

Fallstricke bei der Bestimmung von HbA_{1c}

Katharina Timper^a, Andreas Holbro^b, Ralf Beyrau^c, Fabian Meienberg^a

^a Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolism, University Hospital, Basel

^b Department of Hematology, University Hospital, Basel

^c Department of Laboratory Medicine, University Hospital, Basel

Fallbeschreibung

Eine 62-jährige, aus Thailand stammende Patientin stellte sich zur Verlaufskontrolle bei chronischen lumbalen Schmerzen auf unserer Medizinischen Poliklinik vor. Beiläufig berichtete sie über vermehrtes Durstgefühl, Polyurie und Visusminderung. Vorbestehend waren eine Adipositas Grad I (BMI 30,4 kg/m²), eine arterielle Hypertonie, eine Dyslipidämie sowie eine leichtgradige, chronische Anämie bekannt. Die Medikation bestand aus Acetylsalicylsäure 100 mg/Tag, Metoprolol 50 mg/Tag, Enalapril/Hydrochlorothiazid 20/12,5 mg/Tag und Bezafibrat 400 mg/Tag. Die Familienanamnese war positiv für Diabetes mellitus Typ 2 und arterielle Hypertonie bei beiden Elternteilen sowie für zerebrovaskulären Insult bei Mutter und Bruder. In der klinischen Untersuchung zeigten sich keine Auffälligkeiten.

Dem klinischen Verdacht entsprechend konnte, durch Messung der Plasma-Glukose (18,4 mmol/l, am Folgetag 21,1 mmol/l), ein Diabetes mellitus diagnostiziert werden. Das HbA_{1c} lag unerwarteterweise bei lediglich 5,2%; der Wert wurde durch eine erneute Bestimmung am Folgetag bestätigt, wobei beide Messungen mittels Ionenaustausch-Chromatographie an einem HPLC-System (ion-exchange high-performance liquid chromatography) durchgeführt wurden. Schliesslich wurde das HbA_{1c} mit einem Immunoassay nochmals bestimmt – der mit dieser Methode gemessene Wert betrug 10,9%. Das Blutbild zeigte als einzige Auffälligkeit eine leichtgradige normoregeneratorische, hypochrome, mikrozytäre Anämie: Hämoglobin 114 g/l (Norm: 120–140 g/l), MCV 63 fl (79–95 fl), MCH 21 pg (27–33,2 pg), Retikulozyten 182 × 10⁹/l (Norm: 40–140 × 10⁹/l). Das Ferritin betrug 461 ng/ml (10–200 ng/ml) bei normalem CRP. Eine Hämoglobin-Analyse mittels HPLC zeigte ein mit einer homozygoten Hämoglobin-E-Variante vereinbares Bild. Eine daraufhin veranlasste molekulargenetische Untersuchung bestätigte das homozytote Vorliegen von HbE.

Diskussion

Die Neudiagnose eines «Diabetes mellitus» stützte sich bisher ausschliesslich auf die Messung einer erhöhten Plasma-Glukose. Dementsprechend konnte auch im vorliegenden Fall die Diagnose zweifelsfrei gestellt werden. In den letzten Monaten haben mehrere internationale Diabetes-Fachgesellschaften neu das HbA_{1c} als zusätzliches, äquivalentes Diagnosekriterium eingeführt;

dabei gilt ein HbA_{1c} ≥6,5% als diagnostisch für einen Diabetes mellitus. Die Bestimmung von HbA_{1c} wird seit Jahrzehnten zur Verlaufskontrolle bei bekanntem Diabetes mellitus eingesetzt. Sie bietet im Vergleich zur Messung der Plasma-Glukose einige entscheidende Vorteile: geringere intraindividuelle Variabilität, höhere präanalytische Stabilität, Unabhängigkeit von Tageszeit, Mahlzeiteinnahme, akutem Stress oder Entzündung und somit bessere Abbildung der chronischen Hyperglykämie.

Wie der vorliegende Fall illustriert, kann die Bestimmung von HbA_{1c} unter bestimmten Umständen aber irreführend sein.

Was genau ist HbA_{1c}? Hämoglobin-Moleküle setzen sich aus vier Globinketten zusammen, 2 α- und 2 Nicht-α-Ketten. Den grössten Anteil (95–98%) bildet beim gesunden Erwachsenen das Hämoglobin A (HbA), das aus je 2 α- und 2 β-Ketten besteht. Einen deutlich geringeren Anteil bilden Hämoglobin A₂ (2 α- und 2 δ-Ketten, 2–3%) und Hämoglobin F (2 α- und 2 γ-Ketten, <1%). Die verschiedenen Hämoglobin-Anteile lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Grösse und Ladung mittels Elektrophorese oder HPLC in einzelne Fraktionen auftrennen.

Weitere Fraktionen entstehen dadurch, dass ein Teil des Hämoglobins in den Erythrozyten posttranslational glykiert wird (s. unten), wodurch sich die Ladungseigenschaft der Moleküle verändert. Die Gesamtheit dieser Glykierungsprodukte wird als HbA₁ bezeichnet, das sich wiederum aus verschiedenen Untereinheiten wie HbA_{1a}, HbA_{1b} und der grössten Fraktion, dem HbA_{1c}, zusammensetzt. Unter Glykierung versteht man in diesem Zusammenhang die irreversible, nicht-enzymatische Bindung von Glukose an das Hämoglobin-Molekül, genauer gesagt an die β-Kette von Hämoglobin A. Hierbei entsteht zunächst eine instabile, reversible Form, das labile HbA_{1c}. In einem zweiten, deutlich langsameren Schritt entsteht die stabile Form des HbA_{1c} (stabiles HbA_{1c}). Da Erythrozyten für Glukose frei permeabel sind, ist das Ausmass der Glykierung direkt von der Glukose-Konzentration im Plasma abhängig. Entsprechend der Überlebenszeit der Erythrozyten reflektiert das HbA_{1c} den durchschnittlichen Plasma-Glukose-Spiegel der vorhergehenden 2–3 Monate, wobei die letzten Wochen vor der Messung den Wert am stärksten beeinflussen.

Zur Messung von HbA_{1c} existieren unterschiedliche Methoden. Gängige Verfahren sind die Ionenaustausch-Chromatographie am HPLC-System, die Boronataffinitäts-Chromatographie und die Bestimmung mittels Immunoassay. Das HbA_{1c} wird dabei je nach Methode

Die Autoren haben keine finanzielle Unterstützung und keine anderen Interessenskonflikte im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

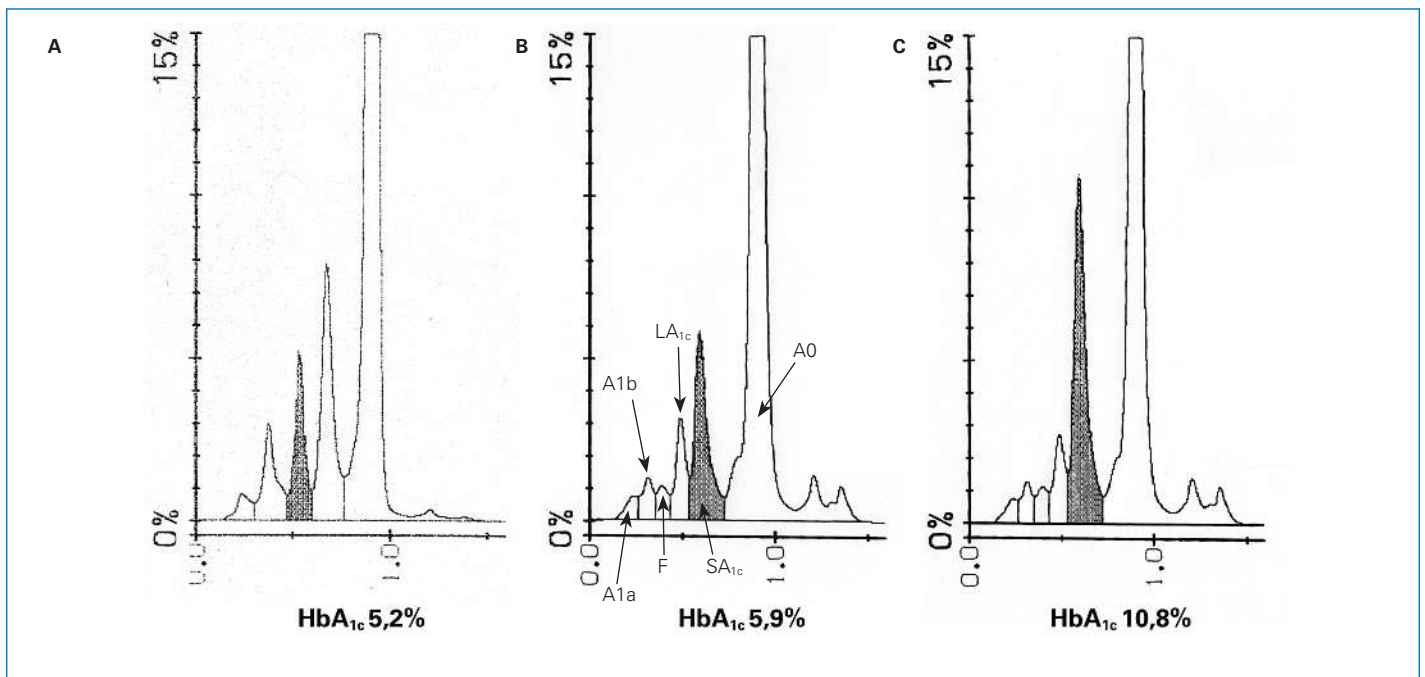


Abbildung 1

HbA_{1c}-Fallstricke. HPLC-Chromatogramme der HbA_{1c}-Messung.

A HbE-homozygote Indexpatientin.

B Diabetiker mit guter Blutzuckereinstellung.

C Diabetiker mit unbefriedigender Blutzuckereinstellung.

A1a = HbA_{1a}; A1b = HbA_{1b}; F = HbF; LA_{1c} = labiles HbA_{1c}; SA_{1c} = stabiles HbA_{1c}; A0 = HbA₀.

als Anteil der HbA-Fraktion oder des gesamten Hämoglobins angegeben; klassischerweise in %, neuerdings auch in mmol/mol.

Chromatographie ist ein Verfahren, durch das Einzelbestandteile eines Stoffgemisches (z.B. nicht-glykierte [HbA] und glykierte [HbA₁] Hämoglobine im Blut) abhängig von Grösse, Ladungs- oder chemischer Eigenschaft aufgetrennt und anschliessend unabhängig voneinander quantifiziert werden können. Bei der *high-performance liquid chromatography (HPLC)* handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, mit Hilfe dessen ein Stoffgemisch in einzelne Komponenten, die dann separat herausgelöst werden können, aufgetrennt wird. Die einzelnen Teilchen wandern hierfür je nach Grösse mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten über eine sogenannte Trennsäule. Nach Durchwanderung der Säule treffen die Bestandteile schliesslich z.B. auf eine nachgeschaltete Lichtquelle. Je nach Substanz resultiert eine unterschiedliche Lichtabschwächung, was wiederum durch eine Photodiode detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt werden kann. Die zur Durchwanderung der Säule benötigte Zeitdauer sowie das Ausmass der Lichtabschwächung erlauben schliesslich, die einzelnen Bestandteile zu identifizieren und zu quantifizieren. Die *Ionenaustausch-Chromatographie* bei der HbA_{1c}-Messung ist ein Trennprinzip der HPLC-Methode und basiert auf der Grundlage, dass die Ladung des Hämoglobin-Moleküls durch die Glykierung verändert wird. Die glykierten werden von den nicht-glykierten Hämoglobinen aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladungseigenschaft getrennt und separat quantifiziert. Ein weiteres Prinzip stellt die *Boronaaffinitäts-Chro-*

matographie dar, bei welcher die glykierten von den nicht-glykierten Hämoglobinen nach ihren chemischen Eigenschaften getrennt und beide Fraktionen unabhängig voneinander quantifiziert werden.

Neben den chromatographischen Verfahren stellt der *Immunoassay* eine ebenfalls breit angewandte HbA_{1c}-Messmethode dar. Hierbei binden monoklonale Antikörper an die glykierte Position des Hämoglobin-Moleküls. In einem weiteren Schritt wird dann das Ausmass dieser Bindung quantifiziert.

Wie angedeutet, kann der HbA_{1c}-Wert durch verschiedene Störfaktoren beeinflusst werden. Dabei existieren Faktoren, die unabhängig von der verwendeten Messmethode die HbA_{1c}-Bestimmung stören (u.a. Präanalytik), und andere, die nur bei bestimmten Messmethoden eine Rolle spielen.

Unabhängig von der Detektionsmethode kann beispielsweise ein falsch tiefer HbA_{1c}-Wert bei sehr rasch aufgetretener Hyperglykämie vorliegen, da der HbA_{1c}-Anstieg zeitlich verzögert zum Blutzucker-Anstieg erfolgt. Andere, von der Messmethode unabhängige Störfaktoren basieren auf der Tatsache, dass die Bildung von HbA_{1c} nicht nur von der Konzentration der Plasma-Glukose, sondern auch vom Lebensalter der Erythrozyten abhängt. Ältere Erythrozyten enthalten, entsprechend ihrer längeren Exposition gegenüber Glukose, mehr HbA_{1c} als jüngere. Ist das Durchschnittsalter der Erythrozyten vermindert (bei vermehrtem Verbrauch oder bei gesteigerter Neubildung), resultiert in der Folge ein vermindertes HbA_{1c}. Entsprechende Beispiele sind eine akute Blutung, eine Hämolyse, Bluttransfusionen oder eine Behandlung mit Erythropoietin. Umge-

Tabelle 1. Häufige klinische Störgrößen, die zu einer Veränderung des HbA_{1c}-Wertes führen können.

Durchschnittsalter der Erythrozyten erhöht (↑)	Eisen-, Vitamin-B ₁₂ -Mangel
Hypertriglyzeridämie (↑)	
Hyperbilirubinämie (↑)	
Alkoholabusus (↑)	
Opiatabusus (↑)	
Hämoglobinopathien (↑/↓)	
Niereninsuffizienz/Urämie (↑/↓)	
Schwangerschaft (↑/↓)	
Hochdosierte Einnahme von Vitamin C und E (↑/↓)	
Durchschnittsalter der Erythrozyten vermindert (↓)	Akute Blutung, Hämolyse, Erythropoietin-Behandlung, Blutspende, Aderlässe
	Behandelter Eisen-, Vitamin-B ₁₂ -Mangel
Bluttransfusion (↓)	
Erythropathien (↓)	Zum Beispiel Sphärozytose

kehrt resultieren bei verlängertem Überleben der Erythrozyten erhöhte HbA_{1c}-Werte (z.B. bei Eisen- oder Vitamin-B₁₂-Mangel, siehe auch Tab. 1 [↩](#)).

Hämoglobin-Strukturvarianten stellen ein klassisches Beispiel für methodenabhängige Störfaktoren der HbA_{1c}-Bestimmung dar. Die weltweit bedeutendsten Hämoglobin-Strukturvarianten sind, nach abnehmender Häufigkeit geordnet: HbS (Sichelzellanomalie), HbE, HbC und HbD. All diese veränderten Hämoglobine zeichnen sich durch eine Punktmutation mit Substitution einer Aminosäure in der β-Kette aus, die Änderungen der Struktur und der Ladung des Hämoglobin-Moleküls zur Folge haben. Das Vorliegen der genannten Mutationen ist ethniespezifisch; HbE findet sich gehäuft in Südostasien, HbD in Westindien, HbS in Afrika, im Nahen Osten, im Mittelmeerraum und in Indien. Die Prävalenz liegt je nach Mutation und Population bei 2–95%.

Das klinische Spektrum der Hämoglobin-Strukturvarianten ist sehr breit und abhängig von der Art der Mutation, der Anzahl betroffener Allele (homozygot vs. heterozygot) und davon, ob gleichzeitig andere Hämoglobinopathien vorliegen. So können zahlreiche Mischkonstellationen auftreten, die das klinische Erscheinungsbild unterschiedlich prägen. Das Spektrum reicht von völliger Symptombfreiheit (HbE-Anomalie), einer latenten, chronischen Hämolyse (HbC-Anomalie) bis hin zu einem schweren Krankheitsbild wie bei der Sichelzellerkrankheit.

Die hier vorgestellte Patientin stammt aus Thailand und ist homozygote Trägerin einer HbE-Anomalie. Die Prävalenz hierfür liegt in gewissen Regionen von Thailand, Kambodscha und Laos um 30%. Die HbA_{1c}-Bestimmung, die einen falsch tiefen HbA_{1c}-Wert suggerierte, wurde mittels HPLC (G8, Firma Tosoh) durchgeführt. In der HPLC werden die verschiedenen Hämoglobine erfasst und quantifiziert. Das HbA_{1c} berechnet sich dann aus dem Anteil der HbA_{1c}-Fraktion am Gesamt-Hämoglobin. Eine homozygote HbE-Anomalie, wie in unserem Fallbeispiel, geht mit einem Fehlen der HbA-Fraktion und einer leichten Erhöhung der HbA₂ und HbF-Fraktion einher. In der HPLC wird aufgrund der

fehlenden HbA-Fraktion ein falscher Peak als HbA_{1c} erkannt (Abb. 1 [📷](#)) und das HbA_{1c}-Messergebnis somit unbrauchbar. Im Gegensatz zur HPLC ist die Bestimmung mittels Immunoassay bei der HbE-Anomalie nicht beeinträchtigt. Die Bindungsstelle des verwendeten Antikörpers liegt weit genug von der substituierten Aminosäure im Hämoglobinmolekül entfernt. Dementsprechend zeigte die HbA_{1c}-Messung, die in unserem Fallbeispiel mit einem Immunoassay (DCA 2000, Firma Siemens [Bayer]) durchgeführt wurde, einen plausiblen «HbA_{1c}»-Wert (obwohl die Patientin bei fehlendem HbA gar kein «echtes» HbA_{1c} bildet). Im Gegensatz zur HbE-Anomalie liegen die bei HbC und HbS vorhandenen Mutationen deutlich näher an der Antikörper-Bindungsstelle, so dass hier bei gewissen Immunoassays Interferenzen auftreten. In der Boronataffinitäts-Chromatographie sind bei Hämoglobin-Varianten grundsätzlich keine Interferenzen zu erwarten. Bei Hämoglobin-Strukturvarianten ist weiter zu beachten, dass diese mit einer chronischen Hämolyse, resultierend in einer verkürzten Erythrozyten-Überlebenszeit, einhergehen können. Dies sowie allfällig notwendige, regelmässige Transfusionen führen unabhängig von der Messmethode zu einem falsch tiefen «HbA_{1c}».

Neben den Hämoglobin-Strukturvarianten sind eine Reihe weiterer Störfaktoren beschrieben, die bei bestimmten Messmethoden den HbA_{1c}-Wert verfälschen können. Ein falsch hohes HbA_{1c} kann auftreten bei: Hypertriglyzeridämie, Hyperbilirubinämie, Urämie sowie bei Alkohol- und Opiatkonsum. Die Einnahme von hochdosiertem Vitamin E kann zu falsch tiefen HbA_{1c}-Werten führen; die Einnahme von Vitamin C sowohl zu falsch hohen als auch zu falsch tiefen Werten (Tab. 1). Das HbA_{1c} spiegelt die durchschnittliche Konzentration der Plasma-Glukose über die letzten 2–3 Monate wider. Es korreliert mit dem Auftreten von diabetischen Spät komplikationen und stellt seit Jahrzehnten die Standardmethode zur Beurteilung der längerfristigen Stoffwechselkontrolle bei Diabetikern dar. Die Einführung des HbA_{1c} als Diagnosekriterium bietet im klinischen Alltag entscheidende Vorteile. So wird beispielsweise

die Diabetes-Diagnostik deutlich vereinfacht, da die Blutentnahme nicht mehr im nüchternen Zustand erfolgen muss. Wie das vorliegende Fallbeispiel illustriert, muss man sich aber der Limitationen der HbA_{1c}-Bestimmung bewusst sein und allfällige Störfaktoren erkennen können. Bei suggestiven Symptomen für eine Hyperglykämie sollte darum nie darauf verzichtet werden, den Blutzucker direkt zu bestimmen. Bei asymptomatischen Patienten mit bekannten oder vermuteten Störfaktoren bezüglich der HbA_{1c}-Bestimmung sollten beim Diabetes-Screening HbA_{1c} und Plasma-Glukose gemeinsam bestimmt werden. Bei zweifelhaftem Ergebnis muss die Messung der Plasma-Glukose in nüchternem Zustand wiederholt werden. Da Hämoglobin-Strukturvarianten auch latent vorhanden sein können, empfehlen wir ein solches Vorgehen insbesondere auch bei Patienten, die klinische Hinweise auf eine Erkrankung mit veränderter Erythrozyten-Überlebenszeit oder die aufgrund ihrer Ethnie (s. oben) ein erhöhtes Risiko für Hämoglobinopathien aufweisen. Ein Blutbild

kann dabei oft auch hinweisend auf das Vorliegen einer Hämoglobinopathie sein.

Korrespondenz:

Dr. med. Katharina Timper
 Department of Endocrinology, Diabetology and Metabolism
 University Hospital Basel
 Petersgraben 4
 CH-4031 Basel
[timperk\[at\]juhbs.ch](mailto:timperk[at]juhbs.ch)

Empfohlene Literatur

- Stettler C, Mueller B, Diem P. Was Sie schon lange über das HbA_{1c} wissen wollten. Schweiz Med Wochenschr. 2000;130:993-1005.
- Bain BJ, Wild B, Stephens AD. Variant Haemoglobins: A Guide to Identification. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2010.
- Überblick über weltweites Vorkommen von Hämoglobin-Strukturvarianten: www.orpha.net
- Überblick über Methoden-abhängige Interferenzen mit verschiedenen Hämoglobin-Strukturvarianten: www.ngsp.org/interf.asp
- Überblick über die häufigsten Hämoglobin-Strukturvarianten: <http://globin.cse.psu.edu>