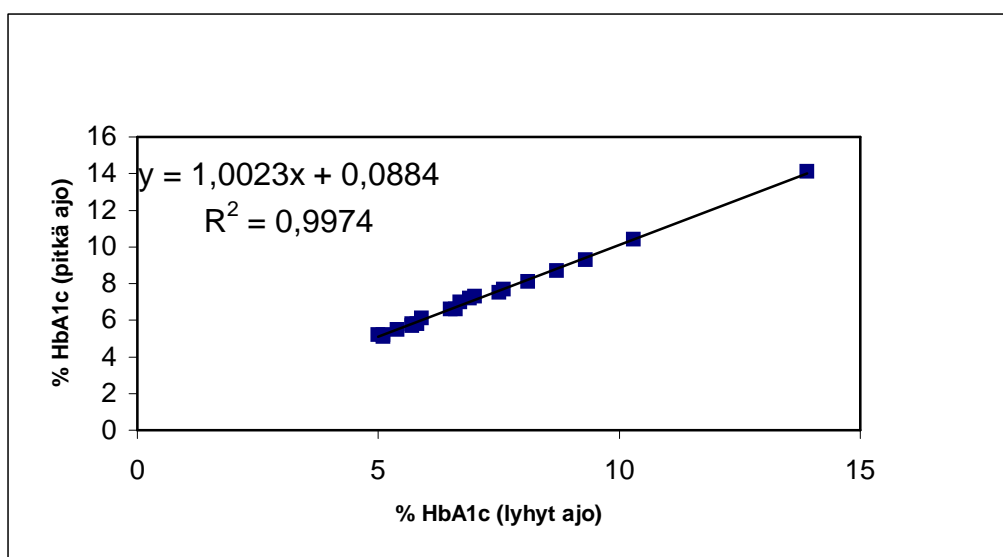
TAULUKKO 5. Bio-Rad D-10™: Sarjojen välinen vertailu kontrollinäytteiden avulla

	Lyhyt ajo			Pitkä ajo	
	Low	High		Low	High
1	5,3	9,7	1	5,3	9,7
2	5,4	9,7	2	5,5	6,0
3	5,2	9,7	3	5,6	6,1
4	5,3	9,7	4	5,5	6,0
5	5,3	9,6	5	5,2	9,6
			6	4,2	5,8
			7	4,2	5,9
			8	4,3	5,8
Keskiarvo, \bar{x}	5,30	9,68		4,98	6,86
Standardipoikkeama, s	0,070711	0,044721		0,627353	1,723731
Variaatiokerroin, CV%	1,33	0,46		12,61	25,19
Luottamusväli, μ	$5,30 \pm 0,09$	$9,68 \pm 0,06$		$5,0 \pm 0,5$	$6,9 \pm 1,4$

10.3 Bio-Rad D-10™ -analysaattorin pitkän ja lyhyen ajo-ohjelman välinen vertailu

Bio-Rad D-10™ Dual Program -analysaattorin pitkää ja lyhyttä ajo-ohjelmaa verrattiin 20 eritasoisella potilasnäytteellä (kuviot 8). Näytteet valittiin edellisenä päivänä Bio-Rad Variant™ II:lla analysoiduista näytteistä siten, että ne kattoivat mahdollisimman laajan HbA_{1c}-pitoisuusalueen. Näytteissä ei esiintynyt

varianttihemoglobiinia Bio-Rad Variant™ II -analysointorin kromatogrammin perusteella. Saadut tulokset näkyvät liitteessä 1 sivulla 1. Tuloksia tarkasteltiin lineaarisen regression avulla siten, että lyhyen ajon tulokset asetettiin x-akselille ja pitkän ajon tulokset y-akselille. Mittauspisteisiin sovitetun suoran avulla saatiin selville korrelaatiokerroin (R^2), jonka arvo oli 0,9974.

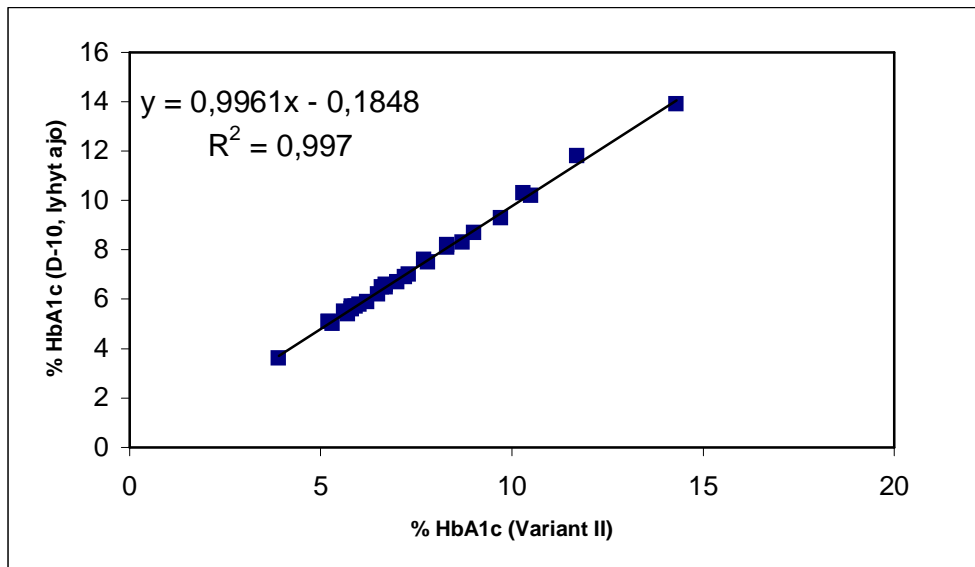


KUVIO 8. Bio-Rad D-10™ ajo-ohjelmien välinen vertailu

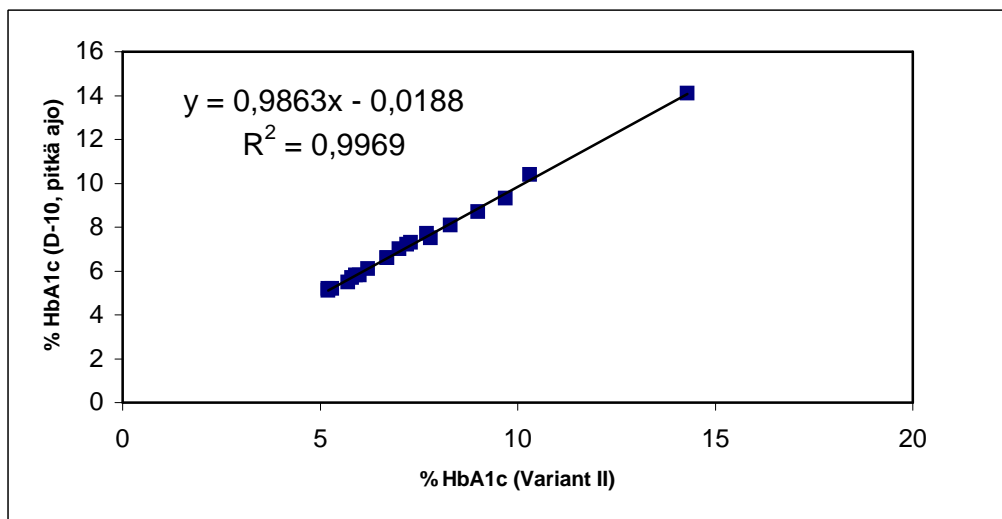
10.4 Bio-Rad Variant™ II ja Bio-Rad D-10™ -analysointoreiden välinen vertailu

Bio-Rad Variant™ II ja Bio-Rad D-10™ -analysointoreita verrattiin sekä lyhyen ajo-ohjelman että pitkän ajo-ohjelman osalta. Bio-Rad D-10™:n lyhyttä ajoa ja Bio-Rad Variant™ II -analysointoria verrattiin 30 potilasnäytteellä, jotka valittiin edellisenä päivänä analysoiduista mahdollisimman eritasoisista näytteistä (kuvio 9). Pitkää ajoa ja Bio-Rad Variant™ II analysointoria verrattiin 20 potilasnäytteellä (kuvio 10). Näytteitä oli 10 vähemmän johtuen ajo-ohjelman pitkästä ajoajasta. Näyttemäärä katsottiin kuitenkin riittäväksi. Näytteissä ei esiintynyt varianttihemoglobiinia Bio-Rad Variant™ II -analysointorin kromatogrammien perusteella. Tulokset on esitetty liitteessä 1 sivulla 2. Eri menetelmiä verrattiin toisiinsa lineaarisen regression avulla, jossa käytetty referenssimenetelmä oli x-akselilla ja uusi menetelmä y-akselilla. Vertailtaessa Bio-Rad D-10™ -analysointorin lyhyttä ohjelmaa ja Bio-Rad Variant™ II -analysointoria saatiin korrelaatiokertoimeksi 0,997. Bio-Rad D-10™ pitkän

ohjelman ja Bio-Rad Variant™ II -analysointilaitteen välinen vertailu tuotti korrelaatiokertoimeksi 0,9969.



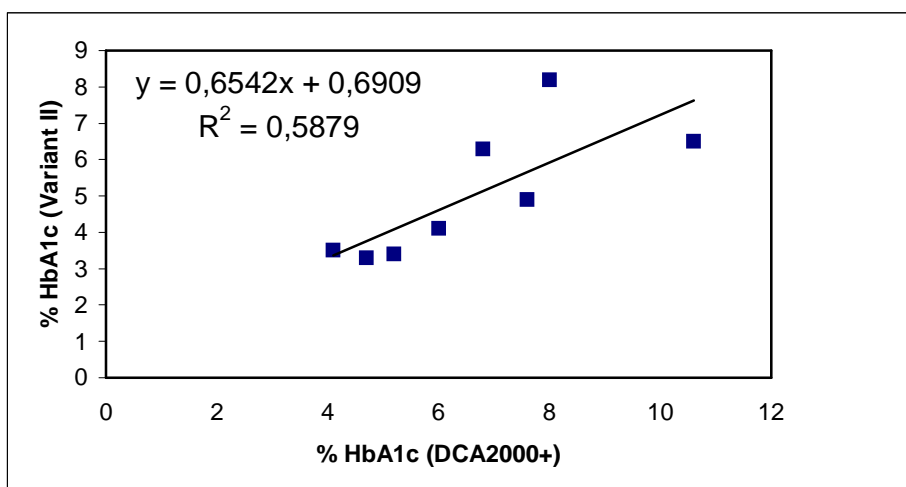
KUVIO 9. Bio-Rad D-10™ lyhyen ohjelman ja Bio-Rad Variant™ II -analysointilaitteen välinen vertailu



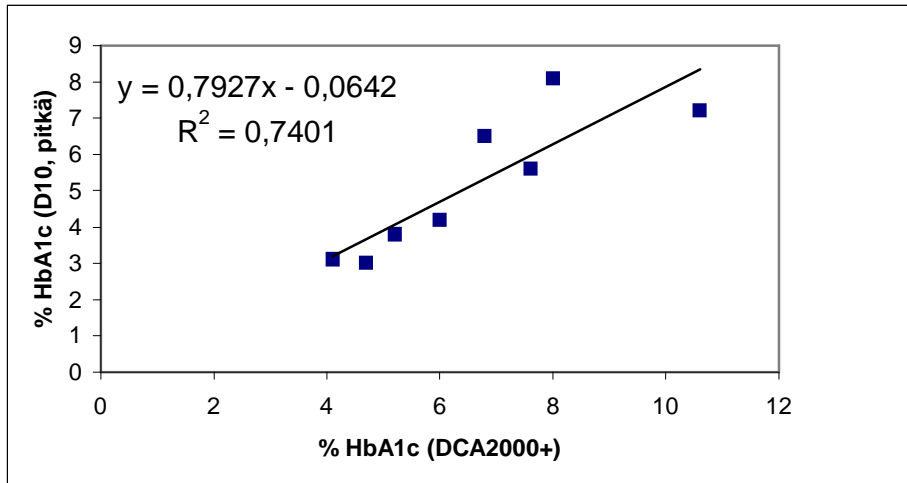
KUVIO 10. Bio-Rad D-10™ pitkän ohjelman ja Bio-Rad Variant™ II -analysointilaitteen välinen vertailu

10.5 Varianttinäytteiden vertailu

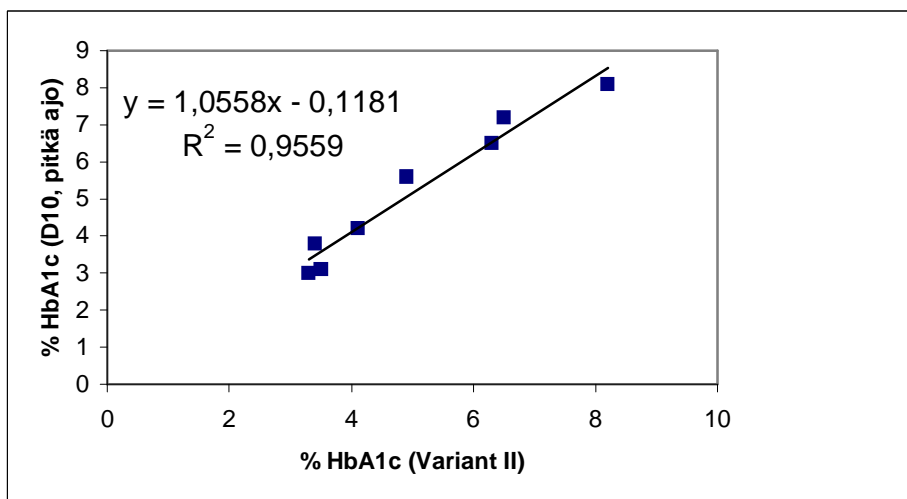
Tutkimuksemme aikana kaikki esiin tulleet varianttinäytteet (6 kappaletta) analysoitiin kolmella eri analysaattorilla: Bio-Rad Variant™ II Hemoglobiin A_{1c} Program, DCA 2000®+ ja Bio-Rad D-10™ Dual Program. Bio-Rad Variant™ II ja Bio-Rad D-10™ perustuvat kationinvaihtokromatografiaan ja DCA 2000®+ on immunokemiallinen menetelmä. Bio-Rad D-10™ -analysaattorista valittiin määrittäisiin pitkä ohjelma sen teoreettisesti paremman erottelukyvyn perusteella. Analysoitavat varianttinäytteet valittiin Bio-Rad Variant™ II -analysaattorin kromatogrammien perusteella, eli kromatogrammeissa näkyi varianttihemoglobiinille tyypillinen kaksoispiikki (liite 3). Näytteet analysoitiin kerran tai kaksi kertaa viikossa, jotta säilytysaika olisi asianmukainen. Varianttinäytteitä analysoitiin 6 kappaletta jokaisella analysaattorilla. Lisäksi mukana vertailussa oli kaksi normaalia HbA_{1c}-näytettä, joilla tarkkailtiin laitteiden tulostasoa. Tulokset on esitetty kuvioissa 11, 12 ja 13. Numeeriset tulokset on esitetty liitteessä 1 sivulla 3. Eri menetelmiä verrattiin toisiinsa lineaarisen regression avulla. DCA 2000®+-analysaattorin tulokset asetettiin x-akselille, koska pidimme analysaattoria luotettavimpana varianttinäytteiden osalta. Bio-Rad Variant™ II ja DCA 2000®+-analysaattoreiden välinen vertailu hemoglobiinivarianttinäytteillä antoi tulokseksi korrelaatiokertoimen 0,5879. Korrelaatiokertoimen arvo Bio-Rad D-10™ pitkä ohjelmaa ja DCA 2000®+ -analysaattoria vertailtaessa oli 0,7401. Lopuksi verrattiin vielä Bio-Rad D-10™ -analysaattorin pitkä ohjelmaa ja Bio-Rad Variant™ II -analysaattoria keskenään, jolloin korrelaatiokertoimen arvoksi saatiin 0,9559.



KUVIO 11. Bio-Rad Variant™ II ja DCA 2000®+-analysaattoreiden välinen vertailu hemoglobiinivarianttinäytteillä



KUVIO 12. Bio-Rad D-10™ pitkän ohjelman ja DCA 2000®+-analysointilaitteen välinen vertailu hemoglobiiniinivarianttinäytteillä



KUVIO 13. Bio-Rad D-10™ pitkän ohjelman ja Bio-Rad Variant™ II-analysointilaitteen välinen vertailu hemoglobiiniinivarianttinäytteillä

11 TULOSTEN TARKASTELU

Opinnäytetyössä tarkastelimme Bio-Rad D-10TM Dual Program -analysaattorin toistettavuutta sekä sarjan sisällä että sarjojen välillä. Lyhyen ajon sisäinen vertailu tehtiin kahdella eritasoisella potilasnäytteellä. Suhteellinen hajonta (CV%) tasolla 5,4 oli 0,92 ja tasolla 8,3 suhteelliseksi hajonnaksi saatiin 1,45. Valmistajan vastaavassa vertailussa vastaaviksi CV%:ksi saatiin 0,8 (HbA_{1c}-taso 6,0) ja 0,5 (taso 10,3) (Bio-Rad 2004). Bio-Rad D-10TM analysaattorin pitkän ohjelman vastaavat tulokset olivat tasolla 5,3 CV% 1,84 ja tasolla 8,6 CV% 0,6. Valmistajan luotettavuusvertailussa tulokset olivat 0,8 (taso 5,9) ja 0,3 (taso 13,1) (Bio-Rad 2004). Tulostemme perusteella voidaan todeta, että sekä lyhyt että pitkä ajo-ohjelma antavat varsin toistettavia tuloksia ja menetelmää voidaan pitää luotettavana. Tuloksien luotettavuutta lisäävät valmistajan saamat vastaavat tulokset.

Bio-Rad D-10TM Dual Program -analysaattorin sarjojen välinen vertailu tehtiin kahdella eritasoisella (High ja Low) kaupallisella kontrolliliuoksella. Matalan kontrollin CV% oli 1,33 ja korkean kontrollin 0,46. Valmistajan vastaavat tulokset on saatu kahdella eritasoisella potilasnäytteellä, jolloin CV%:ksi on saatu 2,7 ja 1,8 (Bio-Rad 2004). Lyhyen ajo-ohjelman kontrollitulokset olivat varsin hyviä ja vastasivat valmistajan saamia tuloksia. Tuloksen arvoa vähentää kuitenkin kontrollisarjojen vähäinen määrä (5 kappaletta). Pitkän ajo-ohjelman kontrollinäytteitä ajettaessa meillä oli huomattavia ongelmia. CV%:t sekä matalalle (CV% = 12,61) että korkealle (CV% = 25,19) kontrollinäytteelle olivat todella suuria. Pitkä ajo-ohjelma vaati kalibroinnin 24 tunnin välein ja aina kun lyhyestä ohjelmasta siirryttiin pitkään ohjelmaan.

Kalibraatioliuoksen lyhyellä käyttöiällä (10vrk) saattoi olla vaikutusta varsinkin matalan kontrollinäytteen tulosten laskuun. Uuden kalibraattorin liuotus ei kuitenkaan nostanut matalan kontrollin tulostasoa. Korkean kontrollinäytteen vaihtelulle (CV% = 5,8–9,7) meillä ei ole mitään selitystä. Valmistajalla ei tulosten perusteella ole ollut ongelmia sarjojen välistä vertailua tehtäessä. Matalan potilasnäytteen suhteellinen hajonta sarjojen välisessä vertailussa oli 1,4 ja korkean potilasnäytteen CV% oli 0,8 (Bio-Rad 2004).

Bio-Rad D-10TM -analysaattorin pitkää ja lyhyttä ajo-ohjelmaa verrattiin eritasoisilla potilasnäytteillä. Pitkä ja lyhyt ajo-ohjelma korreloivat hyvin keskenään ($R^2 = 0,9974$). Valmistajan saama korrelaatiokertoimen arvo $R^2 = 0,9953$ tukee erinomaisesti saamiamme tuloksia (Bio-Rad, 2004).

Bio-Rad VariantTM II-analysaattoria verrattiin Bio-Rad D-10TM -analysaattorin lyhyeen ja pitkään ajo-ohjelmaan. Sekä lyhyen että pitkän ajo-ohjelman tulokset vastasivat Variant II -analysaattorin tuloksia. Korrelaatiokertoimiksi saatiin lyhyelle ajo-ohjelmalle $R^2 = 0,997$ ja pitkälle ajo-ohjelmalle $R^2 = 0,9969$. Laittevalmistajan tulokset samoista testeistä vastasivat saamiamme tuloksia (lyhyt ajo $R^2 = 0,9945$, pitkä ajo $R^2 = 0,9843$) (Bio-Rad, 2004). Ennen varsinaista näyteajoa kalibroimme analysaattorin tarvittaessa ja ajoimme kontrollinäytteet. Jos kontrollinäytteet eivät olleet valmistajan asettamissa rajoissa, ajoimme kontrollit uudelleen. Pidämme tuloksia luotettavina, koska näyteajossa ei esiintynyt ongelmia ja näytteitä ajettiin vain voimassaolevan kalibroinnin aikana ja kontrollien ollessa rajoissa. Molemmat analysaattorit olivat valmistajan toimesta kalibroitu DCCT-tutkimuksen referenssimenetelmää vastaan.

Hemoglobiinivarianttinäytteiden tarkastelussa mukaan tutkimukseen otettiin Bayerin DCA 2000[®]+ -analysaattori. Varianttinäytteitä vertailtaessa laitteiden väliset erot tulivat selvästi esiin. Bio-Rad VariantTM II ja Bio-Rad D-10TM -analysaattorit antoivat järjestelmällisesti matalampia tuloksia varianttinäytteille kuin DCA 2000[®]+ -analysaattori. Kromatografisten menetelmien ongelma tuli hyvin esille tässä tutkimuksessa. Keski-Suomen alueella esiintyvä hemoglobiinifraktio tulee niin lähellä HbA_{1c}-piikkiä, että Bio-Rad Variant IITM ja Bio-Rad D-10TM -laitteiden erotuskyky ei riitä erottamaan sitä HbA_{1c}-fraktiosta. Bio-Rad Variant IITM:sen kromatogrammissa nähdään kuitenkin ylimääräinen piikki, joka osoittaa hemoglobiinivariantin läsnäolon. Havaitsimme, että Bio-Rad D-10TM -analysaattorin kromatogrammi ei osoita yhtä luotettavasti hemoglobiinivariantin läsnäoloa kuin Bio-Rad Variant IITM. Kahdessa näytteessä kaksoispiikki näkyy selvästi kromatogrammissa, mutta muissa näytteissä varianttihemoglobiinin läsnäolo jää epäselväksi (liitteet 4 ja 5).

DCA 2000[®]+ -analysaattorin antamat korkeammat HbA_{1c}-arvot varianttinäytteille johtuvat todennäköisesti menetelmästä. Menetelmässä vasta-aineet tunnistavat spesifisesti hemoglobiinin β -ketjun 3 ensimmäistä aminohappoa sekä ketjun N-

terminaaliseen päähän sitoutuneen glukoosin (John 2003, 1204). Koska immunokemiallinen menetelmä antaa selvästi korkeampia tuloksia varianttinäytteille kuin kromatografiset menetelmät, voidaan olettaa, että Keski-Suomen alueella esiintyvä hemoglobiinimutaatio on tapahtunut muualla kuin kolmen ensimmäisen aminohapon alueella. Koska vasta-aine/antigeeni reaktio on spesifinen, voidaan tulosta pitää luotettavana.

Bio-Rad D-10TM-analysaattorin pitkän ajo-ohjelman ja Bio-Rad Variant IITM-analysaattorin vertailu hemoglobiinivarianttinäytteillä osoitti, että analysaattoreiden välillä ei ole merkittävää eroa ($R^2 = 0,9559$). Tämä johtuu luultavasti siitä, että molemmat analysaattorit ovat saman valmistajan laitteita. Molemmat analysaattorit perustuivat samaan menetelmään, niissä oli samat puskuriliuokset ja lähes samanlainen pylväs. Vain ajoaika per näyte oli eri. Keski-Suomen alueella esiintyvää varianttia ei ainakaan tämän tutkimuksen perusteella ole mahdollista erottaa vain ajoaikaa pidentämällä vaan täytyisi vaihtaa myös muita parametrejä, kuten puskuriliuoksen koostumusta.

12 POHDINTA

Diabeteksen lisääntyminen ja Suomen kansainvälistyminen asettaa HbA_{1c}:tä määrittäville analyysilaitteille entistä suuremmat vaatimukset. Tutkimuksemme osoitti, että jotkin variantit selvästi häiritsevät HbA_{1c}-analyysejä. Suomessa on havaittu toistakymmentä varianttia (Ahola 2006, 11). Määrä on kuitenkin kasvussa, sillä ulkomaalaisen väestön lisääntyessä Suomeen tulee uusia hemoglobiinifraktioita. Tulosten luotettavuuden takia olisi hyvä löytää rutiinikäyttöön sellainen analysaattori, johon variantit eivät vaikuta.

Jo ennen kuin pääsimme aloittamaan analyysejä, kävi selville, että yksi tutkimuksemme tavoitteesta ei tule toteutumaan. Olimme odottaneet Bio-Rad D-10™ Dual Program-analysaattorin pystyvän erottamaan Keski-Suomen alueella esiintyvän variantin. Ennen kuin pääsimme testaamaan laitetta keskussairaalassa, kemisti Marja-Leena Ruopuro oli jo asian tutkinut ja havainnut, ettei laite pysty erottamaan kyseistä varianttia. Jouduimme hyväksymään sen tosiasian, että yhteen tutkimustehtäväämme ei saatu ratkaisua. Odotuksemme uutta laitetta kohtaan olivat suuret ja kuvittelimme tekevämme läpimurron Keski-Suomen alueella esiintyvän hemoglobiinivariantin tunnistamisessa. Olimme pettyneitä, mutta totesimme, että opinnäytetyömme ei suinkaan epäonnistunut tämän vuoksi. Päinvastoin saimme uutta intoa selvittää miten hemoglobiinivariantit syntyvät ja miten ne vaikuttavat eri analyyseissä.

Osa analyyseistä oli tehty meille valmiiksi, joten meille jäi sopivien näytteiden valitseminen sekä uuteen laitteeseen perehtyminen. Koska Bio-Rad D-10 oli lainalaite, ei kenelläkään laboratorion henkilökunnasta ollut kokemusta laitteen käytöstä. Laitteen käytön opettelimme melko omatoimisesti ja saimme samalla arvokasta kokemusta itsenäisen tutkimuksen suorittamisesta. Bio-Rad D-10™ -laitteen käyttö oli helppo oppia ja siitä oli olemassa hyvät pikaohjeet. Tämän vuoksi pystyimme viimeisten analyysien kohdalla vuorottelemaan siten, että vain toinen oli paikalla käyttämässä laitetta. Joitakin ongelmiaakin esiintyi, esimerkiksi Bio-Rad D-10™:n mukana tullut tulostuspaperi loppui kesken, jolloin kaikista analysoimistamme näytteistä ei jäänyt kromatogrammia myöhempää tarkastelua varten. Tarkoituksenamme oli tehdä analyyseja enemmän, mutta ilmeisesti kesälomakauden

vaikutuksesta näytemäärät olivat vähäisiä. Varsinkin variantteja sisältäviä näytteitä oli koko tutkimuksen ajan poikkeuksellisen vähän. Laajempi materiaali hemoglobiinivarianttien osalta olisi lisännyt tutkimuksen luotettavuutta.

Kaikkein mielenkiintoisinta oli tutkimustulosten valmistuttua nähdä tekemistämme taulukoista, kuinka paljon hemoglobiinivariantin esiintyminen vaikuttaa lopulliseen tulokseen. Tutkimuksessamme kävi ilmi, että Bio-Rad Variant II™ ja Bio-Rad D-10™ ovat tuloksiltaan samantasoisia analysaattoreita. Molempien analysaattoreiden heikkoutena on se, että ne eivät pystyneet erottamaan Keski-Suomen alueella esiintyvää hemoglobiinivarianttia. Rutiinikäyttöön Bio-Rad Variant™ II -analysaattori on selkeästi parempi vaihtoehto kuin Bio-Rad D-10™, koska Bio-Rad Variant™ II on tarkoitettu suurten näytemäärien käsittelyyn. Bio-Rad D-10™ -analysaattorilla voi ajaa vain kymmenen näytettä kerrallaan, jonka jälkeen näyteteline on ladattava uudelleen. Analysaattorin käytön tekee työlääksi se, että pitkä ajo-ohjelma vaatii kalibroinnin 24 tunnin välein ja/tai ajo-ohjelmaa vaihdettaessa. Myös Bio-Rad D-10™ -analysaattorin kromatogrammitulosteessa oli puutteita verrattuna Bio-Rad Variant™ II -analysaattorin tulosteeseen.

DCA 2000®+ on kolmesta vertailtavasta laitteesta luotettavin, jos näytteessä esiintyy hemoglobiinivariantti. Tutkimuksemme perusteella DCA 2000®+ -analysaattori olisi paras vaihtoehto HbA_{1c}-määrityksiin Keski-Suomen alueelle, mutta valitettavasti se ei sovellu suurten näytemäärien analysointiin. Laitteen käyttökustannukset ovat suuret ja sen käyttö sitoo henkilökuntaa, koska laitteella voidaan analysoida vain yhtä näytettä kerrallaan. Käyttökustannuksista johtuen, emme voineet ottaa analysaattoria mukaan normaalien HbA_{1c}-näytteiden menetelmävertailuun. DCA 2000®+ -laitteen huonoksi puoleksi koimme sen, että laite ei anna määrityksen kulusta mitään tulostetta.

Opinnäytetyömme pohjalta heräsi kiinnostavia jatkotutkimusaiheita. Koska Keski-Suomen alueella esiintyvä hemoglobiinivariantti jäi selvittämättä, jäi tämän arvoituksen ratkaisu tulevaisuuden haasteeksi. Hemoglobiinivariantin rakenteen selvittäminen on täysin mahdollista nykYTEKNIKOILLA, esimerkiksi elektroforeesilla, aminohappoanalyysillä tai DNA-sekvensoinnilla. Harvalla laboratoriollla on kuitenkin mahdollisuutta käyttää edellä mainittuja menetelmiä niiden monimutkaisuuden ja asiantuntijuuden puutteen vuoksi. Keski-Suomen

keskussairaalan kliinisestä laboratoriosta on lähetetty hemoglobiinivarianttinäyte Saksaan Bio-Radin laboratorioon tutkittavaksi, mutta maaliskuuhun – 06 mennessä emme ole saaneet mitään tietoa siitä, onko fraktio saatu erotettua. Tutkimuksen edetessä meillä oli tarkoitus selvittää myös fetaalihemoglobiinin (HbF) pitoisuutta näytteistä, koska D-10™ -analysaattorilla olisi pystytty luotettavasti määrittämään fetaalihemoglobiinia. Ongelmana Keski-Suomen keskussairaalan kliinisessä laboratoriossa on se, että Variant II -analysaattorin tulokset fetaalihemoglobiinin suhteen eivät ole luotettavia. Tutkimuksemme aikana ei kuitenkaan tullut yhtään fetaalihemoglobiininäytettä ja päätimme jättää tämän aiheen jatkotutkimusaiheeksi.

Opinnäytetyön tekeminen opetti etsimään tietoa eri lähteistä, muun muassa Internetistä ja kirjallisuudesta. Tärkeää oli huomata, että esimerkiksi kaikki Internetistä saatu tieto ei välttämättä ole luotettavaa. Tämän vuoksi emme tyytyneet pelkästään Internetistä saatuun tietoon, vaan käytimme alan arvostettuja kirjallisuusartikkeleita. Joskus myös kirjalliset lähteet olivat ristiriidassa keskenään, jolloin pyysimme apua mm. DCA 2000[®]+:n maahantuojalta. Käytimme työhön paljon englanninkielistä materiaalia, koska suomenkielistä tietoa oli hyvin vähän saatavilla.

Keski-Suomen alueella vallitsevan hemoglobiinivariantin löytymistä lukuun ottamatta, onnistuimme löytämään vastaukset työssämme mainittuihin tutkimustehtäviin. Jos Bio-Rad D-10™ olisi saapunut keskussairaalaan aikaisemmin, olisimme todennäköisesti saaneet tutkittavaksemme enemmän hemoglobiinivariantteja sisältäviä näytteitä ja tutkimuksen luotettavuus olisi parantunut. Mielestämme tutkimus on kuitenkin hyvin suuntaa antava näiden kolmen analysaattorin luotettavuudesta ja varianttien erotuskyvystä.

LÄHTEET

Ahola, T. 2006. Hemoglobiinivariantit Suomessa. Moodi 8–13.

Benjamin, R. & Sacks, D. 1994. Glycated Protein Update: Implications of Recent Studies, Including the Diabetes Control and Complications Trial. *Clinical Chemistry* 40 (5), 683–687.

Bio-Rad. 2004. D-10™ Dual Program Instruction Manual.

Bio-Rad Laboratories 2006. Saatavilla www-muodossa: URL:<http://www.bio-rad.com/>. Luettu 17.5.2006.

Bry, L., Chen, P. & Sacks, D. 2001. Effects of Hemoglobin Variants and Chemically Modified Derivates on Assays for Glycohemoglobin. *Clinical Chemistry* 47 (2), 153–163.

HbVar: A Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemias. Saatavilla www-muodossa: URL:<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>. Luettu 8.2.2006.

Hospital Practice Home Page. Saatavilla www-muodossa: URL:
<http://www.hosppract.com>. Luettu 8.2.2006.

Huhti, J. 1999. Maahanmuuttajan hematologiaa. Saatavilla www-muodossa: URL:<http://cc.oulu.fi/~sisawww/esit/990114.htm>. Luettu 16.1.2006.

Hänninen, A & Mahlamäki, E. K. 2004. Punasolujen muodostus ja tehtävät. Teoksessa Penttilä, I. (toim.) *Kliiniset Laboratoriotutkimukset*. Porvoo: WSOY, 263–268.

Ilanne-Parikka, P. 2003. Verensokerin omaseuranta. Teoksessa Ilanne-Parikka, P., Kangas, T., Kaprio, E. & Rönnemaa, T. *Diabetes*. 2. uudistettu painos. Hämeenlinna: Duodecim, 46–47.

Ilanne-Parikka, P. 2003. Sokerihemoglobiini. Teoksessa Ilanne-Parikka, P., Kangas, T., Kaprio, Eero, A. & Rönnemaa, T. Diabetes. 2. uudistettu painos. Hämeenlinna: Duodecim, 61–63.

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). 2002. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA_{1c} in Human Blood. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 40 (1), 78–89.

John, W. 2003. Haemoglobin A_{1c}: Analysis and Standardisation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 41 (9), 1199–1212.

Kansanterveyslaitos. Diabetes. Päivitetty 28.1.2005. Saatavilla www-muodossa:

[URL:http://www.ktl.fi/portal/suomi/osiot/tietoa_terveydesta/ravitsemus/ravitsemus_ja_terveys/diabetes/](http://www.ktl.fi/portal/suomi/osiot/tietoa_terveydesta/ravitsemus/ravitsemus_ja_terveys/diabetes/). Luettu 8.2.2006.

Kilpatric, E. 2000. Glykated haemoglobin in the year 2000. *Journal of Clinical Pathology* 53, 335–339.

Koskinen, L. 1997. GHb1Ac-määritystentaso ja spesifisyysongelmat. *Moodi* 1, 81–82.

Lahousen, T., Roller, R., Lipp, R. & Schnedl, W. 2002. Silent haemoglobin variants and determination of HbA_{1c} with the HPLC Bio-Rad Variant II. *Journal of Clinical Pathology* 55, 699–703.

Lehtinen, M. 2000. Talassemiat ja hemoglobiнопатiat. Teoksessa Ruutu, T., Rajamäki, A. & Krusius, T. (toim.) Veritaudit. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy, 161–180.

Makita, Z. Saatavilla www-muodossa:

[URL:http://www.ageclinic.com/about/about_agemore.html](http://www.ageclinic.com/about/about_agemore.html). Luettu 17.5.2006.

Miller, J.C. & Miller, J.N. 2000. *Statistics for Analytical Chemistry*. Dorchester: Pearson Education Limited, 20–33 & 111–130.

Penttilä, I. & Tiikkanen, U. 2004. Glykoituneen hemoglobiinin määritykset ja niiden laatu sekä analyysien tulevaisuuden näkymät Suomessa. *Kliinlab* 5, 99–102.

Sacks, D. 2003. Hemoglobin Variants and Hemoglobin A_{1c} Analysis: Problem Solved? *Clinical Chemistry* 49 (8), 1245–1247.

Sacks, D., Burns, D., Goldstein, D., Maclaren, N., McDonald, J. & Parrott, M. 2002. Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis in the Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry* 48 (3), 426–472.

Saraheimo, M. & Kangas, T. 2003. Mitä diabetes on? Teoksessa Ilanne-Parikka, P., Kangas, T., Kaprio, E. & Rönnemaa, T. *Diabetes*. 2–3. uudistettu painos. Hämeenlinna: Duodecim, 8 – 9.

Saraheimo, M. & Kangas, T. 2003. Diabetes lisääntyy. Teoksessa Ilanne-Parikka, P., Kangas, T., Kaprio, E. & Rönnemaa, T. *Diabetes*, 2.-3. painos. Duodecim. Hämeenlinna, 8 –12.

Schnedl, W., Liebming, A., Roller, R., Lipp, R. & Krejs, G. 2001. Hemoglobin variants and determination of glycosylated hemoglobin. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 17, 94–98.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. 1993. The effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine* 329 (14), 977–986.

Yhtyneet laboratoriot käsikirja. 2006–2007. Saatavilla www-muodossa:

URL:<http://www.yhtyneetlaboratoriot.fi/kasikirja/tutkimukset.asp?id=10159&char=h>.

Luettu 20.1.2006.

LIITTEET

LIITE 1. Analysaattoreiden välisen vertailun tulokset taulukoissa 1,2 ja 3 (3 sivua)

LIITE 2. Variant II –analysoittorin kromatogrammi, ei hemoglobiinivarianttia

LIITE 3. Variant II –analysoittorin kromatogrammi, hemoglobiinivariantti

LIITE 4. D-10 –analysoittorin kromatogrammi, hemoglobiinivariantti

LIITE 5. D-10 –analysoittorin kromatogrammi, hemoglobiinivariantti, joka ei näy tulosteessa

LIITE 1. (1/3)

TAULUKKO 6. Variant II, D10 (lyhyt ohjelma) ja D10 (pitkä ohjelma).

Analysaattoreiden välinen vertailu eritasoisilla näytteillä.

		Variant II	D10 lyhyt	D10 pitkä
1		10,3	10,3	10,4
2		9,0	8,7	8,7
3		6,7	6,5	6,6
4		9,7	9,3	9,3
5		7,2	6,9	7,2
6		5,8	5,7	5,7
7		5,9	5,7	5,8
8		5,2	5,1	5,1
9		7,3	7,0	7,3
10		5,3	5,0	5,2
11		7,0	6,7	7,0
12		6,0	5,8	5,8
13		6,7	6,6	6,6
14		5,2	5,1	5,2
15		7,7	7,6	7,7
16		7,8	7,5	7,5
17		8,3	8,1	8,1
18		14,3	13,9	14,1
19		5,7	5,4	5,5
20		6,2	5,9	6,1

LIITE 1 (2/3)

TAULUKKO 7. Variant II ja D10 (lyhyt ohjelma).

Analysaattoreiden välinen vertailu eritasoisilla näytteillä

		Variant II (%)	D10 (%)
1		8,3	8,2
2		5,6	5,5
3		10,3	10,3
4		9,0	8,7
5		6,7	6,5
6		9,7	9,3
7		7,2	6,9
8		10,5	10,2
9		3,9	3,6
10		11,7	11,8
11		5,8	5,7
12		5,9	5,7
13		5,2	5,1
14		7,3	7,0
15		5,3	5,0
16		7,0	6,7
17		6,0	5,8
18		6,7	6,6
19		5,2	5,1
20		7,7	7,6
21		7,8	7,5
22		8,3	8,1
23		14,3	13,9
24		5,7	5,4
25		6,2	5,9
26		6,5	6,2
27		8,7	8,3
28		5,8	5,6
29		6,6	6,5
30		5,8	5,6

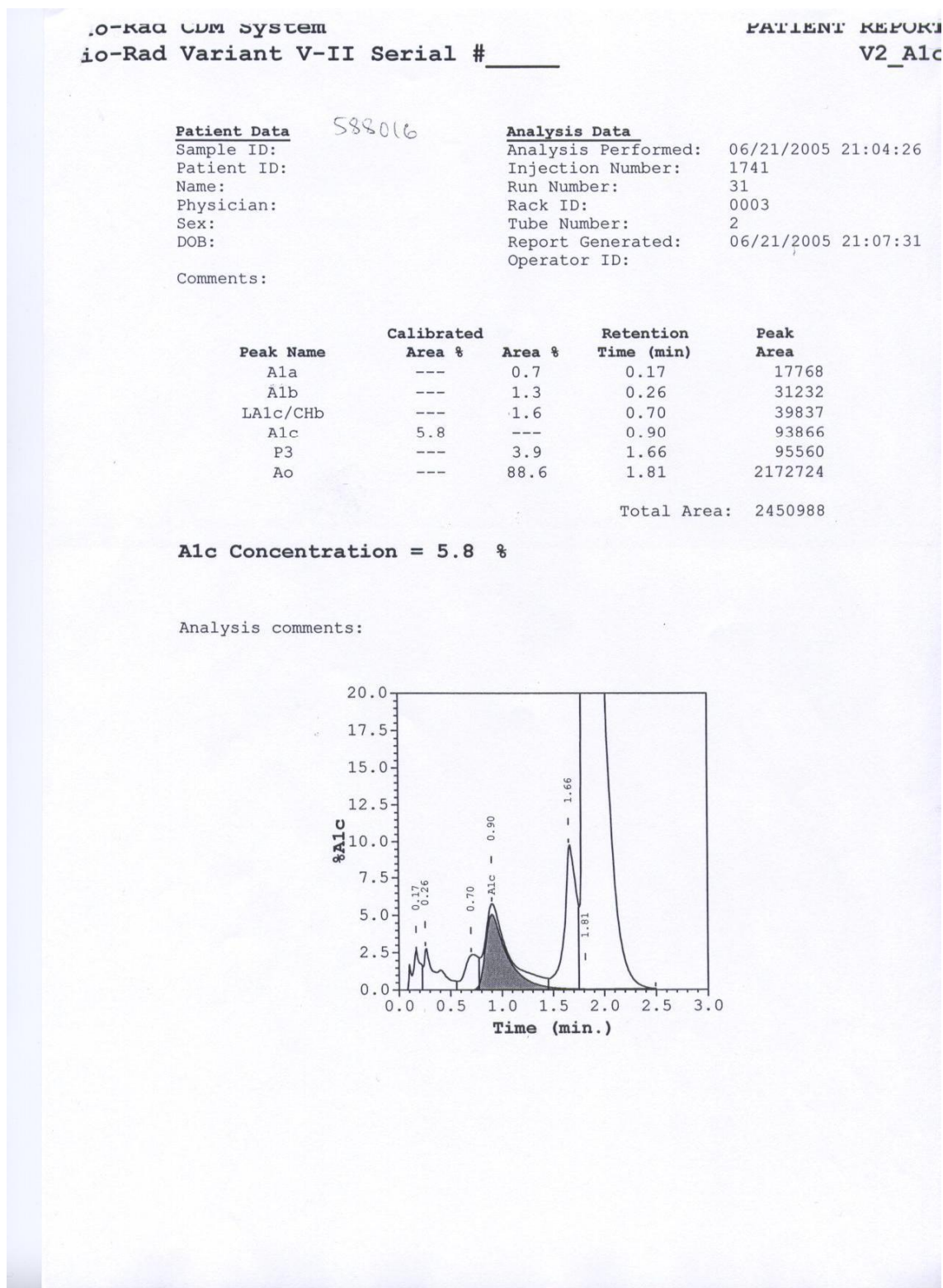
LIITE 1 (3/3)

TAULUKKO 8. Variantti näytteiden vertailu kolmella eri analysaattorilla (2 eri menetelmää). Mukana on myös tavallisia näytteitä, joilla kontrolloitu laitteiden välistä tasoa

		DCA	Variant II	D10 pitkä ajo
1		7,6	4,9	5,6
2		5,2	3,4	3,8
3		10,6	6,5	7,2
4		8,0	8,2	8,1
5		4,1	3,5	3,1
6		4,7	3,3	3,0
7		6,0	4,1	4,2
8		6,8	6,3	6,5

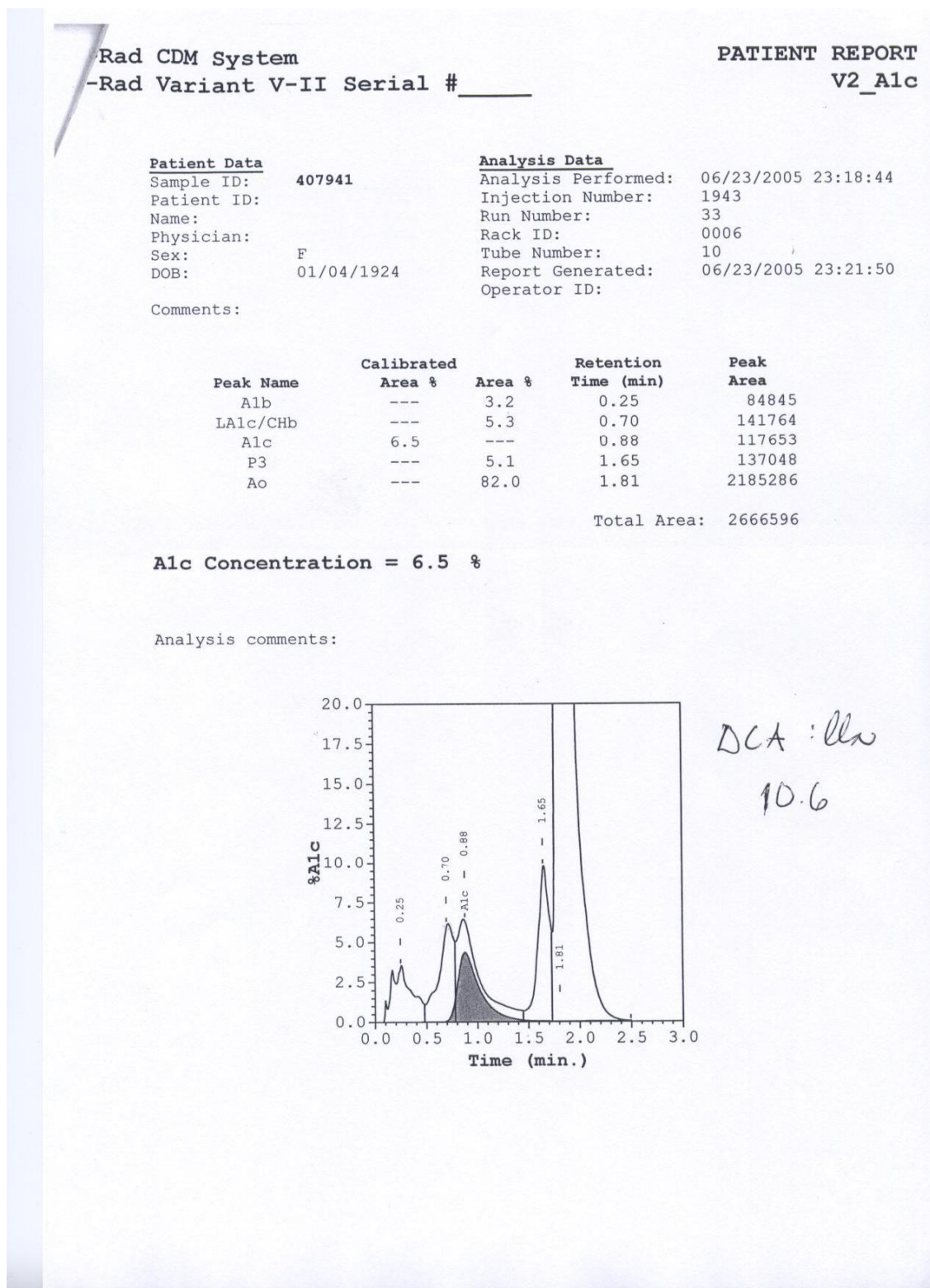
LIITE 2.

Näytteessä ei ole hemoglobiinivarianttia (Variant II)



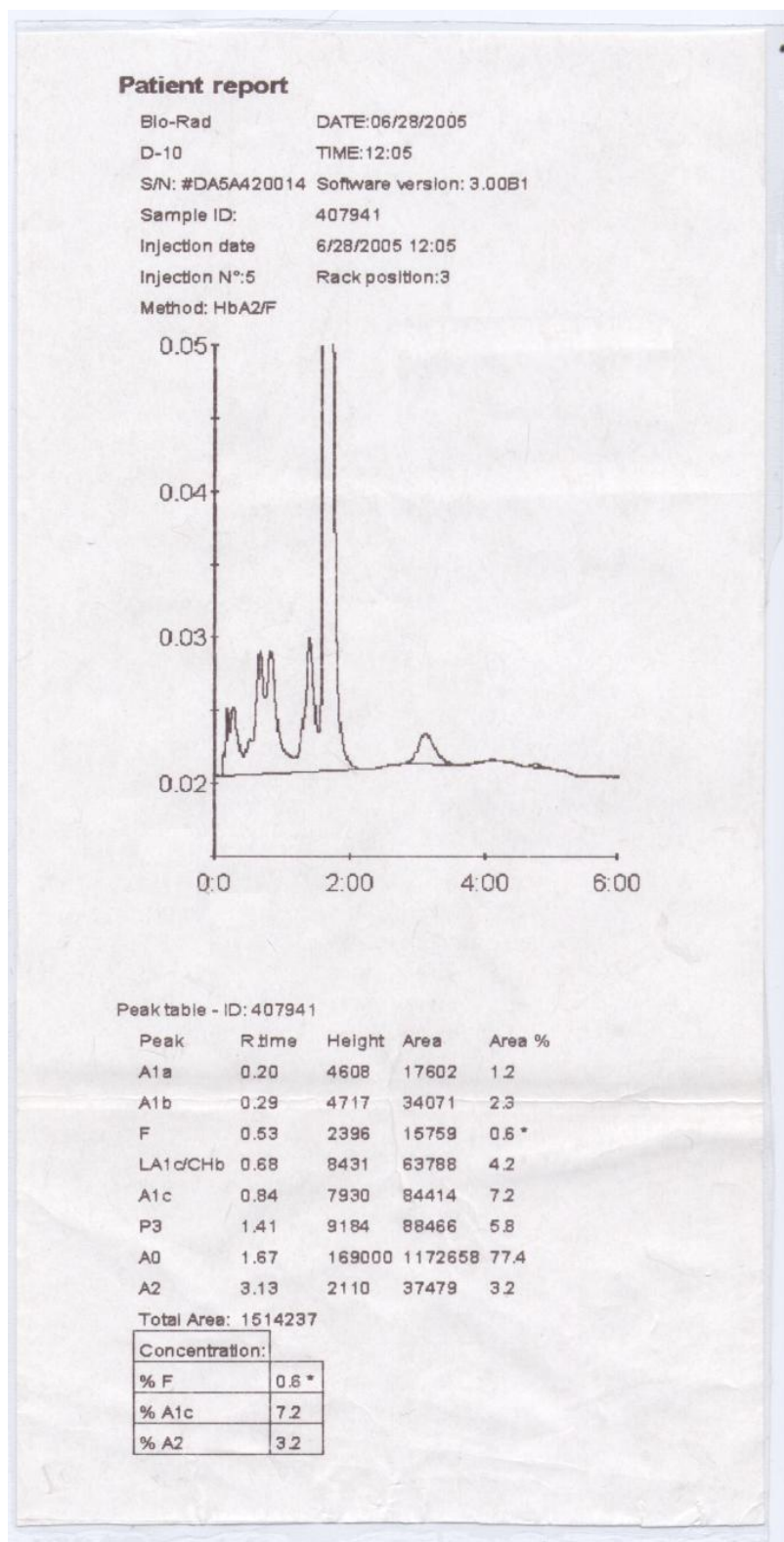
LIITE 3.

Näytteessä on hemoglobiinivariantti (Variant II)



LIITE 4.

Näytteessä on hemoglobiinivariantti (D-10)



LIITE 5.

Näytteessä on hemoglobiinivariantti, joka ei kuitenkaan näy kromatogrammissa (D-10)

