

**Evaluation von drei verschiedenen Messmethoden
zur HbA1c-Bestimmung bei Patienten
mit und ohne Niereninsuffizienz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Sonja Peter geb. Kirchner
aus Bergisch Gladbach
2015

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med B. Zur
2. Gutachter: Prof. Dr. med M. M. Nöthen

Tag der Mündlichen Prüfung: 21.07.2015

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med G. Hartmann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	6
1.1 Diabetes mellitus	6
1.2 Hämoglobin	7
1.3 HbA1c.....	9
1.3.1 Referenzverfahren zur Messung von HbA1c.....	10
1.3.2 Routineverfahren zur Messung von HbA1c	12
1.3.3 Störungen der HbA1c-Messung.....	14
1.3.4 Störungen der HbA1c-Messung bei Nierenerkrankungen	15
1.3.5 HbA1c als Biomarker	16
1.4 Nierenerkrankungen	18
1.4.1 Akutes Nierenversagen (ANV).....	18
1.4.2 Chronische Niereninsuffizienz (CNI).....	19
1.4.3 Nierenersatzbehandlung (Net).....	21
1.4.4 Nierentransplantation (Ntx).....	22
1.4.5 Labordiagnostik von Nierenerkrankungen	22
1.4.5.1 Kreatinin	22
1.4.5.2 Kreatinin-Clearance	23
1.4.5.3 Harnstoff und Blood Urea Nitrogen (BUN).....	24
1.4.5.4 Cystatin C	25
1.5 Sonstige relevante Laborwerte	25
1.5.1 Hämoglobinkonzentration	25
1.5.2 Blutglukose	26
1.6 HbA1c und Nierenerkrankungen.....	26
1.6.1 Interpretation des HbA1c bei Niereninsuffizienz	26
1.6.2 Carbamyliertes Hämoglobin bei Niereninsuffizienz.....	28
2. Fragestellung	30
3. Methoden.....	31
3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs	31
3.2 Blutentnahme und Probenaufbewahrung	31
3.3 Referenzwerte	33
3.4 HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Biorad, Variant II	33
3.5 Kapillarzonenelektrophorese, Sebia, Capillarys TM 2 Flex Piercing	36
3.6 TINIA (Turbidimetric Inhibition Immunoassay), Siemens, Dimension RXL Max.....	39
3.7 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	41
3.8 Statistische Methoden	42
3.8.1 Bland-Altman-Plot.....	42
3.8.2 Passing-Bablok-Regression	43
3.8.3 Boxplot.....	43
3.8.4 Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test.....	44
3.8.5 Spearmans-Rho.....	44
3.8.6 Chi-Quadrat-Test.....	45

4. Ergebnisse	46
4.1 Messungen des HbA1c am gesamten Patientenkollektiv	46
4.2 Vergleiche der drei Messmethoden im Kollektiv der nephrologischen Patienten und der Routinepatienten	49
4.3 Darstellung der HbA1c-Werte in ausgewählten Diagnosegruppen	61
4.3.1 Akutes Nierenversagen (ANV)	61
4.3.2 Chronische Niereninsuffizienz (CNI)	63
4.3.3 Nierenersatztherapie (Net)	65
4.3.4 Nierentransplantation (Ntx)	67
4.3.5 Hämoglobin	68
4.4 Zusammenhang zwischen Blood Urea Nitrogen-Konzentration und HbA1c bei Nierenkranken	68
4.5 Vergleichsanalyse der Proben mit unterschiedlichen Diagnosen nach Messmethode	71
5. Diskussion	73
5.1 Messung von HbA1c	73
5.2 Vergleich der drei Messmethoden am Routinekollektiv	75
5.3 Vergleich der drei Messmethoden am nephrologischen Kollektiv	76
5.4 Vergleich der drei Messmethoden bei akutem und chronischem Nierenversagen	77
5.5 Vergleich der drei Messmethoden bei Nierenersatztherapie und Nierentransplantation	78
5.6 Vergleich der drei Messmethoden im Hinblick auf den Hämoglobinwert	79
5.7 Vergleich der drei Messmethoden im Hinblick auf den Blood Urea Nitrogen (BUN)-Wert	79
5.8 Zusammenhang von Blood Urea Nitrogen (BUN) und carbamyliertem Hämoglobin	80
5.9 Capillarys™ 2 Flex Piercing	81
5.10 Variant II	81
5.11 Dimension RXL Max	82
5.12 Vergleich der drei Messmethoden im Hinblick auf HbA1c	82
6. Zusammenfassung	86
7. Literaturverzeichnis	88
8. Danksagung	105

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADA	American Diabetes Association
ANV	Akutes Nierenversagen
BUN	Blood Urea Nitrogen (Synonym: Harnstoff-N)
CE, CZE	Kapillarelektrophorese (Synonym: Kapillarzonenelektrophorese)
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease – Mineral and Bone Disorder
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESRD	End stage renal disease
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
JDS	Japanese Diabetes Society
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MS	Massenspektrometrie
Net	Nierenersatztherapie
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
NKF	National Kidney Foundation
NSAID	Nicht-steroidale Entzündungshemmer (Synonym: NSAR)
Ntx	Nierentransplantation
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
TINIA	Turbidimetrischer Hemmungs-Immunoassay
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
USRDS	United States Renal Data System

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Von Diabetes mellitus sind ca. 7 % der Weltbevölkerung betroffen. Hochrechnungen gehen davon aus, dass sich die Zahl der Betroffenen im Erwachsenenalter bis zum Jahr 2030 um 69 % in Entwicklungsländern und um 20 % in den Industrieländern erhöhen wird (Shaw et al., 2010). Die wirtschaftlichen und sozialen Konsequenzen, die durch die Folgeschäden dieser Erkrankung entstehen, sind nicht zu unterschätzen. Die direkten und indirekten Auswirkungen der Hyperglykämie auf das menschliche Gefäßsystem stellen die Hauptursache für die Morbidität und Mortalität bei Diabetes mellitus dar. Zu diesen Auswirkungen zählen makrovaskuläre Komplikationen wie koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Schlaganfall, aber auch mikrovaskuläre Komplikationen wie diabetische Nephropathie, Neuropathie und Retinopathie (Fowler, 2008).

Diabetes mellitus ist eine durch erhöhte Blutglukosewerte charakterisierte Stoffwechselerkrankung, wobei ein relativer oder absoluter Insulinmangel vorliegt. Beim Diabetes mellitus Typ 1 wird von der Bauchspeicheldrüse kein Insulin mehr produziert, sodass die Blutglukose nicht in die Zellen gelangen und als Energie genutzt werden kann (absoluter Insulinmangel). Beim Diabetes mellitus Typ 2 wird entweder nicht genügend Insulin von der Bauchspeicheldrüse hergestellt, oder der Körper kann das Insulin aufgrund einer Insulinresistenz nicht richtig nutzen (relativer Insulinmangel). Weitere Formen und Ursachen des Diabetes mellitus sind der MODY-Diabetes (genetische Defekte der Betazellfunktion), der Gestationsdiabetes, sowie genetische Defekte der Insulinwirkung, Endokrinopathien, Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Infektionen, immunologische Prozesse und Medikamente (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus, 1999).

Ziel einer Diabetes-Therapie ist es, einen konstanten, annähernd normalen Glukosespiegel im Blut herzustellen, um das Risiko langfristiger Gefäßschäden zu minimieren (Forsham, 1982; Hollander, 1984). Eine einzelne Nüchternglukosebestimmung spiegelt zwar den Zustand des Patienten während der vergangenen Stunden wider, erlaubt jedoch keine Aussage über den eigentlichen Status der Blutglukoseregulierung (Baynes et al., 1984; Nathan et al., 1984). Die Bestimmung von HbA1c in regelmäßigen

Abständen von zwei bis drei Monaten hingegen ist ein anerkannter Maßstab der Glykämiekontrolle bei der Versorgung und Behandlung von Diabetikern.

1.2 Hämoglobin

Hämoglobin ist ein eisenhaltiges Protein, welches sich in den Erythrozyten befindet, ein Drittel ihrer Masse ausmacht (circa 280.000 Millionen Moleküle pro Erythrozyt) und für die rote Farbe des Blutes verantwortlich ist. Es dient zum Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid und ist aus zwei mal zwei identischen Proteinketten aufgebaut, wobei jede eine Hämgruppe gebunden hat. Diese Hämgruppe ist ein Tetrapyrrolringssystem mit einem zentralen zweiwertigen Eisenatom. Die vier Ketten werden durch nichtkovalente Kräfte zusammengehalten (Perutz et al., 1960).

Die Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins weist einen sigmoidalen Verlauf auf. Im Bereich des in der Lunge herrschenden Sauerstoffpartialdrucks verläuft die Sättigungskurve flach, im Bereich des im Gewebe herrschenden Sauerstoffpartialdrucks hingegen steil. Der steile Verlauf im Mittelteil sorgt für Sauerstoffabgabe bei sinkendem venösem Sauerstoffpartialdruck, der flache Verlauf im Endteil verhindert einen stärkeren Abfall der Sauerstoffsättigung in Höhenlagen, bei Lungenfunktionsstörungen oder im Alter. Die Sauerstoffbindungskurve wird durch Temperaturanstieg, Sinken des pH-Wertes, Anstieg der 2,3-Bisphosphoglyceratkonzentration in den Erythrozyten und Anstieg der Kohlendioxidkonzentration nach rechts verschoben, das Hämoglobin gibt den Sauerstoff somit leichter ab. Verändern sich die Parameter in die andere Richtung, so wird die Sauerstoffbindungskurve nach links verschoben, die Sauerstoffabgabe ist dann erschwert. Ein Hämoglobinmolekül kann vier Sauerstoffmoleküle binden. Die Sauerstoffaffinität nimmt dabei entgegen der rein statistischen Erwartung mit steigender Beladung zu. Dieser Effekt wird als positive Kooperativität bezeichnet (Adair et al., 1925).

Hämoglobine des gesunden Erwachsenen lassen sich in verschiedene Fraktionen unterteilen, wobei Hämoglobin A (HbA) die Hauptfraktion darstellt. Außerdem kommen Hämoglobin A₂ (HbA₂), sowie die fetalen Hämoglobine vor. Während der Fetalzeit werden zunächst die embryonalen Hämoglobine Hb Gower-1, Hb Gower-2 und Hb Portland gebildet, die ab der 5. - 7. Gestationswoche von fetalem Hämoglobin (HbF) abgelöst werden. Im ersten Lebensjahr wird allmählich der Hämoglobinstatus des Erwachsenen erreicht. Bei Hämoglobinopathien wie Thalassämien (Synthesedefekt der

Ketten) oder Hämoglobinstrukturanomalien (abnorme Struktur der Ketten) ergibt sich eine andere Häufigkeitsverteilung; es gibt zudem zahlreiche Hämoglobinvarianten (Steinberg et al., 2001). Die prozentuale Häufigkeit der Erwachsenenhämoglobine zeigt, dass HbA den weitaus größten Anteil beim Gesunden ausmacht. HbA2 und HbF sind nur zu einem geringen Anteil vorhanden (Kleinhauer et al., 1996).

Tab. 1: Auswahl der häufigsten und bekanntesten Hämoglobintypen mit Kettenformel bei Kindern über 2 Jahren und Erwachsenen

Hämoglobintyp	Kettenformel	Kinder > 2 Jahre und Erwachsene
HbA	alpha 2, beta 2	97-98,5 %
- HbA0	alpha 2, beta 2 (unglykiert)	> 90 %
- HbA1	alpha 2, beta 2 (glykiert)	ca. 6 %, davon ca. 75 % HbA1c
HbA2	alpha 2, delta 2	1,5-3,2 %
HbF	alpha 2, gamma 2	0-0,5 %
Hb Gower 1	zeta 2, epsilon 2	Nein
Hb Gower 2	alpha 2, epsilon 2	Nein
Hb Portland	zeta 2, gamma 2	Nein
HbA1a1	Glykierung der beta-Kette mit Fruktose-1,6-diphosphat	
HbA1a2	Glykierung der beta-Kette mit Glukose-6-phosphat	
HbA1b	Glykierung mit nicht näher bezeichneter Hexose	
HbA1c	Glykierung mit Glukose am N-terminalen Valin der beta-Kette	
HbA2c	Glykierung mit Glukose am N-terminalen Valin der delta-Kette	

Elektrophoretisch und säulenchromatographisch lassen sich weitere Subfraktionen abtrennen. So konnte in Proben von Diabetikern mit schlecht eingestelltem Blutzucker mittels Elektrophorese und Ionenaustauschchromatographie eine Subfraktion nachgewiesen werden, die daraufhin identifiziert und als HbA1c bezeichnet wurde (Allen et al., 1958; Huisman und Dozy, 1962; Rahbar, 1968). Der positive Zusammenhang zwischen der mittleren Blutglukosekonzentration und dem HbA1c-Wert wurde entdeckt (Rahbar et al., 1969; Trivelli et al., 1971) und zur Überwachung des Diabetes mellitus in die klinische Praxis eingeführt (Jovanovic und Peterson, 1981; Goldstein et al., 1986).

Während die Messung der Blutglukosekonzentration die aktuelle Einstellung des Kohlenhydratstoffwechsels eines Diabetikers erlaubt, lässt die Messung glykierter Proteine (Fructosamine) eine Beurteilung der mittleren Blutglukosekonzentration über

Tage bis Monate zu. Fructosamine entstehen durch Bindung von Glukose an Serumproteine, vor allem an Albumin, das eine Halbwertszeit von 19 Tagen hat. Fructosamine sind somit für die Beurteilung des Glukosestoffwechsels der letzten zwei bis drei Wochen geeignet (Winocour et al., 1989). Bei Diabetikern mit angeborenen Hämoglobinanomalien, sowie bei Patienten mit gesteigerter Hämolyse ist der HbA1c-Wert vermindert und damit schlecht verwertbar, sodass in diesen Fällen nur die Fructosaminbestimmung eingesetzt werden kann (Armbruster, 1987). Aufgrund der größeren Störanfälligkeit basierend auf physiologisch variierenden Albuminspiegeln (insbesondere durch Eiweißverlust) hat sich die generelle Fructosaminbestimmung nicht durchgesetzt. Etabliert hat sich hingegen die HbA1c-Bestimmung, die mit der mittleren Blutglukosekonzentration im Zeitraum von sechs bis acht Wochen positiv korreliert (Koenig et al., 1976; Gabbay et al., 1977). Zur Stoffwechselkontrolle bei Diabetikern stellt die Bestimmung dieses Glykoproteins heute den Goldstandard dar (American Diabetes Association, 1994).

Mit den in den 1990er Jahren veröffentlichten Studien DCCT (Diabetes Control and Compliance Trial) und UKPDS (UK Prospective Diabetes Study) konnte gezeigt werden, dass eine verbesserte Diabeteseinstellung, überprüft durch HbA1c-Monitoring, die Rate an diabetischen Komplikationen senkt (The Diabetes Control and Complications Trial, 1993; UK Prospective Diabetes Study Group, 1998). Zur Diabetesdiagnostik wird die Messung des HbA1c ebenfalls, neben Glukosemessung und oralem Glukosetoleranztest (OGTT), empfohlen (American Diabetes Association, 2010; World Health Organisation, 2011).

1.3 HbA1c

Die chromatographische Heterogenität der Hämoglobine ist einerseits durch Polymorphismen der nicht-alpha-Ketten bedingt, so kommen neben HbA auch HbA2 und HbF vor; andererseits können posttranslationale Modifikationen wie die Glykierung mit Hexosephosphaten zu einer Veränderung des Moleküls führen. Glykiertes Hämoglobin A wird als HbA1, unglykiertes Hämoglobin A hingegen als HbA0 bezeichnet. HbA1c ist strukturell fast identisch mit Hämoglobin A, allerdings findet sich eine Glykierung mit D-Glukose am N-terminalen Valin der beta-Kette (Bookchin und Gallop, 1968; Bunn et al., 1976; Holmquist und Schroeder, 1966). Die Glykierung verläuft, im Gegensatz zur

Glykosylierung, nicht-enzymatisch, ist irreversibel und konzentrationsabhängig (Reinauer, 1993).

Die durchschnittliche Höhe des Blutzuckerspiegels legt das Ausmaß fest, in welchem langlebige Proteine wie Hämoglobin Glukose anlagern. Dieser Vorgang der Glykierung läuft in zwei Schritten ab. Zunächst kommt es zur Bildung der Aldiminform (Schiff'sche Base), indem die freie Aldehydgruppe der Glukose mit den primären Aldehydgruppen der Proteine reagiert. Dieser erste Schritt dauert einige Stunden und ist reversibel, weshalb kurzfristige Hyperglykämien einen geringen Einfluss auf das Ausmaß der Glykierung haben. Anschließend folgt ein langsamerer Prozess, der Tage dauert und zur irreversiblen Bildung der Ketoaminform führt. Dabei läuft eine intramolekulare Umlagerungsreaktion ab, die als Amadori-Umlagerung bezeichnet wird (Higgins und Bunn, 1981). Das glykierte Hämoglobin wird erst nach Untergang des Erythrozyten eliminiert. Im Normalfall liegt die Erythrozytenlebenszeit bei 100 bis 120 Tagen (Landaw, 1995), daraus ergibt sich für das Monitoring des Blutzuckerspiegels ein Zeitraum von sechs bis acht Wochen. Der durchschnittliche Blutzucker in dieser Zeitspanne lässt sich durch folgende Formel abschätzen: Mittlere Plasmaglukose (mg/dl) = $35,6 \times \text{HbA1c} - 77,3$ ($r = 0,82$) (Rohlfing et al., 2002).

Die Glykierung führt zu keinen klinisch signifikanten Funktionsstörungen des Hämoglobins. Bei einem gesunden Menschen liegen etwa vier bis sechs Prozent des Hämoglobins in Form von HbA1c vor, während bei einem Diabetiker dieser Wert um das zwei- bis dreifache höher sein kann. Eine Veränderung des HbA1c-Wertes um ein Prozent ergibt sich dabei durch eine Änderung des durchschnittlichen Blutzuckerspiegels um 30 mg/dl, eine lineare Korrelation vorausgesetzt (Larsen et al., 1990).

1.3.1 Referenzverfahren zur Messung von HbA1c

Zur Analyse der Glykohämoglobine stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die Bestimmung des HbA1c unterliegt sowohl methodenabhängigen als auch methodenunabhängigen Fehlerquellen, die bei der Wertung der Befunde bekannt sein sollten. Um vergleichbare HbA1c-Ergebnisse zu erhalten, müssen die Routinemethoden anhand eines Referenzmesssystems einheitlich zertifiziert und standardisiert werden. Nationale Standardisierungsprogramme wie NGSP (National Glycohaemoglobin Standardisation Program) in den USA, JDS in Japan und Mono S in Schweden basieren auf einer

Referenzmethode des DCCT (Diabetes Control and Complications Trial). Diese Methode bedient sich der Ionenaustauschchromatographie (HPLC, Bio-Rex 70) (The Diabetes Control and Complications Trial, 1993).

Die IFCC (International Federation for Clinical Chemistry) empfiehlt ein internationales Referenzsystem für die Bestimmung von HbA1c. Dieser Prozess beinhaltet die Isolierung und Hämolyse der Erythrozyten. Ein Hexapeptid (Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu), das aus den ersten sechs N-terminalen Aminosäuren der beta-Kette besteht, wird enzymatisch vom Hämoglobinmolekül abgespalten. Dieses Hexapeptid ist am N-terminalen Valin glykiert bzw. nicht glykiert und wird mittels HPLC-ESI/MS (Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie) oder HPLC-CE (Kapillarelektrophorese) quantifiziert. Dabei wird neben HbA1c auch HbA2c erfasst, dennoch ist diese Methode deutlich spezifischer als andere Verfahren, da die HbA2c-Werte bei Diabetikern gut mit den HbA1c-Werten korrelieren und die HbA2c-Fraktion sehr klein ist (Tegos und Beutler, 1980). Aus dieser hohen Spezifität ergibt sich gegenüber den anderen verwendeten Methoden ein niedrigerer Referenzbereich (Kobold et al., 1997; Jeppson et al., 2002).

Die von der IFCC etablierte HbA1c-Arbeitsgruppe stellte auch primäres Referenzmaterial von HbA1c und HbA0 her, um sekundäres Referenzmaterial kalibrieren zu können. An diesen Materialien standardisieren die Hersteller entsprechend geeichte Kalibratoren, somit sind alle Methoden auf die Referenzmethode rückführbar (Mosca et al., 2007).

Im Gegensatz zum NGSP-Standard, der ein Konsensusstandard ohne Bezug zur Richtigkeit und Rückverfolgbarkeit auf einen internationalen Standard höherer Zuverlässigkeit war, ist der IFCC-Standard ein rückverfolgbares und genaueres Referenzmessverfahren. Die IFCC-Referenzmethode zur Bestimmung von HbA1c im Blut erlaubt somit die internationale Vergleichbarkeit auf höchster Ebene der Richtigkeit. Da sich Ärzte und Patienten über Jahre an den standardisierten Einheiten und der Wertelage nach NGSP orientiert haben, werden die HbA1c-Werte sowohl nach IFCC in der neuen SI-Einheit (mmol/mol) als auch in der alten Prozepteinheit angegeben (Nordin und Dybkaer, 2007; Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement, 2007; Danne et al., 2009). Die Erniedrigung des Referenzbereiches der HbA1c Prozentwerte könnte sonst zu einer schlechteren Stoffwechselkontrolle bei Diabetikern führen (Hanas, 2002).

Die Korrelation zwischen dem IFCC Messverfahren und dem alten NGSP Referenzverfahren ist sehr gut, lediglich die absoluten Zahlen unterscheiden sich. Die IFCC Werte sind dabei über den gesamten Wertebereich 1,5 bis 2 % niedriger als die NGSP Werte. Zur Umrechnung kann die offizielle Umrechnungsformel $NGSP = 0,9148 * IFCC + 2,152$ oder $IFCC = 1,093 * NGSP - 2,350$ verwendet werden (Hoelzel et al., 2004).

1.3.2 Routineverfahren zur Messung von HbA1c

Als Routineverfahren zur Analyse der Glykohämoglobine sind Ionenaustauschchromatographie, Elektrophorese, Affinitätschromatographie, Immunoassay und die enzymatische Bestimmung geeignet. Der Referenzbereich ist vom jeweiligen Messverfahren und von den verwendeten Reagenzien abhängig. Als Untersuchungsmaterial kommen EDTA-Blut, Heparin-Blut und Kapillarblut in Frage.

Die Kationenaustauschchromatographie ist als manuell betriebene Mini-, Mikro- oder Makrosäulenmethode, sowie als teil- oder vollautomatisierte Methode (HPLC/FPLC) etabliert. Grundlage ist die Veränderung der Ladung des Hämoglobin-Moleküls durch N-terminale Modifikation mit Glukose. Dieses Hämoglobin bindet schlechter an negativ geladenes Harz als HbA0. Da labile Zwischenprodukte (labiles HbA1c, Prä-HbA1c) in der Chromatographie mitgemessen wurden (Svendsen et al., 1979), wird durch Dialyse der Hämolysate (Widness et al., 1980), durch Inkubation der Erythrozyten mit Kochsalzlösung (Goldstein et al., 1980) und durch Borat und Semicarbazid labiles HbA1c entfernt (Reinauer und Niederau, 1984). Die Ionenaustauschchromatographie ist empfindlich gegen pH- und Temperaturverschiebungen, außerdem können Hämoglobinvarianten, erhöhtes fetales Hämoglobin (HbF) und erhöhte Triglyzerid- und Bilirubinwerte zu Fehlbeurteilungen führen. Eine separate Identifizierung von Hämoglobinvarianten und HbF ist mittels HPLC jedoch möglich.

Die Elektrophorese ist aufgrund der veränderten Ladung des Hämoglobinmoleküls und der Veränderung des isoelektrischen Punktes auf einem Agarosegel oder in der isoelektrischen Fokussierung auf einem Gel mit pH-Gradienten von 5,0 bis 6,5 möglich. Letztere ermöglicht eine gute Auftrennung in die Subfraktionen. Die Elektrophorese wird wie die Ionenaustauschchromatographie durch Hämoglobinvarianten und erhöhtes HbF beeinflusst (Weykamp et al., 1993).

Die Affinitätschromatographie basiert auf Boronatgruppen, die unter alkalischen Bedingungen mit der cis-Diolstruktur, die in glykierten Proteinen vorliegt, Komplexe ausbilden. Glykohämoglobine binden an die Affinitätssäulen, in denen m-Aminophenylborsäure kovalent an Agarose gebunden ist, während unglykierte Hämoglobine nach Durchlaufen der Säule quantifiziert werden können. Durch eine Polyhydroxyverbindung wie Sorbitol wird das Glykohämoglobin von der Borsäure verdrängt. Die Boronataffinitätschromatographie ermöglicht die Messung des gesamten Glykohämoglobins; eine Errechnung eines standardisierten HbA1c-Äquivalentes mittels eines empirisch ermittelten Algorithmus ist üblich (Wilson et al., 1993).

Immunoassays nutzen Antisera und monoklonale Antikörper. Die letzten Aminosäuren des glykierten N-terminalen Endes der beta-Kette des Hämoglobins stellen das Epitop dar. Neben auf Inhibition von Latex-Immunagglutination beruhenden Einzelprobenverfahren gibt es immunturbidimetrische Verfahren und ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). HbA2c und das seltenere HbS1c, welches bei Sichelzellerkrankungen vorkommt, werden bei dieser Methode mitgemessen. Andere modifizierte Hämoglobine und Hämoglobinvarianten beeinflussen die Messung in der Regel nicht.

Die enzymatische Bestimmungsmethode beruht auf einer proteolytischen Abspaltung eines Aminosäurerestes des N-terminalen Endes der beta-Kette des Hämoglobins. Anschließend wird dieser glykierte Rest durch eine Fructosyl-aminosäuren-oxidase (FAOD) oxidiert und es entsteht Wasserstoffperoxid, welches kalorimetrisch in einer Peroxidase-vermittelten Reaktion gemessen wird (Sakurabayashi et al., 2003).

Die verschiedenen Methoden der HbA1c-Bestimmung haben jeweils Vor- und Nachteile. Bei Vorliegen von carbamylisiertem Hämoglobin gilt der Immunoassay der Ionenaustauschchromatographie (HPLC) gegenüber als exakter, da die HbA1c-Fraktion spezifisch erfasst wird (Hansen et al., 1997; Chevenne et al., 1998). Die Ionenaustauschchromatographie (HPLC) gilt dagegen als Goldstandard zur Analyse von Varianten-Hämoglobinen (Schnedl et al., 1997). Die Ionenaustauschchromatographie kann allerdings durch vielfältige Faktoren gestört werden. Dabei spielen Varianten-Hämoglobine und modifizierte Hämoglobine wie carbamylisiertes Hämoglobin die größte Rolle (Weycamp et al., 1993a; Weycamp et al., 1993b). Die Boronataffinitätschromatographie erlaubt die spezifische Messung des gesamten glykierten Hämoglobins.

globins; Varianten-Hämoglobine und labile Aldiminformen interferieren nicht mit der HbA1c-Messung.

1.3.3 Störungen der HbA1c-Messung

Die beschriebenen Routinemessmethoden können durch vielfältige Einflussfaktoren verfälscht werden. Das jeweilige Ausmaß der Störung ist abhängig von der verwendeten Methode zur Messung von HbA1c. Unabhängig vom verwendeten Assay wird die Bestimmung durch akuten Blutverlust, Transfusionen, Anämien und verkürzte Erythrozytenlebensdauer gestört. Eine Abhängigkeit von Alter und Geschlecht wird kontrovers diskutiert (Carrera et al., 1998). Außerdem muss die biologische Variabilität von 1,7 % (intraindividuell) bzw. 4 % (interindividuell) berücksichtigt werden (Rohlfing et al., 2002).

Hämoglobinopathien können zu einer zu hohen oder zu niedrigen Bestimmung des HbA1c führen (Bry et al., 2001). Gehen diese Erkrankungen mit einer gestörten Hämatopoese oder Hämolysen einher, so ist die Befundung methodenunabhängig beeinträchtigt (Martina et al., 1993). Chromatographische, elektrophoretische und immunologische Methoden können im Gegensatz zur Affinitätschromatographie durch abnorme Hämoglobine beeinflusst werden (Weycamp et al., 1993).

Fetales Hämoglobin kann ebenfalls zu Fehlbeurteilungen führen, da es bei einigen Routinemethoden mitgemessen wird. Es kann genetisch bedingt persistieren, bei Thalassämie kompensatorisch überproduziert werden, in der Schwangerschaft ansteigen und bei Diabetes erhöht sein (Koskinen et al., 1994). Chromatographische und elektrophoretische Bestimmungsmethoden können durch fetales Hämoglobin verfälscht werden. In der Schwangerschaft ist die Verwendung des HbA1c-Wertes aufgrund der veränderten Umsatzrate der Erythrozyten und der Blutverdünnung zur Diagnose des Gestationsdiabetes nur eingeschränkt beurteilbar (Brückel et al., 2010).

Hämatologische Erkrankungen, die mit chronischen Hämolysen einhergehen, sind durch eine verkürzte Erythrozytenüberlebensdauer mit einer verminderten Glykierung des Hämoglobins verbunden (Panzer et al., 1982). Eine verlängerte Erythrozytenüberlebenszeit (z.B. durch Splenektomie) führt zu keiner klinisch relevanten Erhöhung des HbA1c-Wertes. Eine Eisenmangelanämie kann bei Gesunden und Diabetikern zu

erhöhten HbA1c-Werten führen, die sich unter Eisensubstitution normalisieren (El-Agouza et al., 2002).

Substanzen wie Acetylsalizylsäure und Alkohol bilden mit Hämoglobin Addukte. In der Elektrophorese und der Ionenaustauschchromatographie kann dies zu falsch hohen Resultaten bei der HbA1c-Bestimmung führen (Hoberman, 1983; Nathan et al., 1983). Klinisch sind die Einflüsse dieser Substanzen meist zu vernachlässigen (Koskinen et al., 1998). Vor allem bei Aspirin-Langzeittherapie in hoher Dosierung und bei starkem Alkoholkonsum ist ein Effekt nachweisbar. Auch unter Therapie mit Beta-Lactam-Antibiotika wie Penicillin kann das HbA1c durch Entstehung eines Hämoglobins mit entsprechender Mobilität erhöht erscheinen (Flückiger, 1989).

Die Aldiminform, auch als labiles Glykohämoglobin bezeichnet, wird bei chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren mit erfasst, daher sollte sie vor der Analyse beseitigt werden. Auch eine massive Hypertriglyzeridämie oder Hyperbilirubinämie erfordert eine geeignete Aufbereitung der Zellen durch Waschen (Dix et al., 1979).

1.3.4 Störungen der HbA1c-Messung bei Nierenerkrankungen

Nierenerkrankungen gehören zu den häufigsten und zugleich gefährlichsten Komplikationen bei Diabetes. Etwa 20 bis 40 % aller Menschen mit Diabetes entwickeln im Krankheitsverlauf Nierenkomplikationen, welche im fortgeschrittenen Stadium ohne Nierenersatztherapie zum Tode führen können (Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2010). Eine möglichst genaue Bestimmung des HbA1c ist insbesondere bei Diabetikern mit Nierenerkrankung von großer Bedeutung für die Einschätzung und Behandlung des Diabetes.

Durch Carbamylierungsreaktion bei Niereninsuffizienz kann es zu erheblichen Anstiegen der HbA1c-Werte um bis zu 3 % kommen (Flückiger et al., 1981). Durch Interaktion von terminalen Hämoglobin-Aminogruppen der Betakette des Hämoglobins mit Isozyanat, welches aus spontaner Dissoziation von Harnstoff stammt, entsteht carbamyliertes Hämoglobin. Dieses carbamylierte Hämoglobin kann die HbA1c-Messung verfälschen.

Ionenaustauschchromatographische und elektrophoretische Verfahren wurden in älteren Studien durch die Anwesenheit von carbamylisiertem Hämoglobin gestört, da sie ladungsabhängig sind und das carbamylierte Hämoglobin mit HbA1a, HbA1b und HbA1c eluiert, was zu einer vermeintlichen Erhöhung des HbA1c-Wertes führt (Bannon et al., 1984, Chachou et al., 2000).

Immunoassays und die Affinitätschromatographischen Verfahren sind davon nicht betroffen. Beim Immunoassay zeigen die monoklonalen Antikörper gegen das glykierte N-terminale Ende der beta-Kette keine Kreuzreaktion mit carbamylisiertem Hämoglobin (Rose et al., 1995). Bei Affinitätschromatographischen Verfahren wird die Reaktion von Borsäure mit der Glukose durch carbamylisiertes Hämoglobin nicht beeinträchtigt (Suhonen et al., 1989).

Im Rahmen einer Urämie kann es außerdem zu einer verkürzten Erythrozytenüberlebensdauer und zu einer hyporegenerativen Anämie kommen (Shaw, 1967; Feldman und Singer, 1974). Bei therapeutischem Einsatz von Erythropoetin sollte unter Einbezug von Hämatokrit und Retikulozyten eine HbA1c-Korrekturformel angewendet werden (Nakao et al., 1998).

1.3.5 HbA1c als Biomarker

Die Bestimmung des HbA1c ist der wichtigste Parameter zur Beurteilung der Diabetes-einstellung, daher sollte diese bei Diabetikern mindestens zweimal pro Jahr erfolgen. Eine häufigere Kontrolle ist bei Diabetes mellitus Typ 1 und zur Verlaufskontrolle in der Schwangerschaft (diabetische Schwangerschaft oder Schwangerschaftsdiabetes) angeraten (Sacks et al., 2002).

Der direkte Zusammenhang zwischen der Einstellung des Blutzuckerspiegels gemessen am HbA1c und den Risiken von Spätkomplikationen konnte in zwei Multicenterstudien gezeigt werden: Die DCCT-Studie (Diabetes Control and Complications Trial) wurde an Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus durchgeführt und zeigte, dass intensive Therapie den Beginn und das Fortschreiten von Spätkomplikationen wie diabetischer Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie effektiv verzögert (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993). Die UKPD-Studie (United Kingdom Prospective Diabetes Study) zeigte ähnliche Ergebnisse für Patienten

mit Diabetes mellitus Typ 2; optimale Blutglukose- und Blutdruckeinstellung ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung sind Therapieziel (UK Prospective Diabetes Study Group, 1998).

Der Referenzbereich für HbA1c liegt unter 6,2 % (45 mmol/mol), dabei soll der verwendete Assay nach Referenzverfahren auf den Normbereich 4 bis 6 % kalibriert sein. Steigt der HbA1c-Wert auf 7 % (53 mmol/mol), erhöht sich das Infarktrisiko um 40 %, bei Werten um 8 % (64 mmol/mol) erhöht sich das Infarktrisiko um 80 %. Die diabetischen Komplikationen vermindern sich bei einer Senkung des HbA1c-Wertes pro Prozentpunkt um 20 %, aber das Hypoglykämierisiko verdreifacht sich. Die Amerikanische Diabetes Gesellschaft (ADA) leitet ihre Empfehlungen von der DCCT Studie ab. HbA1c-Werte unter 7 % sind Therapieziel, bei Werten über 8 % sollte eine neue Therapieeinstellung erfolgen (American Diabetes Association, 2003).

Die WHO empfiehlt HbA1c als ein Diagnosekriterium für Diabetes mellitus, ein HbA1c-Wert von 6,5 % gilt als Grenzwert für die Stellung der Diagnose (World Health Organisation, 2011). Die Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) leitet ebenfalls Empfehlungen ab. Ein HbA1c über 6,5 % gilt damit als ausreichend spezifisch für die Diagnose Diabetes mellitus, ein HbA1c unter 5,7 % hingegen als sensitiv genug für den Ausschluss der Diagnose. Bei Patienten mit HbA1c zwischen 5,7 und 6,4 % soll mittels einer Glukosemessung nach herkömmlichen Kriterien (Nüchternglukose oder oraler Glukosetoleranztest) die Diagnose gestellt werden.

Tab. 2: Diagnostische Bereiche für Diabetes mellitus und Prädiabetes

Kein Diabetes mellitus	< 5,7 % bzw. < 38,8 mmol/mol
Prädiabetes (Glukosemessung durchführen!)	5,7 – 6,4 % bzw. 38,8 – 46,4 mmol/mol
Diabetes mellitus	> 6,4 % bzw. > 46,4 mmol/mol

Die Diabetesdiagnose erfordert standardisierte Messverfahren und angemessene Qualitätskontrollen, die Messung sollte bei allen Personen erfolgen, die ein erhöhtes Diabetesrisiko im Deutschen Diabetes-Risiko-Test haben (Schulze et al., 2007). Liegen Diabetessymptome vor (Gewichtsverlust, Polyurie, Polydipsie) oder Zustände, die eine Verfälschung der HbA1c-Werte bewirken können, ist die Diagnose primär durch Glukosemessung zu stellen (Brückel et al., 2010).

1.4 Nierenerkrankungen

1.4.1 Akutes Nierenversagen (ANV)

Akutes Nierenversagen (ANV) ist als akut einsetzende, rasche Abnahme der Nierenfunktion, die über Tage anhält und prinzipiell reversibel ist, definiert. Leitsymptom ist ein Anstieg des Serumkreatinins $> 50\%$ des Ausgangswertes. Es kommt zur Retention harnpflichtiger Substanzen und Störungen des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts.

Äthiologisch wird eine Unterteilung in prärenales, intrarenales und postrenales ANV vorgenommen. Bei prärenalem Nierenversagen führt eine verminderte Perfusion zum Funktionsverlust der Nieren. Als Ursachen kommen eine Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens, ein Abfall des Herzzeitvolumens und des arteriellen Mitteldrucks (Kreislaufschock), eine systemische Vasodilatation (SIRS, Sepsis), eine Zytokinvermittelte renale Vasokonstriktion oder eine renale Vasokonstriktion bei hepatorenalem Syndrom in Frage. Medikamente wie NSAID, ACE-Hemmer und Diuretika können ebenfalls ein prärenales Nierenversagen bewirken. Ursachen für ein intrarenales ANV sind akute Tubulusnekrose, makrovaskuläre Erkrankungen, mikrovaskuläre Erkrankungen oder tubulo-interstitielle Erkrankungen. Ist die Nierenfunktion eines Patienten eingeschränkt, kann es bei Gabe mancher Medikamente oder von Röntgenkontrastmittel zu einem „acute-on-chronic“ Nierenversagen kommen. Das postrenale Nierenversagen wird durch mechanische Abflussbehinderung des Harns aus Nieren oder Blase verursacht. Tumore, Missbildungen, urologische oder gynäkologische Erkrankungen kommen als Auslöser in Frage. Es tritt nur auf, wenn der Harnabfluss beider Nieren gestört ist (Jörris und Frei, 2001). Die Differenzierung der drei äthiologischen Gruppen des ANV ist durch Untersuchung des Urins möglich (Kribben und Philipp, 1997).

Der klinische Verlauf des akuten Nierenversagens kann in drei Phasen unterteilt werden. Die Harnsekretion ist in der ersten Phase vermindert (Oligurie < 500 ml Urin/Tag) oder versiegt völlig (Anurie < 100 ml Urin/Tag). Diese Phase kann Stunden bis Wochen andauern, wobei etwa 70% der Fälle von ANV oligurisch beginnen. In der zweiten Phase, die zwei bis vierzehn Tage dauert, steigen Kreatinin und BUN bzw. Harnstoff im Serum kontinuierlich an. Das Urinvolumen ist normal oder erhöht (Polyurie

> 2000 ml Urin/Tag). In der dritten Phase, die Wochen bis Monate dauert, stellt sich die Nieren-funktion langsam wieder ein (Kierdorf und Seeliger, 1997).

Das akute Nierenversagen wird mit Hilfe der RIFLE-Kriterien in fünf Schweregrade eingeteilt, die zur Abschätzung der Prognose von Bedeutung sind (Bellomo et al., 2004).

Tab. 3: Fünf Schweregrade des akuten Nierenversagens nach den RIFLE-Kriterien (Risk, Injury, Failure, Loss, End stage renal disease)

Schwere-grad	Kreatininanstieg	GFR Abfall	Urin
Risk	> 50 %	> 25 %	< 0,5 ml/kg/h für 6 h
Injury	> 100 %	> 50 %	< 0,5 ml/kg/h für 12 h
Failure	> 200 %	> 75 %	< 0,3 ml/kg/h für 24 h oder Anurie für 12 h
Loss	Vollständiger Verlust der Nierenfunktion für > 4 Wochen		
ESRD	Terminale Niereninsuffizienz (end stage renal disease)		

Die modifizierte AKIN-Stadieneinteilung berücksichtigt im Stadium 1 (Risk) einen niedrigeren Grenzwert des Kreatininanstiegs von 0,3 mg/dl, die Stadien 4 (Loss) und 5 (ESRD) entfallen in dieser neueren Einteilung (Metha et al., 2007).

Etwa 30 % der Intensivpatienten entwickeln ein akutes Nierenversagen. Die Mortalitätsrate von Intensivpatienten mit ANV liegt bei ca. 50 %, wozu überwiegend die Schwere der Grunderkrankung beiträgt. Krankheitsverlauf und Prognose werden aber auch durch die negativen Auswirkungen des ANV beeinflusst. Von den Überlebenden sind weniger als 5 % auf eine Nierenersatztherapie angewiesen (Jörris und Frei, 2001). Eine extrakorporale Behandlung des ANV sollte spätestens bei einem Serumkreatinin von 4 bis 6 mg/dl und einem Serumharnstoff von 120 bis 140 mg/dl begonnen werden. Es stehen Hämodialyse und Hämofiltration zur Verfügung, die intermittierend oder kontinuierlich durchgeführt werden können. Ziel ist die Therapie der Azotämie, der Ausgleich der Flüssigkeits- und Elektrolytbilanz und die Korrektur einer metabolischen Azidose.

1.4.2 Chronische Niereninsuffizienz (CNI)

Die chronische Nierenerkrankung ist entweder als eine Schädigung der Nieren oder eine Verminderung der GFR auf < 60 ml/min / 1,73 m² für mehr als drei Monate definiert

(National Kidney Foundation, 2002). Chronische Niereninsuffizienz ist als Folge einer irreversiblen Verminderung der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion beider Nieren zu verstehen. Neben dem Versagen der exkretorischen Nierenfunktion und Störungen im Flüssigkeits- Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt kommt es zur Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion mit verminderter Sekretion von Erythropoetin, Renin, aktivem Vitamin D und Prostaglandinen, sowie zu toxischen Organschäden durch retinierte harnpflichtige Substanzen.

Einige chronische Nierenerkrankungen wie diabetische Nephropathie, primäre und sekundäre Glomerulonephritiden, chronisch tubulo-interstitielle Erkrankungen, vaskuläre (hypertensive) Nephropathien und polyzystische Nierenerkrankung führen auf Dauer häufig zur terminalen Niereninsuffizienz. Diabetes mellitus, insbesondere Typ 2, ist neben Hypertonie die häufigste Ursache des terminalen Nierenversagens (Eckardt et al., 2012). Beide Grunderkrankungen sind mit einem hohen Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert.

Der Anstieg der Retentionswerte (Kreatinin, Blood Urea Nitrogen (BUN) bzw. Harnstoff, Cystatin C) und der Rückgang der Kreatininclearance sind charakteristische Laborbefunde. Wird ein erhöhtes Serumkreatinin gemessen, so wird zunächst zwischen akutem Nierenversagen und chronischer Niereninsuffizienz unterschieden. Mit der konservativen Therapie sollte frühzeitig begonnen werden, um die Progression der Niereninsuffizienz zu verzögern.

Die chronische Niereninsuffizienz wird nach der National Kidney Foundation (NKF) in die Stadien 0 bis 5 eingeteilt (National Kidney Foundation, 2002).

Tab. 4: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach der National Kidney Foundation

Stadium	Bezeichnung	Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min/1,73 m ²)	Aufgaben/Therapie
0	Erhöhtes Risiko für Niereninsuffizienz	≥ 90	Diagnostik, Prophylaxe der Niereninsuffizienz
1	Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion	≥ 90	Diagnostik, Therapie der Begleiterkrankungen, Progression und kardiovaskuläres Risiko vermindern
2	Nierenschädigung mit milder Niereninsuffizienz	60 – 89	Diagnostik, Therapie der Begleiterkrankungen, Progression und kardiovaskuläres Risiko vermindern
3	Mittelschwere Niereninsuffizienz	30 – 59	Zusätzlich Diagnostik und Therapie der Komplikationen
4	Schwere Niereninsuffizienz	15 – 29	Vorbereitung der Nierenersatztherapie
5	Nierenversagen	< 15	Nierenersatztherapie

1.4.3 Nierenersatzbehandlung (Net)

Ziele der Nierenersatzbehandlung sind Korrekturen des Flüssigkeits-, Elektrolyt-, und Säure-Basen-Haushalts, sowie die Elimination von harnpflichtigen Substanzen wie Kreatinin, BUN bzw. Harnstoff und Urämietoxinen. Neben der Hämodialyse stehen die Peritoneal-dialyse, die Hämofiltration und die Hämodiafiltration zur Verfügung.

Die Hämodialyse beruht auf Diffusion von harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut in die Dialysatflüssigkeit über eine semipermeable Membran. Besteht ein osmotisches oder physikalisches Druckgefälle vom Blut zum Dialysat, kann dem Körper Wasser entzogen werden. Die chronisch-intermittierende Hämodialyse erfolgt dreimal wöchentlich für einige Stunden und erfordert die Anlage einer arterio-venösen Fistel, um einen leicht zu punktierenden Gefäßzugang zu haben. Die kontinuierliche Hämodialyse erfolgt täglich über die Dauer von zwei Stunden.

Die Peritonealdialyse nutzt das Peritoneum als semipermeable Membran, die Bauchhöhle enthält das über einen Katheter zugeführte Dialysat. Eine kaliumfreie Glukose-lösung dient in der Regel als Spüllösung. Das aktuelle Konzept der „integrated care“

unterstützt als primäres Verfahren die Peritonealdialyse, später erfolgt dann der Wechsel zur Hämodialyse.

Die Hämofiltration bietet den Vorteil der geringeren Kreislaufbelastung verglichen mit der Hämodialyse. Über eine Membran wird unter Nutzung eines Druckgradienten dem Blut eine dem Primärharn ähnliche Flüssigkeit entzogen und durch eine isotonische beziehungsweise isoionische Flüssigkeit ersetzt. Die Hämofiltration erfolgt dreimal wöchentlich.

Die Hämodiafiltration kombiniert die Vorteile der Hämodialyse mit denen der Hämofiltration. So werden sowohl niedermolekulare als auch mittelmolekulare Stoffe gut eliminiert. Es erfolgen ebenfalls drei Behandlungen pro Woche (Bundesverband Niere e.V., 2008; Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Fachgesellschaften, 2010).

1.4.4 Nierentransplantation (Ntx)

Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist die Funktion einer transplantierten Niere selbst einer optimalen Dialyse überlegen. Die Niere wird meist extraperitoneal in die Fossa iliaca transplantiert. Kardiovaskuläre Komplikationen, Infektionen und Malignome sind die häufigsten Todesursachen nach Nierentransplantation. Optimale Blutdruckeinstellung, Behandlung einer Hyperlipidämie und Proteinurie sowie Gewichtsnormalisierung und Nikotinverzicht sind wichtig für eine gute Prognose (CKD-MBD Work Group, 2009).

1.4.5 Labordiagnostik von Nierenerkrankungen

1.4.5.1 Kreatinin

Kreatinin entsteht durch nicht-enzymatische Dehydrierung von muskulärem Kreatin. Der größte Teil des Kreatins liegt als Kreatinphosphat vor und dient dem Muskel als Energiespeicher, da bei Muskelkontraktion durch Spaltung von Kreatinphosphat chemische Energie in mechanische Energie umgewandelt wird (Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000). Muskelmasse und Kreatinaufnahme mit der Nahrung bestimmen neben Alter und Geschlecht die Menge des Körperkreatinins. Die Kreatininkonzentration im Serum ist ein

Indikator zur Beurteilung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Dabei müssen allerdings die tägliche Bildung von Kreatinin (abhängig von der Muskelmasse) und die Ausscheidung im Gleichgewicht stehen. Ein Nierengesunder, der sich ausgewogen ernährt, erfüllt diese Bedingung. Sinkt die GFR, so steigt die Kreatininkonzentration im Serum an, wenn die Bildung von Kreatinin konstant bleibt (Perrone et al., 1992). Die Referenzwerte sind von Alter, Geschlecht, Körpergewicht und Bestimmungsmethode abhängig. Über längere Zeiträume zeigt die Kreatininkonzentration intraindividuell nur geringe Schwankungen. Eine annähernd lineare Korrelation zwischen GFR und Kreatininkonzentration im Serum besteht bei einer GFR im Bereich von 20 bis 40 ml/min / 1,73 m². Dies entspricht einem Serumkreatinin von 2 bis 4 mg/dl bei einer Person mit 75 kg Körpergewicht (Filser und Ritz, 2001). Ein Anstieg der Kreatininkonzentration im Blut ist erst bei einer Reduktion der GFR auf unter 50 % gegeben, geringere Nierenschäden bleiben somit unerkannt (kreatininblinder Bereich zwischen 40 bis 70 ml/min / 1,73 m²).

Die Bestimmung des Kreatinins erfolgt durch eine Modifikation der kinetischen Jaffé-Reaktion. Ist eine starke Base wie NaOH vorhanden, reagieren Pikrat und Kreatinin und bilden ein rotes Chromophor, welches eine Extinktion bei 510 nm aufweist. Die zunehmende Extinktionsänderung ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe. Bilirubin wird mit Kaliumferricyanid oxidiert, um Interferenzen zu vermeiden (Knapp und Mayne, 1987).

1.4.5.2 Kreatinin-Clearance

Gegenüber der als Referenzmethode zur Ermittlung der GFR geltenden Inulin-Clearance werden mit der Kreatinin-Clearance zu hohe Werte bestimmt. Diese Überbestimmung nimmt mit der Einschränkung der Nierenfunktion zu, da Kreatinin vermehrt tubulär sezerniert wird (Shemesh et al., 1985). Die Kreatinin-Clearance ermöglicht zwar nicht die Messung der GFR, gibt aber approximativ deren Größenordnung an. Die Kreatinin-Clearance kann somit zur Feststellung relativer Veränderungen der GFR herangezogen werden. Sind GFR und Kreatinin-Clearance bekannt, kann nachfolgend die Kreatinin-Clearance als alleiniges Kriterium zur relativen Beurteilung des Verlaufes der GFR herangezogen werden (Payne, 2000). Clearanceresultate werden auf 1,73 m² mittlere Körperoberfläche standardisiert. Die Körperoberfläche des Patienten wird aus einem Nomogramm entnommen und die

Clearance nach der Clearanceformel (Kreatinin-Clearance (ml/min) = Kreatinin im Urin (mg/dl) x Urinvolumen (ml/min) / Kreatinin im Serum (mg/dl)) berechnet. Als Algorithmus zur Schätzung der Kreatinin-Clearance können bei Erwachsenen die geschlechts-spezifischen Formeln nach Cockcroft und Gault (Cockcroft und Gault, 1976) verwendet werden, bei Kindern die Formel nach Schwartz (Schwartz et al., 1987).

1.4.5.3 Harnstoff und Blood Urea Nitrogen (BUN)

Harnstoff ist das Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels. Beim Proteinabbau werden die Aminosäuren desaminiert, wobei der dabei entstehende Ammoniak in den Mitochondrien in Harnstoff umgewandelt wird. Etwa 16 g Harnstoff werden täglich von der Leber eines gesunden Erwachsenen gebildet (Atkinson, 1992). Die Begriffe Harnstoff und Blood Urea Nitrogen (BUN bzw. Harnstoff-N) werden in der medizinischen Diagnostik synonym verwendet. Der BUN wird aus dem Harnstoffwert durch Multiplikation mit dem Faktor 0,46 berechnet. Ist das BUN bzw. der Harnstoff im Serum erhöht, bezeichnet man diesen Zustand als Azotämie.

Auf Grund der komplexen renalen Ausscheidungsverhältnisse und der Abhängigkeit vom Proteinstoffwechsel ist der Referenzbereich im Serum weit. Erst bei einer Verminderung der GFR um 75 % wird der Referenzbereich überschritten. Ist die Nierenfunktion stärker eingeschränkt, korreliert der Serumharnstoff besser mit der GFR. Der Serumharnstoff ist von der renalen Perfusion und Proteinzufuhr abhängig und somit zur Diagnostik der beginnenden Niereninsuffizienz ungeeignet. Er eignet sich aber durchaus zur Verlaufsbeurteilung bei starker Einschränkung der GFR.

Die Bestimmung des Harnstoffs erfolgt durch eine Hydrolyse mittels Urease, wodurch Ammoniak und Kohlendioxid gebildet werden. Der Ammoniak wird von der Glutamat-Dehydrogenase verwendet, um alpha-Ketoglutarat reduktiv zu aminieren, wobei eine Oxidation von reduziertem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) stattfindet. Das Verschwinden von NADH bewirkt eine Extinktionsänderung bei 340 nm. Die Extinktionsänderung ist direkt proportional zur BUN- bzw. Harnstoff-Stickstoff-Konzentration in der Probe.

1.4.5.4 Cystatin C

Niedermolekulare Proteine, die endogen konstant gebildet werden, frei filtriert und weder reabsorbiert noch sezerniert oder extrarenal eliminiert werden, befinden sich in Evaluation als Marker zur Bestimmung der GFR. Cystatin C ist ein Proteaseinhibitor der Cystatin-Superfamilie, der Proteasen neutralisiert, die von absterbenden Zellen stammen oder von Lysosomen ausgeschwitzt werden. Cystatin C ist in allen kernhaltigen Zellen nachweisbar und wird in relativ konstanter Rate gebildet. Es besteht aus 120 Aminosäuren, enthält zwei Disulfidbrücken und wird als prä-Protein synthetisiert (Abrahamson et al., 1991). Die Serumkonzentration von Cystatin C ist allein von der GFR abhängig; Muskelmasse, Alter und Geschlecht beeinflussen die Messung nicht (Laterza et al., 2002). Als Screening-Test zur Abschätzung der GFR ist Cystatin C aufgrund besserer Durchführbarkeit und höherer Sensitivität im kreatininblinden Bereich der Kreatinin-Clearance und dem Serumkreatinin vorzuziehen.

Die Bestimmung des Cystatin C erfolgt durch Vermischung einer Probe mit Polystyrolpartikeln, die mit Antikörpern gegen humanes Cystatin C beschichtet sind. Es bilden sich Aggregate, die eingestrahktes Licht streuen. Die Intensität des Streulichts ist proportional zur Konzentration des Cystatin C in der Probe.

1.5 Sonstige relevante Laborwerte

1.5.1 Hämoglobinkonzentration

Der Hämoglobinwert des Blutes hängt von der Anzahl der Erythrozyten, ihrem Hämoglobingehalt und dem Plasmavolumen ab. Ist der Hämoglobinbestand des Organismus verringert, so liegt eine Anämie vor. Die Hämoglobinkonzentration erfasst das Produkt aus Erythrozytenzahl und Erythrozytenvolumen und ist der sinnvollste Parameter zur Erkennung einer Anämie (Peghini und Fehr, 2002). Die WHO legt als Werte zur Diagnose einer Anämie < 13 g/dl für Männer, < 12 g/dl für menstruierende Frauen und < 11 g/dl für Schwangere fest (World Health Organisation, 1968). Bei Nierenerkrankungen kann es zu einer sogenannten renalen Anämie kommen, wobei die Erythrozytenlebenszeit leicht verkürzt ist und Erythropoietin vermindert synthetisiert wird. Die renale Anämie ist normozytär, normochrom und hyporegenerativ.

Die Bestimmung des Hämoglobins erfolgt durch die Bindung hydrophober Gruppen des Nodiuilaurylsulfats an das Globin, wobei eine Konformitätsänderung erfolgt. Das Eisen des Häms wird oxidiert (von Fe^{2+} zu Fe^{3+}), die hydrophilen Gruppen des Nodiuilaurylsulfats binden nun an das Eisen und bilden mit diesem ein stabiles Reaktionsprodukt, das photometrisch bei 555 nm bestimmt wird.

1.5.2 Blutglukose

Die Bestimmung der Blutglukose kann in kapillärem oder venösem Vollblut, Plasma oder Serum erfolgen (Marks, 1996). In den verschiedenen Specimen werden bei demselben Patienten zum gleichen Zeitpunkt unterschiedliche Blutglukosekonzentrationen bestimmt (Weiner, 1995). Umrechnungsfaktoren für kapilläre Blutglukose (KB) und venöses Plasma (VP) sind VP/KB bei Nicht-Diabetikern 0,997, bei Diabetikern 1,089 und über alle 1,048 (Haeckel et al., 2002). Die Bestimmung der Blutglukose ist indiziert bei Hyperglykämie- oder Hypoglykämieverdacht. Die größte Bedeutung hat sie für die Diagnostik und Therapiekontrolle des Diabetes mellitus.

Die Bestimmung der Glukose erfolgt durch eine Phosphorylierung bei Vorhandensein von Adenosin-5-Triphosphat (ATP) und Magnesium mittels Hexokinase, wobei Glukose-6-Phosphat und Adenosindiphosphat (ADP) entstehen. Glukose-6-Phosphat wird dann bei Vorhandensein von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert, wodurch 6-Phosphoglukonat und reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) gebildet werden. Für jedes vorliegende Mol Glukose wird ein Mol NAD zu einem Mol NADH reduziert. Die Extinktion durch NADH, und somit die Glukosekonzentration, wird bei 340 und 383 nm gemessen.

1.6 HbA1c und Nierenerkrankungen

1.6.1 Interpretation des HbA1c bei Niereninsuffizienz

Durch vergleichende Untersuchungen von HbA1c und Nüchternblutzucker bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit erhöhtem Serumkreatinin über 2,5mg/dl die HbA1c-Werte abweichen, da die Lebensdauer der Erythrozyten verkürzt ist und somit niedrigere Messwerte resultieren (Schernthaner et al., 1979). Die Blutglukosespiegel bei Diabetikern mit terminaler Nieren-

insuffizienz werden somit zu niedrig eingeschätzt (Inaba et al., 2007, Peacock et al., 2008). In einer aktuellen Studie wurden 11 Geräte und Assays an Patienten mit und ohne Nierenversagen und Diabetes miteinander verglichen. Die HbA1c-Werte waren durchschnittlich 1,5 % niedriger bei Patienten mit Nierenversagen, was die Autoren auf die verkürzte Erythrozytenüberlebenszeit zurückführen (Little et al., 2013).

In einer Untersuchung an Hämodialysepatienten war die Variabilität des Hämoglobins kein unabhängiger Prädiktor für die kardiovaskuläre Mortalität und die Gesamtmortalität (Eckhardt et al., 2010). Die große HbA1c-Variabilität resultiert aus urämiebedingter Insulinresistenz, veränderter Insulinkinetik, reduzierter Glukoneogenese, Dialyse, Hochproteindiät und Bewegungsmangel (Schernthaner und Sämann, 2010). Als Verlaufsparemeter ist HbA1c bei Niereninsuffizienz folglich nur bedingt geeignet.

Patienten mit Diabetes Typ 2 und chronischer Niereninsuffizienz haben eine erhöhte kardiovaskuläre Ereignisrate und Gesamtmortalität (Schneider et al., 2008). Hämodialysepatienten mit Diabetes weisen eine reduzierte Fünfjahresüberlebensrate auf (USRDS, 2008). Eine bessere Blutzuckereinstellung mit HbA1c-Werten unter 7,5 % scheint die Mortalität zu senken (Morioka et al., 2001; Hayashino et al., 2007), während bei niedrigeren HbA1c-Werten unter 6,5 % verglichen mit Werten zwischen 6,5 % und 8 % die Mortalität gleich bleibt (Oomichi et al., 2006).

Die Studienlage zur Korrelation zwischen HbA1c-Werten und Mortalität ist widersprüchlich, in den USA konnte bei dialysepflichtigen Diabetikern zunächst keine Korrelation gefunden werden (Williams et al., 2006), in einer neueren Untersuchung wurde aber ein enger Zusammenhang zwischen Anstieg der HbA1c-Werte und Mortalität festgestellt (Kalantar-Zadeh et al., 2007). Schlechte Blutzuckereinstellung (HbA1c > 8% oder Serumglukose > 200 mg/dl) ist assoziiert mit einer erhöhten Sterblichkeit, allerdings führen auch sehr niedrige Blutzuckerspiegel zu einer erhöhten Mortalität (Ricks et al., 2012).

Da Patienten mit Diabetes und Niereninsuffizienz zu Hypoglykämien neigen, sollte der HbA1c-Zielwert individuell angepasst werden. Sind die Nieren bereits geschädigt, sollte der HbA1c-Wert unter 7 % liegen, um das Fortschreiten der Erkrankung zu verlangsamen. Dabei dürfen jedoch keine Makroangiopathie oder eine Wahrnehmungsstörung für Hypoglykämien vorliegen, da in diesem Fall der HbA1c-Zielwert auf 7 bis 7,5 %

angehoben werden sollte (Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2010).

1.6.2 Carbamyliertes Hämoglobin bei Niereninsuffizienz

Der scheinbare Anstieg von chromatographisch bestimmtem Glykohämoglobin bei Urämie ist auf die verstärkte Bildung von carbamyliertem Hämoglobin zurückzuführen, welches bei dieser Bestimmungsmethode die Messwerte verfälschen kann (Fluckiger et al., 1981). Carbamyliertes Hämoglobin entsteht sowohl in Gesunden, in nicht urämischen Diabetikern, als auch in Patienten mit Nierenversagen, bei Urämie ist es zwei- bis vierfach erhöht. In älteren Studien korreliert es mit der Nierenfunktion und dem chromatographisch bestimmten Glykohämoglobin (Smith et al., 1989).

Chronisches Nierenversagen, Dialyse und Nierentransplantation führen zu einem Anstieg des carbamylierten Hämoglobins (Smith et al., 1988). Die Carbamylierungsrate steigt mit der Höhe des Harnstoffs im Blut und ist, für BUN-Werte über 80 mg/dl, bei chronischem Nierenversagen stärker erhöht als bei Hämodialysepatienten und bei akutem Nierenversagen. Sie ist dabei sowohl von der BUN-Konzentration, als auch von der Dauer der Harnstoffexposition abhängig (Stim et al., 1995). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, akutes und chronisches Nierenversagen anhand der Konzentration des carbamylierten Hämoglobins besser unterscheiden zu können (Davenport et al., 1993).

Die Messung der Konzentration des carbamylierten Hämoglobins kann als therapeutischer Marker zur Sicherstellung einer adäquaten Urämiekontrolle bei Nierenversagen genutzt werden (Oimomi et al., 1984). Um den Ernährungsstatus (Proteinkatabolismus) von Hämodialysepatienten zu beurteilen, kann der Index Harnstoff/carbHb herangezogen werden (Hasuike et al., 2002).

Neben carbamyliertem Hämoglobin als Langzeitparameter (zwei Monate) existieren auch carbamylierte Plasmaproteine als Kurzzeitparameter (zwei bis drei Wochen). Bei chronischem Nierenversagen und zur Dialysekontrolle ist die Bestimmung des carbamylierten Hämoglobins sinnvoll, während bei akutem Nierenversagen die Bestimmung von carbamyliertem Protein den größeren Nutzen hat (Balion et al., 1998).

Harnstoff und Glukose beeinflussen gegenseitig ihre Bindung an Hämoglobin, wobei Glukose die Entstehung von carbamylisiertem Hämoglobin stärker vermindert als Isozyanat die Glykierung von Hämoglobin senkt (Ationu, 1992). Bei gleicher durchschnittlicher Blutglukosekonzentration ist die Entstehung von Glykohämoglobin bei Diabetikern mit Niereninsuffizienz folglich geringer als bei Diabetikern ohne Nierenerkrankung.

Carbamyliertes Hämoglobin interferiert in unterschiedlichem Ausmaß mit verschiedenen HbA1c-Assays. Dies bestätigt, dass HbA1c-Werte bei urämischen Patienten mit Vorsicht interpretiert werden müssen (Chachou et al., 2000).

2. Fragestellung

Wir haben in unserer Studie drei verschiedene Messmethoden eingesetzt, um die HbA1c-Werte von 407 nephrologischen Proben und 217 Routineproben zu bestimmen und im Hinblick auf die konkreten Messergebnisse zu vergleichen. Es wurden diverse Untergruppen gebildet, um Zusammenhänge zwischen verschiedenen Erkrankungen und den jeweiligen Messergebnissen zu untersuchen. Auch der Einfluss der Carbamylierung wurde in unseren Untersuchungen indirekt durch Messung des BUN berücksichtigt. In unserer Studie kamen die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Variant II), die Kapillarzonenelektrophorese (CapillarysTM 2 Flex Piercing) und eine immunologische Messmethode (Dimension RXL Max) zum Einsatz.

Ob diese drei Messmethoden zum Einsatz im Routinelabor sowohl für nierenkranke Patienten als auch für Routinepatienten gut einsetzbar sind und ob Messunterschiede durch verschiedene Messverfahren zu Fehleinschätzungen bezüglich nicht-diabetischer, prädiabetischer und diabetischer Stoffwechsellage führen können bedarf einer näheren Betrachtung. Von besonderer Relevanz ist der Grad der Übereinstimmung zwischen den drei von uns evaluierten Messmethoden im nephrologischen Kollektiv. Hier stellt sich die Frage, ob diese Methoden in der klinischen Routine auch für nierenkranke Patienten gut geeignet sind, um den HbA1c mit hoher Genauigkeit zu bestimmen.

3. Methoden

3.1 Beschreibung des Patientenkollektivs

Für die Studie wurden von Januar bis März 2012 N = 624 Patientenproben an der Universitätsklinik Bonn untersucht und mit drei verschiedenen Messmethoden der HbA1c-Wert bestimmt. Bei N = 407 Patientenproben handelt es sich um Proben von nephrologischen Patienten, bei N = 217 Patientenproben um Routineeinsendungen für die HbA1c-Bestimmung. Die demographischen Daten der Patienten wurden mittels der elektronischen Krankenakten (KAS) erfasst und die Laborwerte aus der Institutsdatenbank (Swisslab) ergänzt. Alle erhobenen Daten wurden zur Auswertung anonymisiert und elektronisch geschützt abgespeichert. Die demographischen Daten des Probenkollektivs sind in Tabelle 5 dargestellt. Bei den qualitativen Merkmalen ist die Anzahl bezogen auf die verwertbaren Fälle und der Prozentwert angegeben, bei den quantitativen Merkmalen sind der Mittelwert, die verwertbaren Fälle und die Standardabweichung angegeben. Für die stetigen Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben durchgeführt, das Signifikanzniveau ist $p = 0,05$.

3.2 Blutentnahme und Probenaufbewahrung

Die Bestimmungen des HbA1c erfolgten aus venösem Vollblut. Bei der Venenpunktion zur Blutprobenentnahme wurde das Blut durch das in den Blutabnahmeröhrchen der Firma Sarstedt vorhandene Antikoagulanz für die Laboruntersuchung vorbereitet. Als Antikoagulanz wurde Ethylendiamintetraacetat (EDTA) verwendet. Es entzieht dem Blut die für die Gerinnung entscheidenden Calciumionen, indem es stabile Metallkomplexe mit Metallionen bildet. Die HbA1c-Bestimmungen erfolgten gemäß der im Labor etablierten Routine, die Werte wurden in einer Excel-Tabelle notiert. Die Patientenproben sind 7 Tage stabil, wenn sie bei 2 bis 8 Grad Celsius gelagert werden. In diesem Zeitraum wurden die Messungen vorgenommen. Gefrorene Blutproben können für 3 Monate bei minus 80 Grad Celsius aufbewahrt werden.

Tab. 5: Demographische Daten des gesamten Probenkollektivs (SD steht für Standardabweichung bzw. Standard Deviation, N steht für die jeweilige Anzahl der Proben)

	Nephrologisch	Routine	p-Wert
Anzahl	407	217	
Männliches Geschlecht (%)	257/407 (63,1)	118/216 (54,6)	
Alter in Jahren (SD)	50 ± 22,91 (N=407)	53 ± 19,98 (N=216)	0,474
Nierenersatztherapie (%)	122/407 (30)	4/217 (1,8)	
Chronische Nierenkrankheit (%)			
Stadium 1	5/406 (1,2)	4/217 (1,8)	
Stadium 2	16/406 (3,9)	3/217 (1,4)	
Stadium 3	39/406 (9,6)	12/217 (5,5)	
Stadium 4	14/406 (3,4)	5/217 (2,3)	
Stadium 5	140/406 (34,5)	2/217 (0,9)	
Akutes Nierenversagen (%)	41/407 (10,1)	4/217 (1,8)	
Anämie (%)	147/407 (36,1)	14/215 (6,5)	
Transfusion von Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat (%)	101/407 (24,8)	7/217 (3,2)	
Nierentransplantation (%)	97/407 (23,8)	15/217 (6,9)	
Diabetes (%)			
Typ 1	14/404 (3,5)	4/216 (1,9)	
Typ 2	50/404 (12,4)	25/216 (11,6)	
Gestationsdiabetes	0/404 (0)	4/216 (1,9)	
HbA1c vor Dialyse (%)	47/407 (11,5)	0/217 (0)	
Glomeruläre Filtrationsrate ml/min (%)			
<20	115/387 (29,7)	8/201 (4)	
20 – 70	156/387 (40,3)	59/201 (29,4)	
>70	116/387 (30)	134/201 (66,7)	
Glukose mg/dl im Plasma (SD)	122 ± 41,93 (N=231)	139 ± 49,69 (N=39)	0,015
Glukose mg/dl im Kapillarblut (SD)	102 ± 54,07 (N=32)	109 ± 44,94 (N=136)	0,030
Hämoglobinkonzentration g/dl (SD)	11,2 ± 1,92 (N=404)	13,2 ± 1,2 (N=195)	0,000
Blood Urea Nitrogen mg/dl (SD)	81 ± 51,14 (N=233)	Nicht bestimmt	
Cystatin C mg/l (SD)	1,71 ± 0,89 (N=81)	1,52 ± 1 (N=32)	0,212
Kreatinin mg/dl (SD)	2,64 ± 2,28 (N=389)	1,17 ± 1,06 (N=202)	0,000

3.3 Referenzwerte

Tab. 6: Referenzwerte Für Kreatinin, Blood Urea Nitrogen, Cystatin C, Hämoglobin und Glukose

	Referenzbereich und Einheit	Probenart	Gerät	Analytische Sensitivität	Messbereich
Kreatinin	0,6 – 1,3 mg/dl	Serum	Dimension Vista System (kinetische Jaffé-Methode)	0,1 mg/dl	0,1 – 20,0 mg/dl
Blood Urea Nitrogen	15 - 39 mg/dl	Serum	Dimension Vista System (Urease-GLDH-UV-Test)	1 mg/dl	1 – 150 mg/dl
Cystatin C	0,05 – 0,096 mg/dl (ab 60 LJ < 0,12 mg/dl)	Serum	Dimension Vista System (Nephelometrie)	0,005 mg/dl	0,023 – 0,8 mg/dl
Hämoglobin	Männer: 13,5 – 17,2 g/dl (ab 65 LJ 12,5 – 17,2) Frauen: 12 – 15,4 g/dl (ab 50 LJ 12 – 15,6, ab 65 LJ 11,8 – 15,8)	EDTA-Vollblut	Sysmex XE-500 (cyanidfreie Sodiumpyridylsulfat-Methode)		0,0 – 30,0 g/dl
Glukose	70 – 115 mg/dl	Na-Fluorid	Dimension Vista System (Hexokinase-Methode)	1 mg/dl	1 – 500 mg/dl

3.4 HPLC (High Performance Liquid Chromatography), Biorad, Variant II

Der Bio-Rad Variant II ist ein vollautomatisches Analysesystem zur Untersuchung von Hämoglobinen. Sowohl HbA1c als auch abnorme Hämoglobine werden dabei untersucht. Das Testprinzip basiert auf der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Das Hämoglobin wird nach Fraktionen aufgetrennt und der prozentuale Anteil am Gesamthämoglobin angegeben. Handelt es sich um spezielle Hämoglobinfraktionen, so wird ein Testkit verwendet, das auf die entsprechende Fraktion abgestimmt ist. Das Variant II Programm ist auf die Referenzmethoden des NGSP und der IFCC rückführbar.

Als Probenmaterial wird EDTA-Vollblut benötigt, es kann bei 2 bis 8 Grad Celsius bis zu sieben Tage aufgehoben werden. Eine spezielle Aufbereitung der Proben ist nicht notwendig, sie werden vom Gerät pipettiert und automatisch gemischt und verdünnt. Der analytische Bereich für die HbA1c-Methode ist 1,6 bis 19,3 % (0 bis 187 mmol/mol), von

einer nicht-diabetischen Konzentration ist bei einem Wert unter 5,7 % (< 38,8 mmol/mol) auszugehen. Die Reagenzien bleiben nach Anbrechen bis zu 12 Wochen lang stabil, vor Durchführung des Tests sollten sie Raumtemperatur (15 bis 30 Grad Celsius) erreichen.

Die Proben werden auf der Sampling Station (VSS) nach automatischer Mischung und Verdünnung in die analytische Kartusche injiziert. Ein programmierter Puffergradient zunehmender Ionenstärke wird von den beiden Pumpen der Chromatographic Station (VCS) in die Kartusche eingebracht und die Hämoglobine werden gemäß ihrer Ionenwechselwirkung mit dem Kartuschenmaterial aufgetrennt. Die getrennten Hämoglobine passieren dann die Durchflusszelle des Filterphotometers, wo die Extinktionsänderungen bei 415 nm gemessen werden. Hintergrundschwankungen werden durch einen zusätzlichen Filter bei 690 nm kompensiert.

Die Clinical Data Management (CDM) Software wird zur Auswertung der Absorptionen verwendet. Das Ergebnis wird als Chromatogramm (Absorption gegen die Zeit) dargestellt, der HbA1c-Peak über einen modifizierten Gaußschen Algorithmus ermittelt und das Ergebnis von den Peaks für labiles Glykohämoglobin und carbamyliertes Hämoglobin getrennt dargestellt.

Präzision: Mittelwert HbA1c (%): 5,64 (VK 4,51 %); 8,11 (VK 3,84 %); 11,53 (VK 1,78 %)

Peak Name	NGSP %	Area %	Retention Time (min)	Peak Area
A1a	---	0.7	0.149	21058
A1b	---	2.1	0.236	63420
LA1c	---	2.2	0.667	66898
A1c	6.0	---	0.810	133763
Ao	---	90.7	1.612	2778040

Total Area: 3,063,179

HbA1c (NGSP) = 6.0 % HbA1c (IFCC) = 42 mmol/mol

Analysis comments:

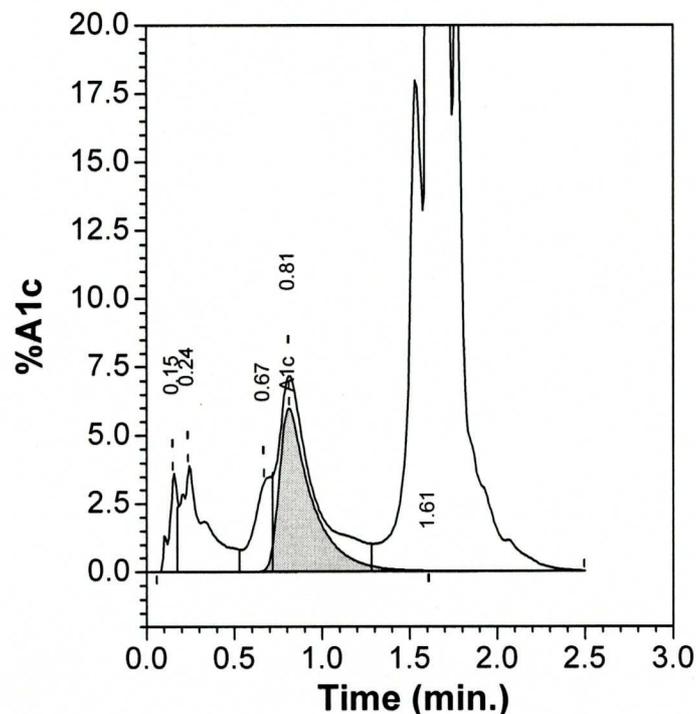


Abb. 1: Beispiel einer HbA1c-Bestimmung durch den Variant II

Eine Niereninsuffizienz kann erhöhte Spiegel an carbamylisiertem Hämoglobin (CHb) verursachen, das zusammen mit labilem HbA1c eluiert. Zur Untersuchung der Auswirkung von carbamylisiertem Hämoglobin auf die Messung von HbA1c mit dem Variant II HbA2/HbA1c Dual Program wurden Erythrozyten mit Kaliumcyanat inkubiert und mit bis zu 2,2 % carbamylisiertem Hämoglobin versetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass carbamylisiertes Hämoglobin in Konzentrationen von ca. 1 % den Assay störend beeinflussen kann. Das labile A1c und das carbamylierte Hämoglobin eluieren gemeinsam in einem Peak unmittelbar vor dem A1c-Peak. Die Fläche dieses als LA1c erfassten Peaks

repräsentiert daher die Summe der Konzentration der beiden Hämoglobinderivate. Bis zu einer Konzentration von 3 % beeinflusst der als LA1c erfasste Peak den HbA1c-Assay nicht.

3.5 Kapillarzonenelektrophorese, Sebia, Capillarys™ 2 Flex Piercing

Das Capillarys™ 2 Flex Piercing System verwendet das Prinzip der Kapillarelektrophorese in freier Lösung. Mit dieser Technik werden geladene Moleküle durch ihre elektrophoretische Beweglichkeit in alkalischem Puffer bei einem spezifischem pH-Wert getrennt. Der Puffer in den Kapillaren wandert durch den elektroosmotischen Fluss, der stärker ist als das elektrische Feld, von der Anode zur Kathode. Der elektroosmotische Fluss entsteht, weil die innere Oberfläche der Kapillare negative Ladungen aufweist, an der sich Kationen (positiv geladene Ionen) anreichern. Wird eine Spannung angelegt, wandern die Kationen zur Kathode und ziehen durch ihre Solvathüllen die gesamte Pufferlösung mit. Daher wandern alle Moleküle, auch die Anionen (negativ geladene Ionen), zur Kathode. Wird eine Proteinlösung in die Kapillare injiziert, wandern die Proteine im zur Kathode gerichteten Pufferstrom und werden je nach Ladung und Mobilität unterschiedlich schnell. Die Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Proteine ist somit unterschiedlich und hängt von folgenden Faktoren ab: Temperatur, Spannung, pH-Wert und Ionenstärke des Puffers, Molekulargewicht und elektrische Ladung der Probe.

Das Capillarys HbA1c-Kit ist auf die Auftrennung und Quantifizierung der HbA1c-Fraktion in menschlichem Vollblut, welches mit EDTA antikoaguliert wird, spezialisiert. Der alkalische Puffer hat hierbei einen pH-Wert von 9,4. Der Capillarys™ 2 Flex Piercing führt den gesamten Vorgang der Probenidentifizierung, Probenverdünnung, Kapillarreinigung, Probeninjektion in die Kapillaren, Migration, Detektion, Verarbeitung der Ergebnisse und Transfer über ein Computer-Netzwerk automatisch durch und erstellt ein vollständiges Hämoglobin-Profil für die quantitative Analyse der HbA1c-Fraktion. Die Hämoglobine werden bei einer Wellenlänge von 415 nm gemessen.

Das Capillarys™ 2 Flex Piercing System besitzt 8 Kapillaren, die parallel arbeiten und acht Analysen gleichzeitig ermöglichen. Die hohe Auflösung erlaubt auch in Anwesenheit von labilem HbA1c, carbamylisiertem Hämoglobin, acetyliertem Hämoglobin

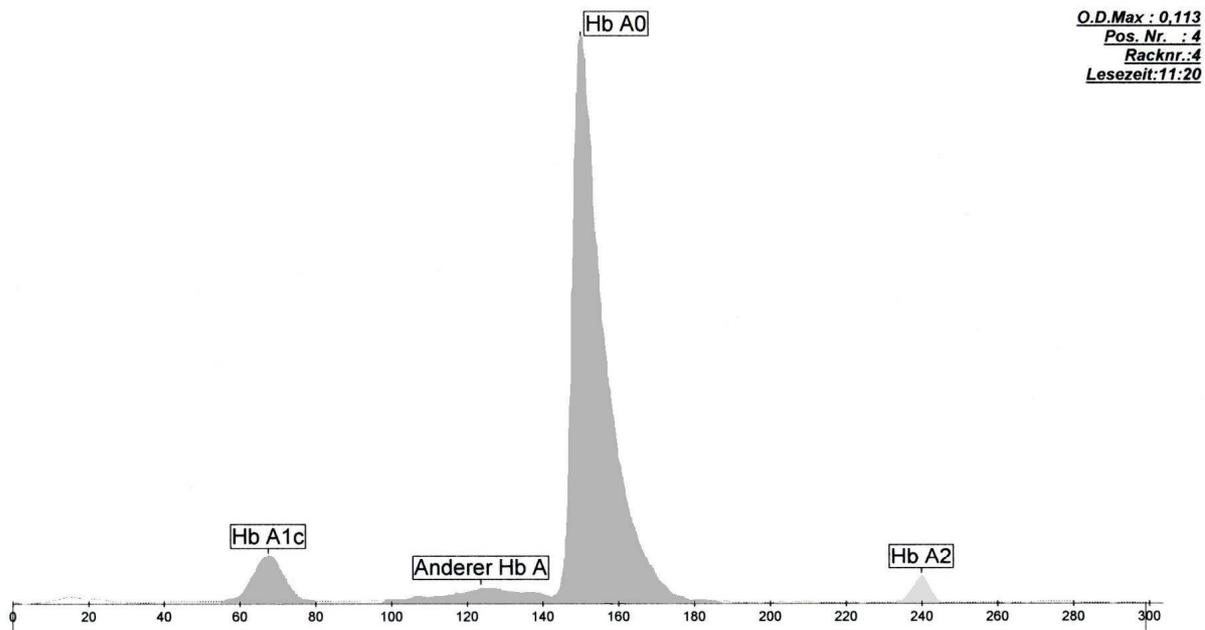
und den wichtigsten Hämoglobinvarianten eine gute Quantifizierung von HbA1c. Der analytische Bereich liegt zwischen 4,0 und 14,7 %.

Das automatisierte System Capillarys wird von der Software „Phoresis“ gesteuert. Jede Analysenart besitzt vorprogrammierte Einstellungen und Zyklen, und die Analyseentwicklung wird kontinuierlich auf dem Bildschirm angezeigt.

Im HbA1c-Kit sind der Puffer, die Hämolyse­lösung, die Waschlösung, die Verdünnungssegmente und Filter enthalten. Der Puffer und die Hämolyse­lösung sollten bei 2 bis 8 Grad Celsius aufbewahrt werden und vor der Anwendung Raumtemperatur erreichen. Der Puffer darf nicht länger als 20 Tage der Raumtemperatur ausgesetzt sein. Die Waschlösung wird mit 750 ml destilliertem Wasser verdünnt, der pH beträgt dann ungefähr 12. Die Verdünnungssegmente sind zur einmaligen Anwendung vorgesehen.

Zur Kalibrierung werden zwei Capillarys Kalibratoren benötigt, der erste für ein normales HbA1c-Level, der zweite für ein erhöhtes HbA1c-Level. Die HbA1c-Konzentration wird in IFCC-Einheiten angegeben (mmol/mol). Das gleiche gilt für die Capillarys Kontrollen.

Präzision: Mittelwert HbA1c (mmol/mol): 32 (VK 3,2 %); 37 (VK 1,8 %); 37 (VK 2,3 %); 42 (VK 1,2 %); 63 (VK 1,7 %); 68 (VK 1,5 %); 84 (VK 1,1 %); 86 (VK 1,2 %)



HbA1c Elektrophorese

Fractions	%	mmol/mol	Cal. %
Hb A1c	-	54	7,1
Anderer Hb A	3,1		
Hb A0	87,8		
Hb A2	2,1		

HbA1c = 7,1 % >

HbA1c = 54 mmol/mol >

eAG = 156,7 mg/dl

Abb. 2: Beispiel einer HbA1c-Bestimmung durch den Capillarys™ 2 Flex Piercing (modifiziert nach Sonja Peter, 2014)

Für den Capillarys™ 2 Flex Piercing wurde keine Interferenz mit carbamylisiertem Hämoglobin ($\leq 8,1$ %) festgestellt.

3.6 TINIA (Turbidimetric Inhibition Immunoassay), Siemens, Dimension RXL Max

Der Dimension RXL Max ist zur Bestimmung von HbA1c im antikoagulierten menschlichen Vollblut geeignet, wobei mit EDTA behandeltes Vollblut empfohlen wird. Es werden sowohl der HbA1c, also auch der Gesamthämoglobinwert gemessen. Die HbA1c Messung basiert auf dem Prinzip eines turbidimetrischen Hemmungs-Immunoassays (TINIA), und die Messung des Gesamthämoglobins basiert auf einer Modifikation der alkalischen Hämatin-Reaktion (Hämatin ist eine Komplexverbindung mit dem Eisen-Ion in der Oxidationsstufe 3 und einem Hydroxid-Ion als axialem Liganden). Aus diesen beiden gemessenen Werten wird der relative Anteil des glykierten Hämoglobins am Gesamt-Hämoglobin berechnet und angegeben. Eine Vorbehandlung zur Entfernung der labilen Fraktion ist nicht notwendig, da nur die umgebildete Form von HbA1c nach der Amadori-Umlagerung gemessen wird. Bei diesem Assay werden alle Hämoglobinvarianten, die an der N-terminalen Gruppe der beta-Kette glykiert sind und identische Epitope haben wie HbA1c, gemessen.

Zur Messung des Gesamthämoglobins wird eine Vollblutprobe in die erste Küvette gegeben, die ein lysierendes Reagenz enthält. Dieses Reagenz löst die roten Blutkörperchen auf und wandelt gleichzeitig das freigesetzte Hämoglobin in ein Derivat mit einem charakteristischen Absorptionsspektrum um. Ein Aliquot des lysierten Vollbluts wird aus der ersten Küvette in eine zweite Küvette übertragen, wo das Gesamthämoglobin bei 405 nm und 700 nm gemessen wird.

Zur Messung des HbA1c wird dasselbe Aliquot des lysierten Vollbluts, das zur Messung des Hämoglobins aus der ersten Küvette in die zweite Küvette übertragen wurde, auch für die Messung des HbA1c verwendet. Die zweite Küvette enthält einen Anti-HbA1c-Antikörper in einem gepufferten Reagenz. Das HbA1c in der Probe reagiert mit dem Anti-HbA1c-Antikörper zu einem löslichen Antigen-Antikörper-Komplex. Dann wird ein Polyhapten-Reagenz mit mehreren HbA1c-Epitopen in die Küvette gegeben. Das Polyhapten reagiert mit überschüssigen freien Anti-HbA1c-Antikörpern zu einem unlöslichen Antikörper-Polyhapten-Komplex. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird durch Trübungsmessung bei 340 nm und Leerwertermittlung bei 700 nm ermittelt und ist umgekehrt proportional zur Konzentration von HbA1c in der Probe.

Das Antikörperreagenz, das bei der HbA1c-Methode zum Einsatz kommt, misst alle glykierten Hämoglobinvarianten, die an der N-terminalen Gruppe der Betakette glykiert sind und identische Epitope haben wie HbA1c (Aminosäuresequenz: Val-His-Leu-Thr). HbS, HbC, HbD und HbE gehören dazu, andere Hämoglobinstörungen können bei diesem Test zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Bei Personen mit erhöhten HbF-Werten sind die Ergebnisse aus diesem Assay unter Umständen niedriger als erwartet, da der Anti-HbA1c-Antikörper glykiertes HbF nicht erkennt.

Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material ist das Qualitätskontrollmaterial. Hierbei handelt es sich um DADE Diabetes, welches für die Überwachung von Glykohämoglobin-Untersuchungen (HbA1c) vorgesehen ist. Mitgeliefertes Material ist das HbA1c-Kit. Es enthält HbA1c Flex-Reagenzkassetten und HbA1c-Kalibrator. Der Kalibrator HbA1c CAL ist ein gefriergetrocknetes Vollbluthämolysat, welches festgelegte Level an HbA1c und Gesamthämoglobin enthält.

Alle Reagenzien sind flüssig und gebrauchsfertig. Das Probengefäß muss 300 bis 500 μ l Vollblut enthalten. Die Aufbewahrung der Reagenzien erfolgt bei 2 bis 8 Grad Celsius. Die Proben bleiben über den nachfolgenden Zeitraum stabil, wenn sie wie folgt gelagert werden: 3 Tage bei 15 bis 25 Grad Celsius, 7 Tage bei 2 bis 8 Grad Celsius oder 4 Monate bei minus 20 Grad Celsius. Probenentnahme, Reagenzzugabe, Mischung und Bearbeitung werden vom klinisch-chemischen Analysensystem Dimension automatisch durchgeführt. Erwartete Werte für HbA1c sind 4,5 bis 6,2 % (24 bis 43 mmol/mol).

Das Dimension-System berechnet ein IFCC-standardisiertes HbA1c-Ergebnis in mmol/mol. Die Hämoglobin und HbA1c-Analytwerte können ohne vorherige Verdünnung oder Vorbehandlung, die nicht Teil des üblichen Analysevorgangs ist, in der Probe direkt ermittelt werden. Hb- und HbA1c-Analytwerte, die außerhalb der unten genannten Bereiche liegen, lösen eine Befundblattmeldung aus, die mit dem berechneten HbA1c-Verhältnis aufgeführt wird. Der analytische Messbereich beträgt für Hämoglobin 5,0 bis 25,0 g/dl (3,1 bis 15,5 mmol/l), für HbA1c 0,3 bis 2,6 g/dl (0,2 bis 1,6 mmol/l) und für das berechnete HbA1c-Verhältnis 3,6 bis 16,0 % (17 bis 151 mmol/mol).

Präzision: Mittelwert HbA1c (%): 5,4 (VK 1,9 %); 6,1 (VK 1,1 %); 8,2 (VK 1,6 %); 11,9 (VK 1,3 %)

Für die in diesem Kit verwendeten Anti-HbA1c-Antikörper wurde keine Kreuzreaktion mit HbA0, HbA1a, HbA1b, acetyliertem Hämoglobin, carbamylisiertem Hämoglobin, glykiertem Hämoglobin und labilem HbA1c festgestellt. Ungenauigkeiten aufgrund dieser Substanzen belaufen sich bei HbA1c-Konzentrationen von 5 % (31 mmol/mol) und 10 % (86 mmol/mol) auf unter 10 %.

3.7 Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Tab. 7: Reagenzien und Verbrauchsmaterialien der Messgeräte

Variant II	<p>Testreagenzien: BioRad, Puffer 1, 270-2501 BioRad, Puffer 2, 270-2502 BioRad, Waschlösung/Verdünnungsreagenz, 270-2503 BioRad, Kalibratorverdünnungsreagenz, 270-2407</p> <p>Testkit: BioRad, Variant II Dual Kit Reorder Pack, 270-2500</p> <p>Kontrollen: BioRad, LYPHOCHEK Diabetes Kontrolle Level 1+2, 740</p> <p>Standards: BioRad, HbA1c-Kalibratorset, 270-2511 BioRad, Vollblutprimer, nicht einzeln erhältlich</p> <p>Verbrauchsmaterialien: BioRad, Analytische Kartusche, 270-2501 BioRad, Vorfilter, 270-0333 BioRad, Probengefäße, 270-2149 Ep T.I.P.S. Standard (2-200 ul) 0030 000.870 Ep T.I.P.S. Standard (50-1000 ul) 0300 000.919</p> <p>Geräte: Eppendorf, Reference (variable), 2-20 ul, 4910 000.034 Eppendorf, Reference (variable), 100-1000 ul, 4910 000.069 Variant II Hemoglobin Testing System (Probengeber-Station, Chromatographie-Station), ZL08009129</p>
Capillarys™ 2 Flex Piercing	<p>Testreagenzien: Puffer, Hämolyselösung, Waschlösung, Verdünnungssegmente, Filter</p> <p>Testkit: PN 2015 Kontrollen: PN 4774 Kalibratoren: PN 4755</p> <p>Geräte: Capillarys 2 FLEX-PIERCING PN 1227 Gefäße für Kontrollen PN 9205 Adapter für Kontrollen PN 9203 Aufbewahrung der Kontrollen PN 2082</p>
Dimension RXL Max	<p>Testreagenzien: Hämolyse-reagenz, Antikörper/Puffer, Polyhapten, Verdünnungsmittel</p> <p>Testkit: DF105A (enthält HbA1c Flex-Reagenzkassetten und HbA1c Kalibrator Level 5)</p> <p>Kalibrator: HbA1c CAL (5 Level)</p>

3.8 Statistische Methoden

Die Ergebnisse der Messungen sind zunächst unter Angabe von Labornummer und Station in Excel-Tabellen übertragen worden. Nachträglich wurden diese Daten durch Angaben aus KAS (für die Studie relevante Diagnosen) und Swisslab (Geburtsdatum, Laborwerte) ergänzt.

Diese Wertetabellen wurden in SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 20, Ehningen, Deutschland) übertragen und folgenden statistischen Untersuchungen unterzogen: Im ersten Schritt sind (für alle gültigen Fälle) für stetige Variablen Anzahl, Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimum, Maximum, Spannweite und Interquartilrange beziehungsweise für nominale Variablen Anzahl und Anzahl in Prozent bestimmt worden.

Zum Vergleich der drei Messmethoden wurden die Wertetabellen in Medcalc übertragen und mit Bland-Altman-Plot und Passing-Bablok-Regression wurden Methodenvergleiche durchgeführt. Ergänzt wurde dieser Methodenvergleich durch die Bestimmung des Spearman-Korrelationskoeffizienten mittels SPSS.

Um Zusammenhänge zwischen HbA1c-Werten in verschiedenen Diagnosegruppen zu untersuchen, wurden der Mann-Whitney-U-Test und der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Um diejenigen Proben zu identifizieren, in welchen die drei Messmethoden eine unterschiedliche Diagnose im Hinblick auf Diabetes mellitus, Prädiabetes und Unauffällig liefern, wurden die HbA1c-Bestimmungen in Excel übertragen und eine Vergleichsanalyse durchgeführt. Via SPSS wurde dann im Kollektiv Prädiabetes versus Unauffällig eine Chi-Quadrat-Testung durchgeführt.

3.8.1 Bland-Altman-Plot

Der Bland-Altman-Plot ist eine graphische Darstellungsmethode für den Vergleich zweier Messmethoden, die eine Beurteilung der Verzerrung und Streuung der Daten berücksichtigt und systematische Abweichungen, Ausreißer sowie Abhängigkeiten der Varianz von der Größe der Messwerte veranschaulicht. In dieser Sonderform eines Punktdiagramms werden die Differenzen der beiden Messmethoden (Y-Achse) gegen

den Mittelwert der beiden Methoden (X-Achse) aufgetragen. Zur leichteren Interpretation werden außerdem drei Linien dargestellt: Der Mittelwert der Differenz, der Mittelwert der Differenz plus $1,96 \times$ Standardabweichung der Differenz und der Mittelwert der Differenz minus $1,96 \times$ Standardabweichung der Differenz. Das Diagramm bietet somit eine optische Beurteilung, wie hoch die Schwankungsbreite der Übereinstimmung ist, ob eine Messmethode prinzipiell höher oder niedriger misst als die andere (systematischer Messfehler) und ob die Abweichung der Methoden von der Höhe der Werte abhängig ist. Es ist eine klinische, aber keine statistische Beurteilung möglich. Die Methoden sind austauschbar, wenn die Differenzen innerhalb der systematischen Abweichung (Bias) $\pm 1,96 \times$ Standardabweichung der Differenzen nicht klinisch relevant sind. Idealerweise ist ein Zusammenhang zwischen Mittelwert und Differenz nicht gegeben (Bland und Altman, 1986).

3.8.2 Passing-Bablok-Regression

Die Passing-Bablok-Regression ist ein spezielles Regressionsverfahren zum Methodenvergleich von zwei Messreihen. Die Verteilung der Messwerte muss dabei nicht unbedingt einer Normalverteilung unterliegen. Anhand eines 95 % Konfidenzintervalls werden die Hypothesen $A = 0$ und $B = 1$ getestet. Enthält das Konfidenzintervall für A den Wert 0, so wird die Hypothese $A = 0$ angenommen. Wird sie verworfen, so ist A signifikant unterschiedlich von 0 und beide Methoden unterscheiden sich. Enthält das Konfidenzintervall für B den Wert 1, so wird die Hypothese $B = 1$ angenommen. Wird sie verworfen, so ist B signifikant unterschiedlich von 1 und es gibt eine proportionale Differenz zwischen beiden Methoden. Außerdem wird ein Test auf Linearität durchgeführt, der untersucht, wie gut ein linearer Zusammenhang der Daten gegeben ist (Passing und Bablok, 1983).

3.8.3 Boxplot

Boxplots dienen zur besseren optischen Darstellung von Median, Perzentilen, Spannweite, Minimum, Maximum und Extremwerten. Ein Boxplot besteht immer aus einem Rechteck, genannt Box, und zwei Linien, die dieses Rechteck verlängern. Diese Linien werden durch einen Strich abgeschlossen. In der Box liegen 50 % der Daten, die Länge der Box entspricht dem Interquartilrange (IQR), der ein Maß für die Streuung der Daten ist. Der Median wird als durchgehender Strich in der Box eingezeichnet. Das IQR

reicht vom 25. bis 75. Perzentil, der letzte Wert innerhalb des Bereichs $1,5 \times \text{IQR}$ ist durch eine quer verlaufende Linie kenntlich gemacht, Werte die außerhalb dieses Bereichs liegen, sind milde Ausreißer (zwischen $1,5 \times \text{IQR}$ und $3 \times \text{IQR}$, dargestellt als Punkte) bzw. extreme Ausreißer (über $3 \times \text{IQR}$, dargestellt als Sternchen).

3.8.4 Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test

Der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben ist ein nichtparametrischer Test zur Überprüfung, ob die zentrale Tendenz von zwei verschiedenen Stichproben unterschiedlich ist. Die abhängige Variable muss dabei nicht normalverteilt, aber mindestens ordinalskaliert sein. Es handelt sich um einen Rangsummentest, es wird angenommen, dass sich die Daten in einer gemeinsamen Rangreihe gleichmäßig verteilen, wenn sich die zentrale Tendenz zweier Rangreihen nicht unterscheiden. Am häufigsten wird dieser Test angewendet, um Mittelwertsunterschiede zu untersuchen. Ist der resultierende P-Wert kleiner 0,05, wird von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Medianen ausgegangen (Mann und Whitney, 1947).

Der Kruskal-Wallis-Test ähnelt dem Mann-Whitney-U-Test und basiert ebenfalls auf Rangplatzsummen. Er kann allerdings für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden (Kruskal und Wallis, 1952).

3.8.5 Spearmans-Rho

Sind die Variablen nicht normalverteilt, kann der Grad des Zusammenhangs zwischen den Variablen mit einem Rangkorrelationskoeffizienten untersucht werden. Der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient benötigt nicht die Annahme, dass die Beziehung zwischen den Variablen linear ist, außerdem ist er robust gegenüber Ausreißern. Der Korrelationskoeffizient r wird dabei folgendermaßen interpretiert: Je näher r an 0 liegt, desto schwächer ist die Korrelation, je näher r an ± 1 liegt, desto stärker ist die Korrelation. Eine hohe Korrelation ist nicht gleichbedeutend mit einer hohen Übereinstimmung. Der Signifikanzwert p zeigt, wie wahrscheinlich die Nullhypothese (Korrelation gleich null) ist. Je kleiner p , desto weniger wahrscheinlich trifft sie zu und sollte verworfen werden. Hierbei werden 5 % (0,05) als Grenze gesetzt (Spearman, 1904).

3.8.6 Chi-Quadrat-Test

Der Chi-Quadrat-Test überprüft Häufigkeitsverteilungen, also ob zwei Variablen auf nominalem Skalenniveau vollkommen unabhängig voneinander verteilt sind oder ob ein Zusammenhang zwischen den Variablen besteht. Nach Erstellung einer Kreuztabelle werden bei der Berechnung für jedes Feld der Tabelle die quadrierten Abweichungen der erwarteten von den tatsächlichen Häufigkeiten durch die erwarteten Häufigkeiten dividiert. Ein großer Chi-Quadrat-Wert ist mit großen Abweichungen verbunden und deutet auf einen Zusammenhang zwischen beiden Variablen hin.

4. Ergebnisse

4.1 Messungen des HbA1c am gesamten Patientenkollektiv

Tab. 8: Ergebnisse der HbA1c-Messung bei nephrologischen Patienten und Routineeinsendungen, Angaben in Prozent

	Capillarys Nephrologie	Capillarys Routine	Variant Nephrologie	Variant Routine	RXL Nephrologie	RXL Routine
Anzahl	405	217	405	217	406	217
Mittelwert	5,6	6	5,6	5,9	5,6	5,8
Median	5,5	5,7	5,4	5,6	5,5	5,5
Standardabweichung	0,9	1,1	0,9	1,2	0,9	1,2
Minimum	4,1	4,7	3,7	4,4	4	4,4
Maximum	11,8	11,5	12,4	12	12,2	11,9
Spannweite	7,7	6,8	8,7	7,6	8,2	7,5
Interquartilsrange	0,8	0,9	0,9	1	0,9	0,9

Im Kollektiv der insgesamt 407 nephrologischen Patienten ergibt sich bei allen Messmethoden für die HbA1c-Bestimmung ein Mittelwert von 5,6 % mit einer Standardabweichung von 0,9 %. Die größte Spannweite weisen die Messergebnisse des Variant II auf. Im Kollektiv der 217 Routineeinsendungen liegen Mittelwert, Standardabweichung und die Perzentile höher, die größte Spannweite weisen ebenfalls die Messergebnisse des Variant II auf. Die HbA1c-Werte liegen somit bei den Routineproben in allen drei Bestimmungsmethoden höher als bei den nephrologischen Proben. Am deutlichsten fällt dieser Unterschied beim CapillarysTM 2 Flex Piercing und beim Variant II auf, weniger ausgeprägt ist er beim Dimension RXL Max.

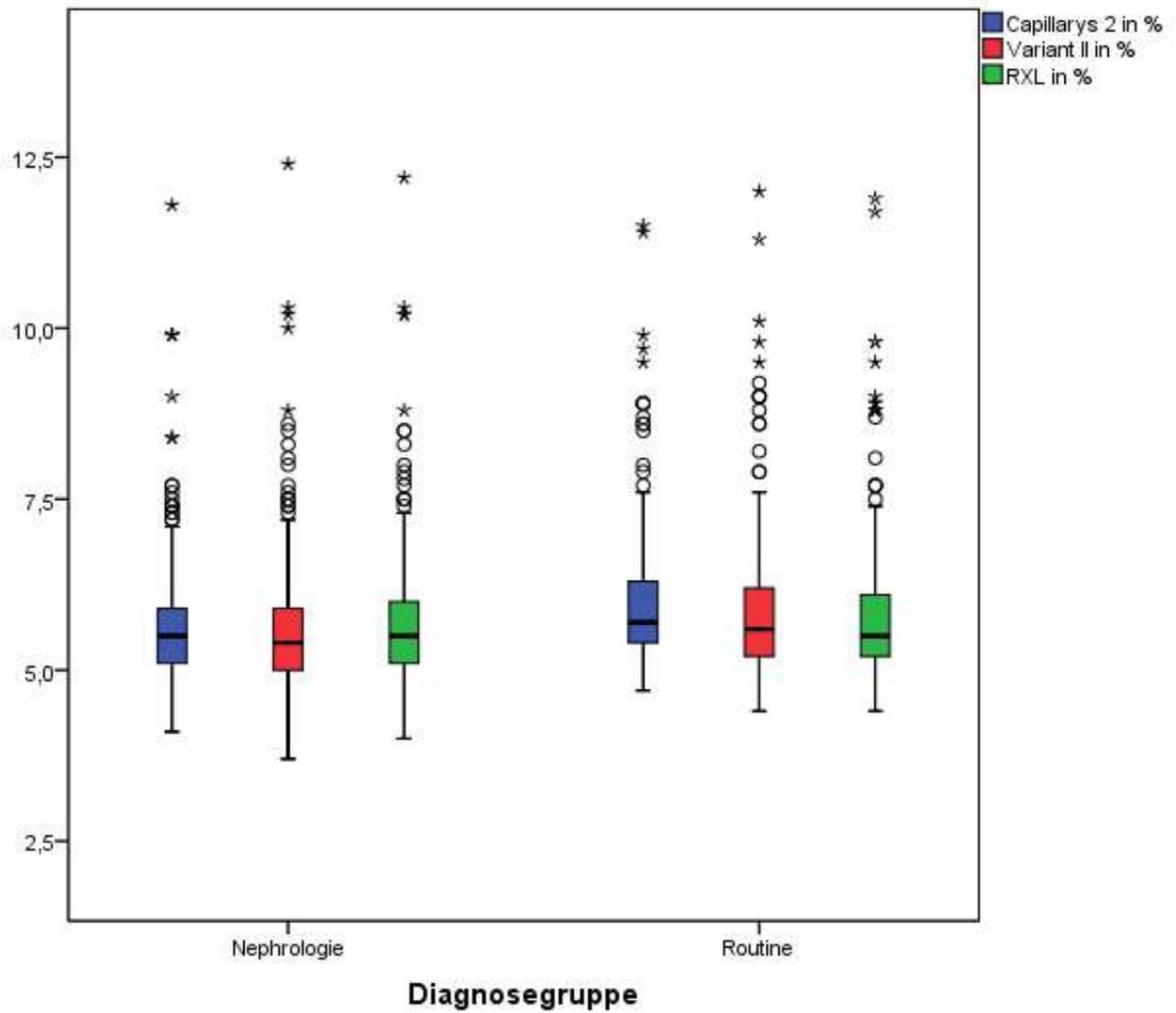


Abb. 3: Messungen der HbA1c-Werte am Capillarys™ 2 Flex Piercing, Variant II und Dimension RXL Max, Darstellung von nephrologischen Patienten und Routinepatienten als Boxplot

In der Darstellung der Messergebnisse des Capillarys™ 2 Flex Piercing (Sebia, Kapillaronenelektrophorese) als Boxplot fallen die extremen Ausreißer nach oben in beiden Diagnosegruppen auf. Das Interquartilrange (IQR) zwischen dem 25 und 75 % Perzentil liegt für die nephrologischen Patienten zwischen 5,1 und 5,9 %, für die Routinepatienten liegt das IQR zwischen 5,4 und 6,3 %. Deutlich erkennbar ist, dass bei den Routineproben Mittelwert, Minimum und Maximum sichtbar höher liegen als bei den nephrologischen Proben.

In der Darstellung der Messergebnisse des Variant II (Biorad, High Performance Liquid Chromatography) als Boxplot fallen ebenfalls die extremen Ausreißer nach oben in beiden Diagnosegruppen auf. Das Interquartilrange (IQR) zwischen dem 25 und 75 % Perzentil liegt für die nephrologischen Patienten zwischen 5,0 und 5,9 %, für die Routinepatienten liegt das IQR zwischen 5,2 und 6,2 %. Deutlich erkennbar ist, dass bei den Routineproben Mittelwert, Minimum und Maximum sichtbar höher liegen als bei den nephrologischen Proben.

Auch in der Darstellung der Messergebnisse des Dimension RXL Max (Siemens, Immunologische Messmethode) als Boxplot fallen die extremen Ausreißer nach oben in beiden Diagnosegruppen auf. Das Interquartilrange (IQR) zwischen dem 25 und 75 % Perzentil liegt für die nephrologischen Patienten zwischen 5,1 und 6,0 %, für die Routinepatienten liegt das IQR zwischen 5,2 und 6,1 %. Bei den Routineproben liegen Mittelwert, Minimum und Maximum in einem ähnlichen Bereich wie die Werte der nephrologischen Proben.

4.2 Vergleiche der drei Messmethoden im Kollektiv der nephrologischen Patienten und der Routinepatienten

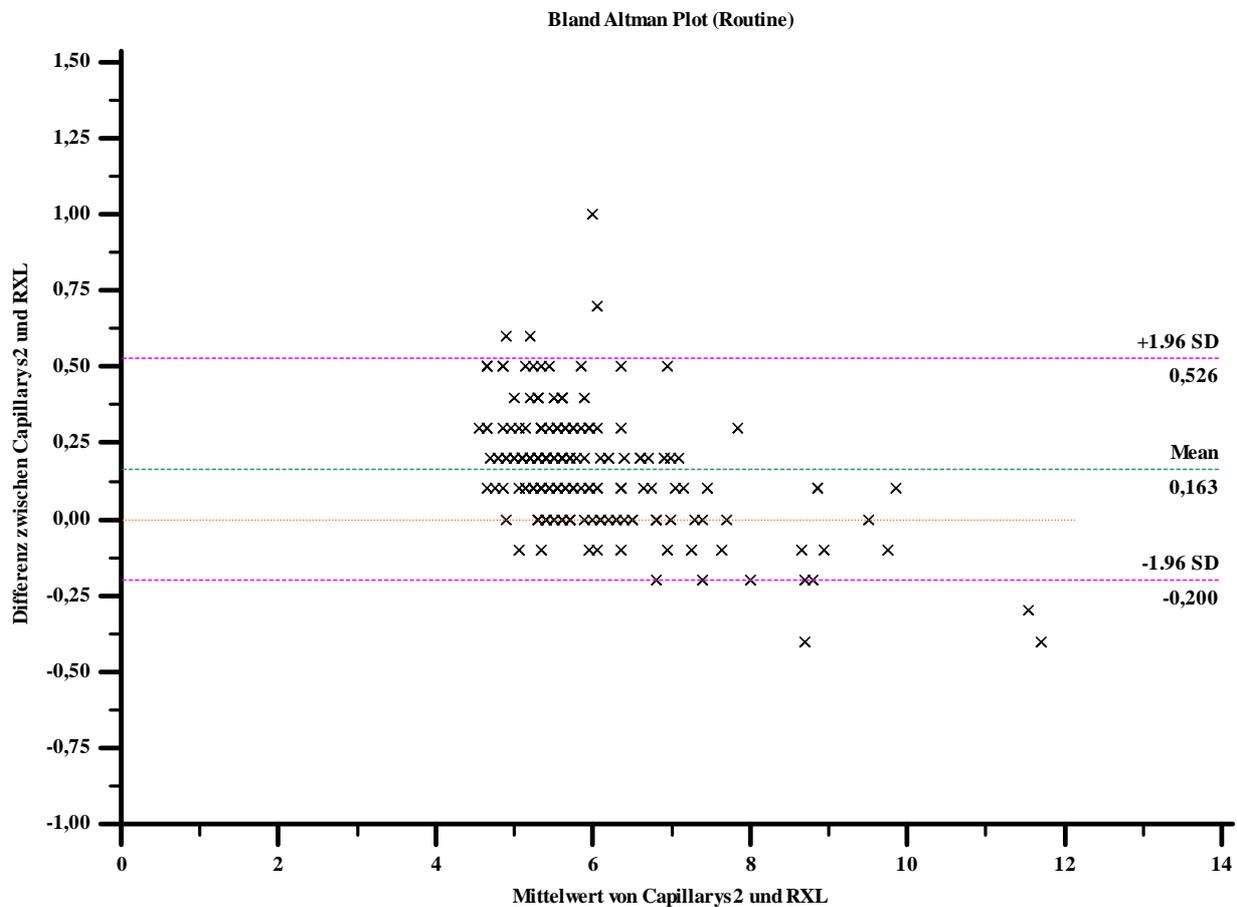


Abb. 4a: Bland Altman Plot zum Methodenvergleich von Capillarys™ 2 Flex Piercing und Dimension RXL Max bei Routineproben; Angaben in Prozent

In dieser Darstellung ist ein Zusammenhang zwischen Höhe der Mittelwerte und der Differenzen erkennbar. Je höher die Mittelwerte der beiden Methoden, desto niedriger fällt die Differenz zwischen beiden Methoden aus. Außerdem ist erkennbar, dass der Capillarys™ 2 Flex Piercing durchschnittlich um 0,163 % höher misst als der Dimension RXL Max.

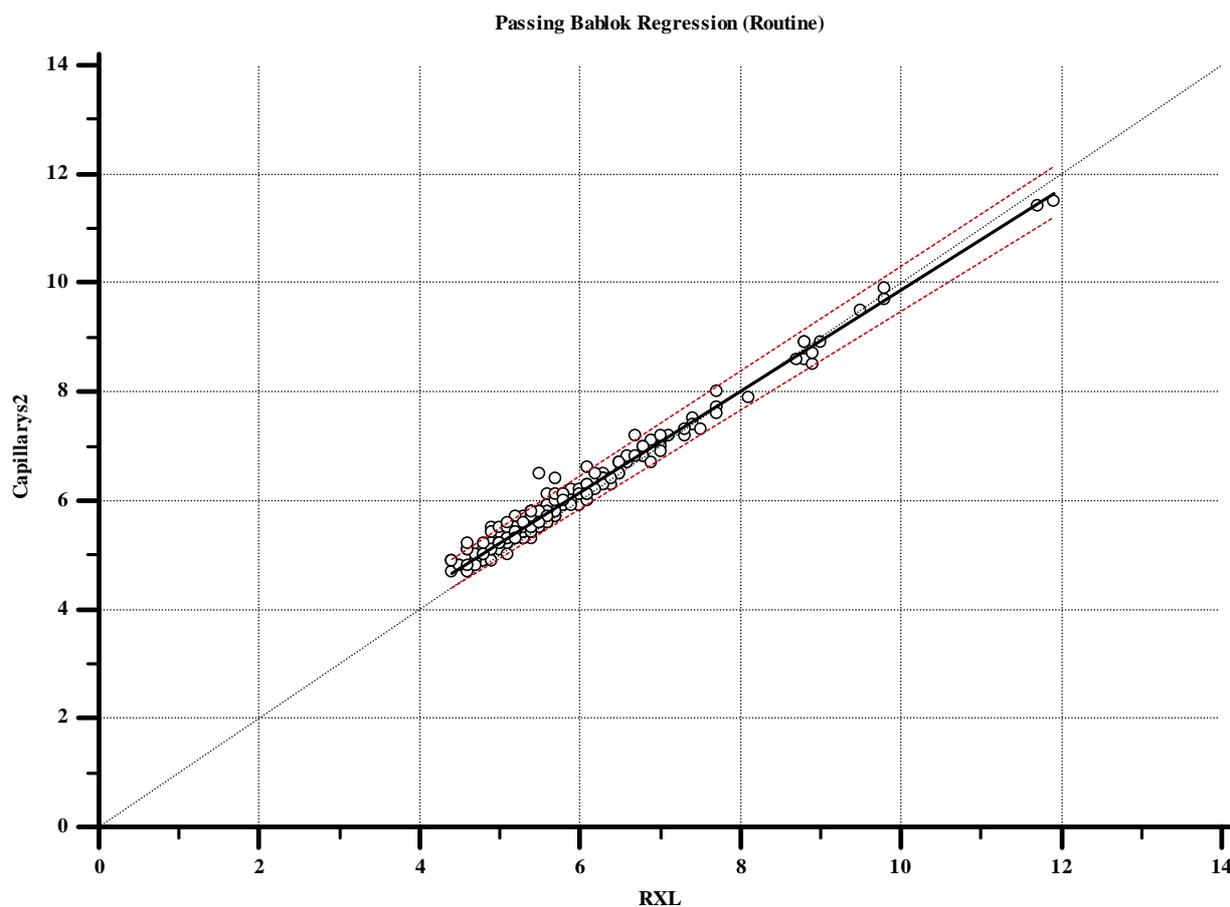


Abb. 4b: Passing Bablok Regression zum Methodenvergleich von Capillarys™ 2 Flex Piercing und Dimension RXL Max bei Routineproben, Angaben in Prozent

Das Regressionsverfahren nach Passing Bablok ergibt für das 217 Patientenproben umfassende Kollektiv $Y = 0,54 + 0,93 x$ als Regressionsgerade. Die beiden hier verglichenen Messmethoden (Capillarys™ 2 Flex Piercing gegen Dimension RXL Max) unterscheiden sich signifikant um eine konstante Menge und es ist von einer proportionalen Differenz der Methoden auszugehen, da die Hypothesen $A = 0$ und $B = 1$ verworfen werden müssen. Da der Test auf Linearität $p > 0,10$ ergibt, liegt keine signifikante Abweichung von Linearität vor. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt eine gute Korrelation mit $r = 0,964$ und ist mit $p < 0,001$ signifikant.

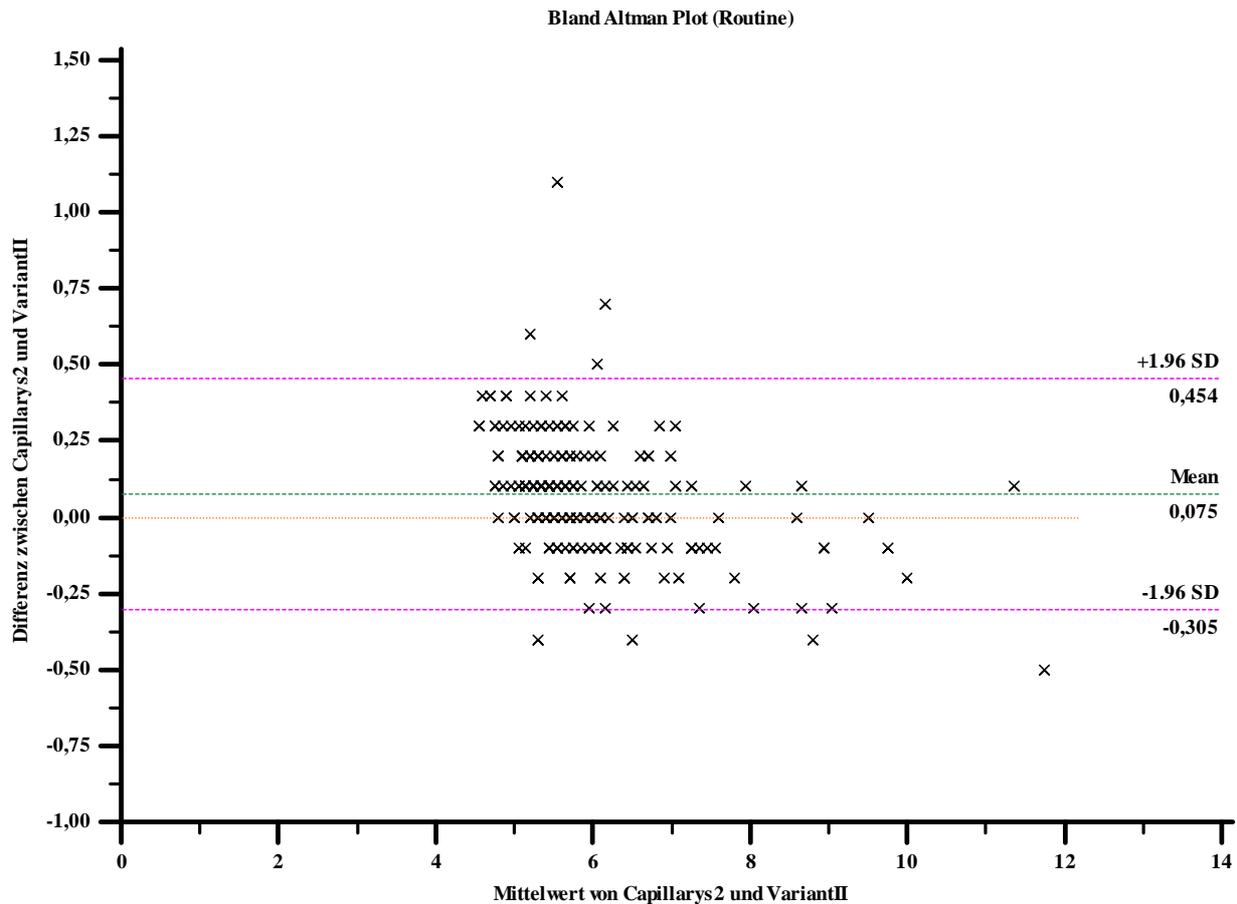


Abb. 5a: Bland Altman Plot zum Methodenvergleich von Capillars™ 2 Flex Piercing und Variant II bei Routineproben, Angaben in Prozent

In dieser Darstellung ist ein Zusammenhang zwischen Höhe der Mittelwerte und der Differenzen erkennbar. Je höher die Mittelwerte der beiden Methoden, desto niedriger fällt die Differenz zwischen beiden Methoden aus. Außerdem ist erkennbar, dass der Capillars™ 2 Flex Piercing durchschnittlich um 0,075 % höher misst als der Variant II.

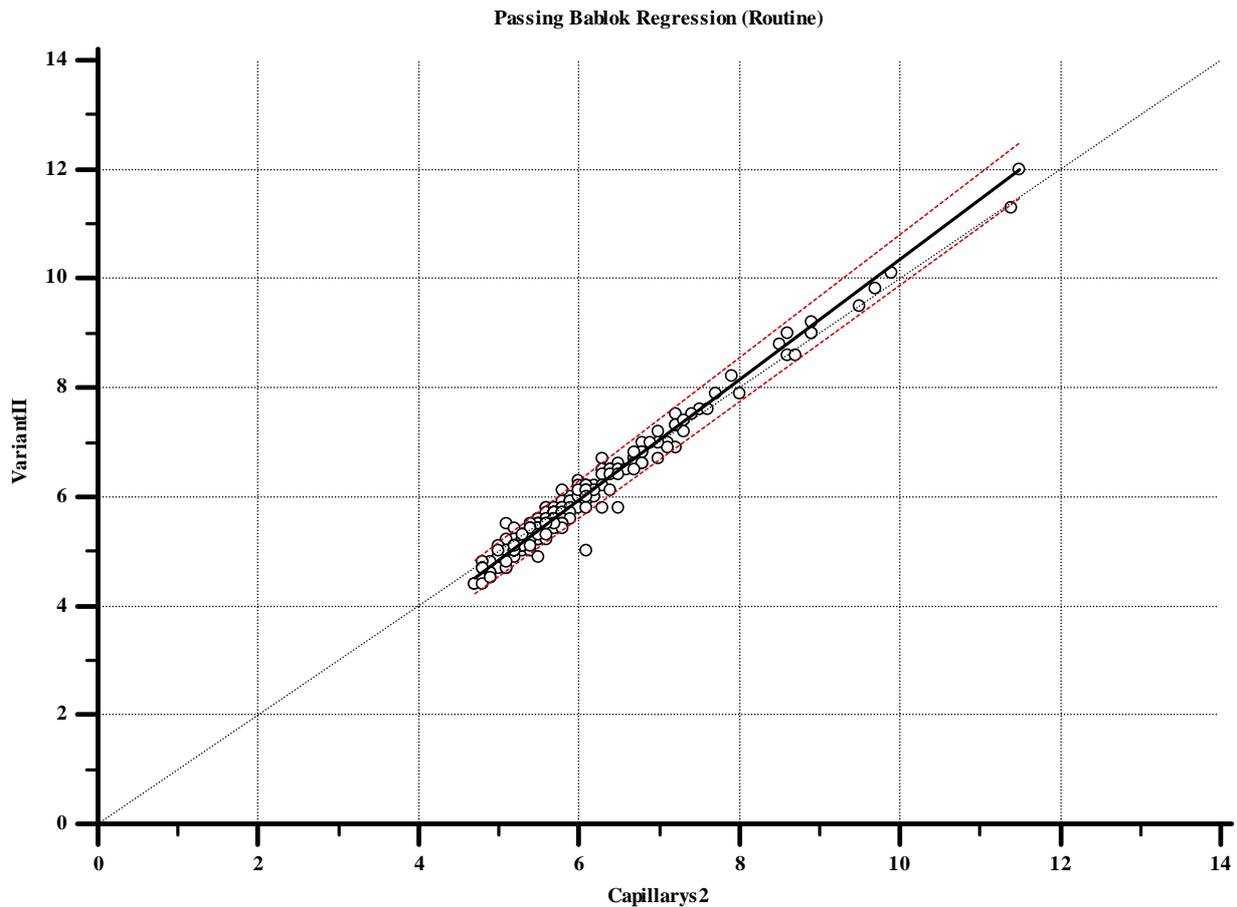


Abb. 5b: Passing Bablok Regression zum Methodenvergleich von CapillaryTM 2 Flex Piercing und Variant II bei Routineproben, Angaben in Prozent

Das Regressionsverfahren nach Passing Bablok ergibt für das 217 Patientenproben umfassende Kollektiv $Y = -0,63 + 1,10 x$ als Regressionsgerade. Die beiden hier verglichenen Messmethoden (Variant II gegen CapillaryTM 2 Flex Piercing) unterscheiden sich signifikant um eine konstante Menge und es ist von einer proportionalen Differenz der Methoden auszugehen, da die Hypothesen $A = 0$ und $B = 1$ verworfen werden müssen. Da der Test auf Linearität $p > 0,10$ ergibt, liegt keine signifikante Abweichung von Linearität vor. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt eine gute Korrelation mit $r = 0,958$ und ist mit $p < 0,001$ signifikant.

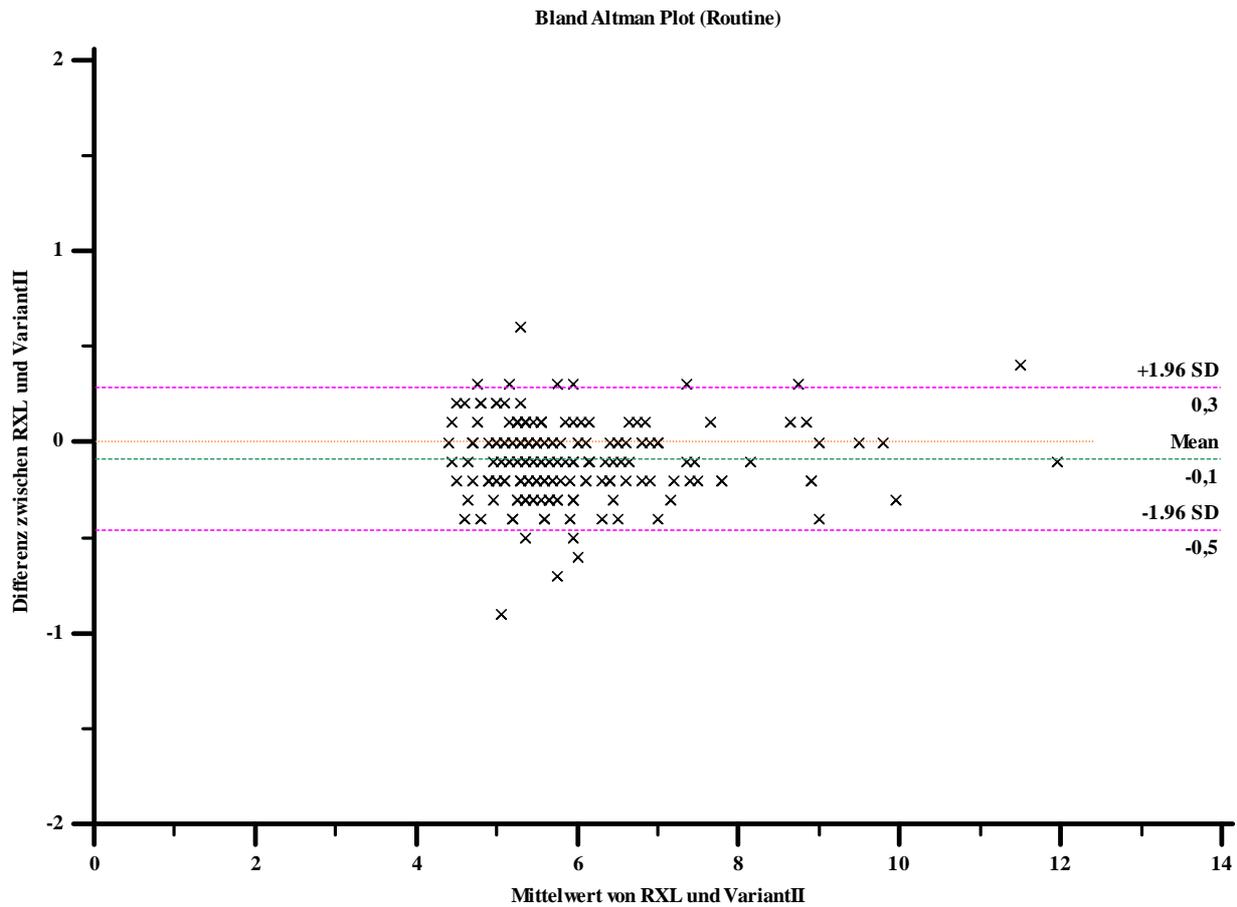


Abb. 6a: Bland Altman Plot zum Methodenvergleich von Dimension RXL Max und Variant II bei Routineproben, Angaben in Prozent

In dieser Darstellung ist erkennbar, dass der Dimension RXL Max um -0,1 % niedriger misst als der Variant II. Ein Zusammenhang zwischen Höhe der Mittelwerte und der Differenzen ist nicht ersichtlich.

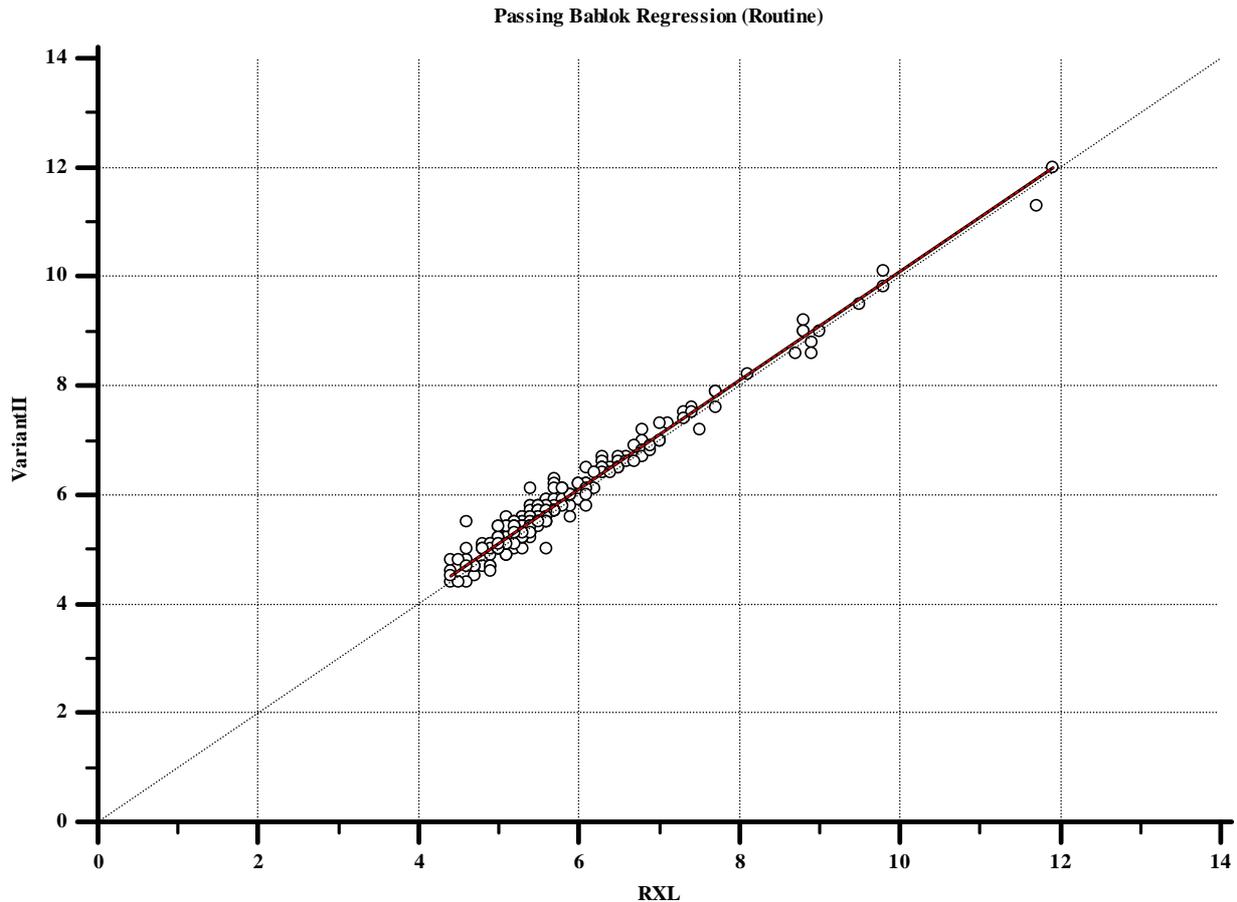


Abb. 6b: Passing Bablok Regression zum Methodenvergleich von Dimension RXL Max und Variant II bei Routineproben, Angaben in Prozent

Das Regressionsverfahren nach Passing Bablok ergibt für das 217 Patientenproben umfassende Kollektiv $Y = 0,10 + 1,00 x$ als Regressionsgerade. Die beiden hier verglichenen Messmethoden (Variant II gegen Dimension RXL Max) unterscheiden sich signifikant um eine konstante Menge, da die Hypothese $A = 0$ verworfen werden muss. Es ist von keiner proportionalen Differenz der Methoden auszugehen, da die Hypothese $B = 1$ angenommen wird. Da der Test auf Linearität $p < 0,05$ ergibt, liegt eine signifikante Abweichung von Linearität vor. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt eine gute Korrelation mit $r = 0,951$ und ist mit $p < 0,001$ signifikant.

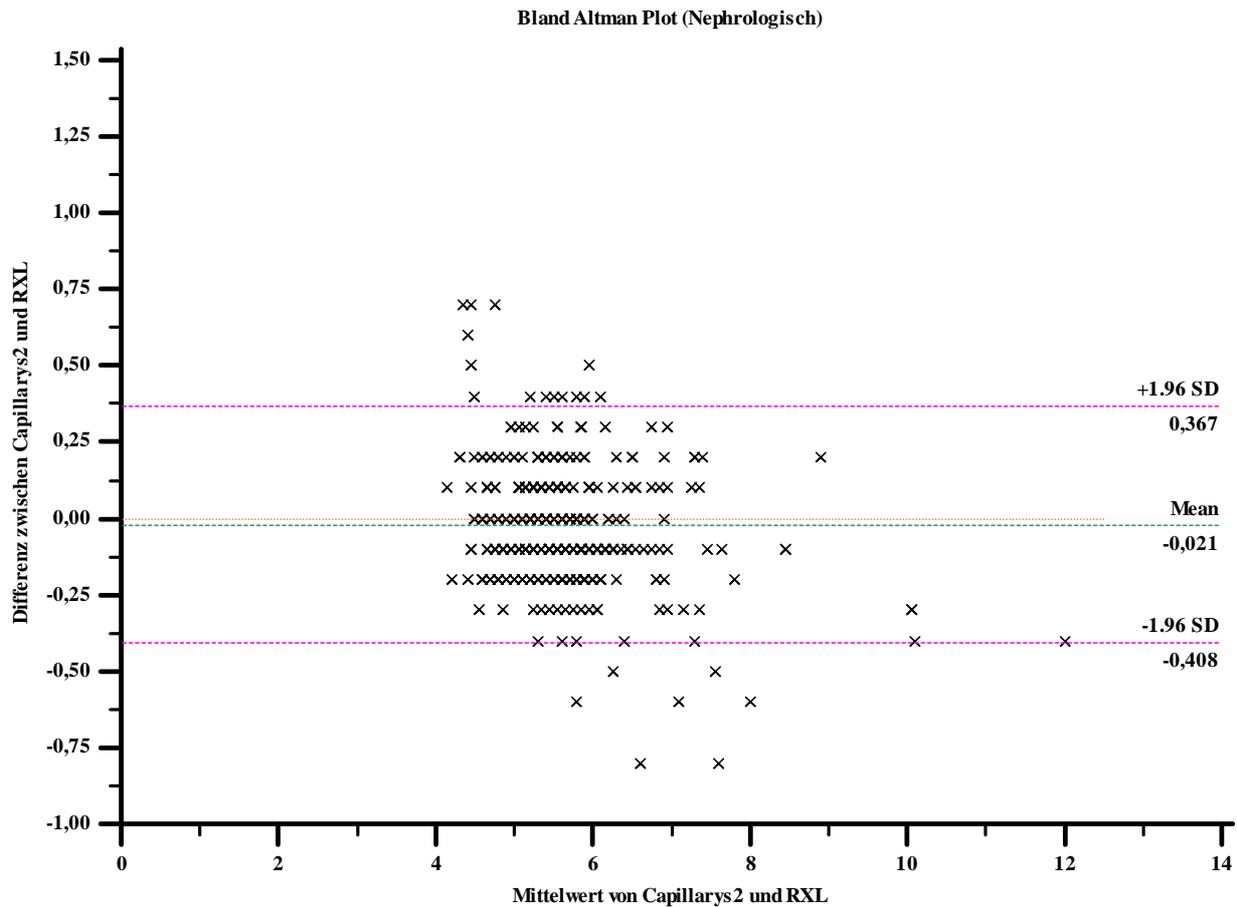


Abb. 7a: Bland Altman Plot zum Methodenvergleich von CapillarsTM 2 Flex Piercing und Dimension RXL Max bei nephrologischen Proben, Angaben in Prozent

In dieser Darstellung ist erkennbar, dass der CapillarsTM 2 Flex Piercing um -0,021 % niedriger misst als der Dimension RXL Max. Ein Zusammenhang zwischen Höhe der Mittelwerte und der Differenzen ist nicht ersichtlich.

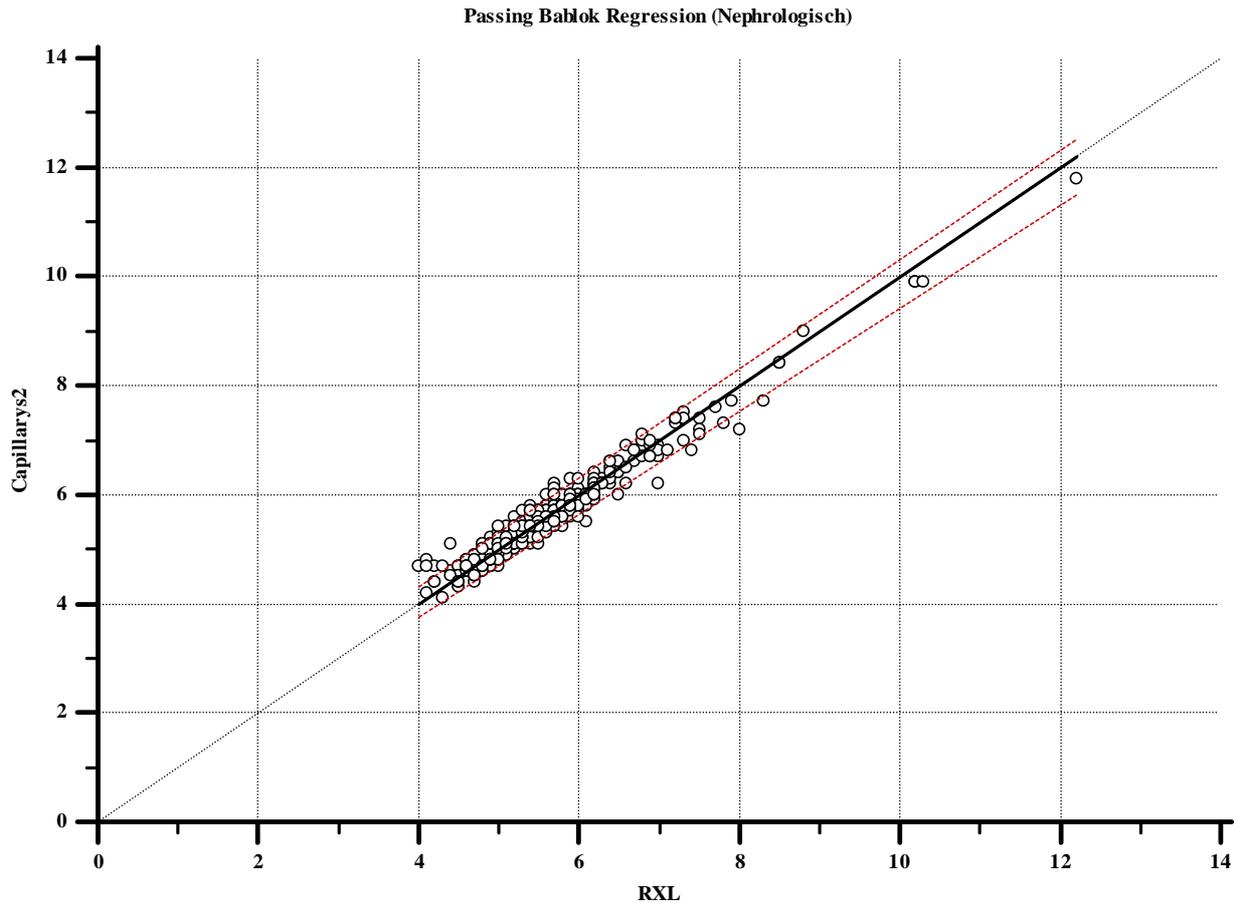


Abb. 7b: Passing Bablok Regression zum Methodenvergleich von CapillaryTM 2 Flex Piercing Capillary 2 und Dimension RXL Max bei nephrologischen Proben, Angaben in Prozent

Das Regressionsverfahren nach Passing Bablok ergibt für das 404 Patientenproben umfassende Kollektiv $Y = 6,11 \cdot 10^{-15} + 1,00 \cdot x$ als Regressionsgerade. Die beiden hier verglichenen Messmethoden (CapillaryTM 2 Flex Piercing gegen Dimension RXL Max) unterscheiden sich nicht signifikant um eine konstante Menge, da die Hypothese $A = 0$ beibehalten wird. Es ist von keiner proportionalen Differenz der Methoden auszugehen, da die Hypothese $B = 1$ angenommen wird. Da der Test auf Linearität $p < 0,01$ ergibt, liegt eine signifikante Abweichung von Linearität vor. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt eine gute Korrelation mit $r = 0,961$ und ist mit $p < 0,001$ signifikant.

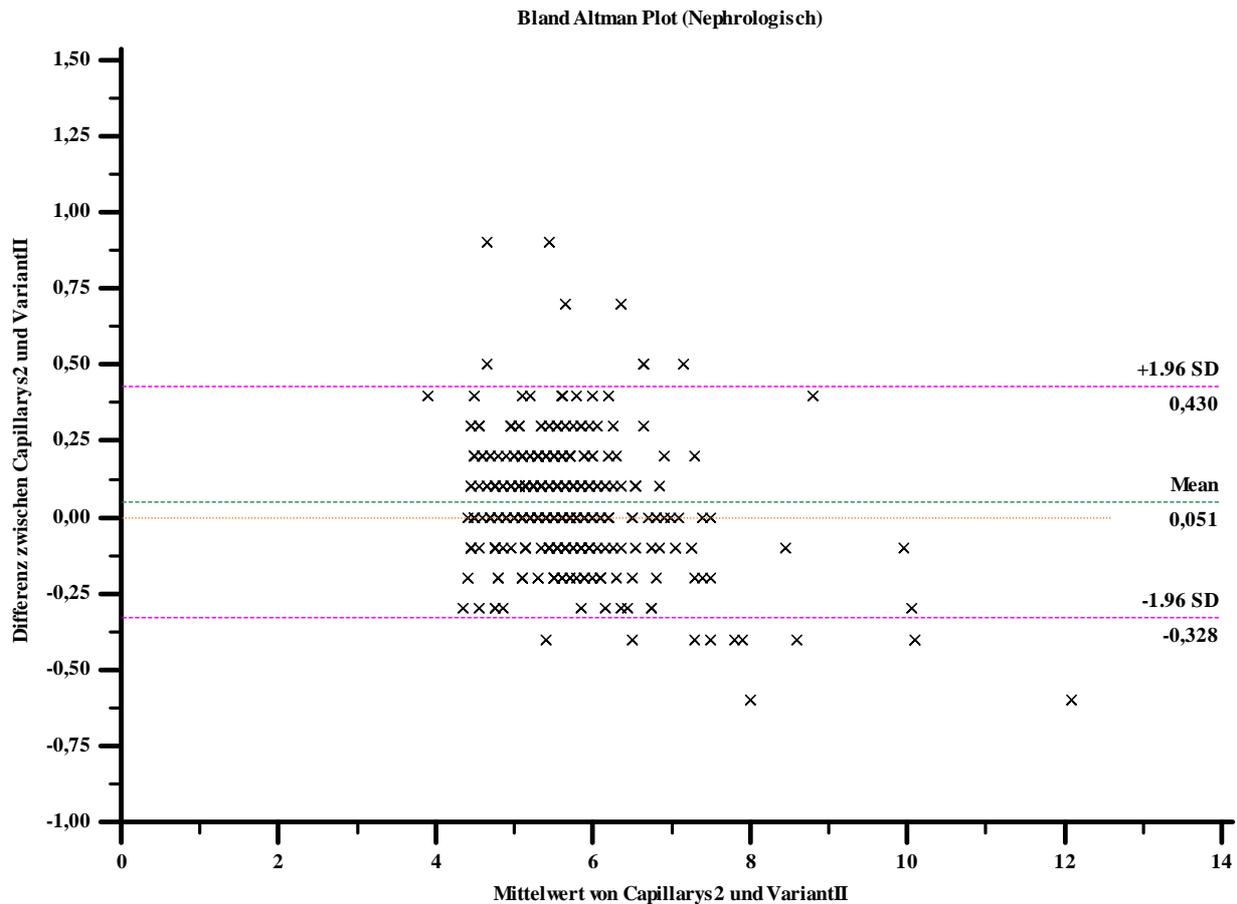


Abb. 8a: Bland Altman Plot zum Methodenvergleich von Capillarys™ 2 Flex Piercing und Variant II bei nephrologischen Proben, Angaben in Prozent

In dieser Darstellung ist erkennbar, dass der Capillarys™ 2 Flex Piercing um 0,051 % höher misst als der Variant II. Ein Zusammenhang zwischen Höhe der Mittelwerte und der Differenzen ist nicht ersichtlich.

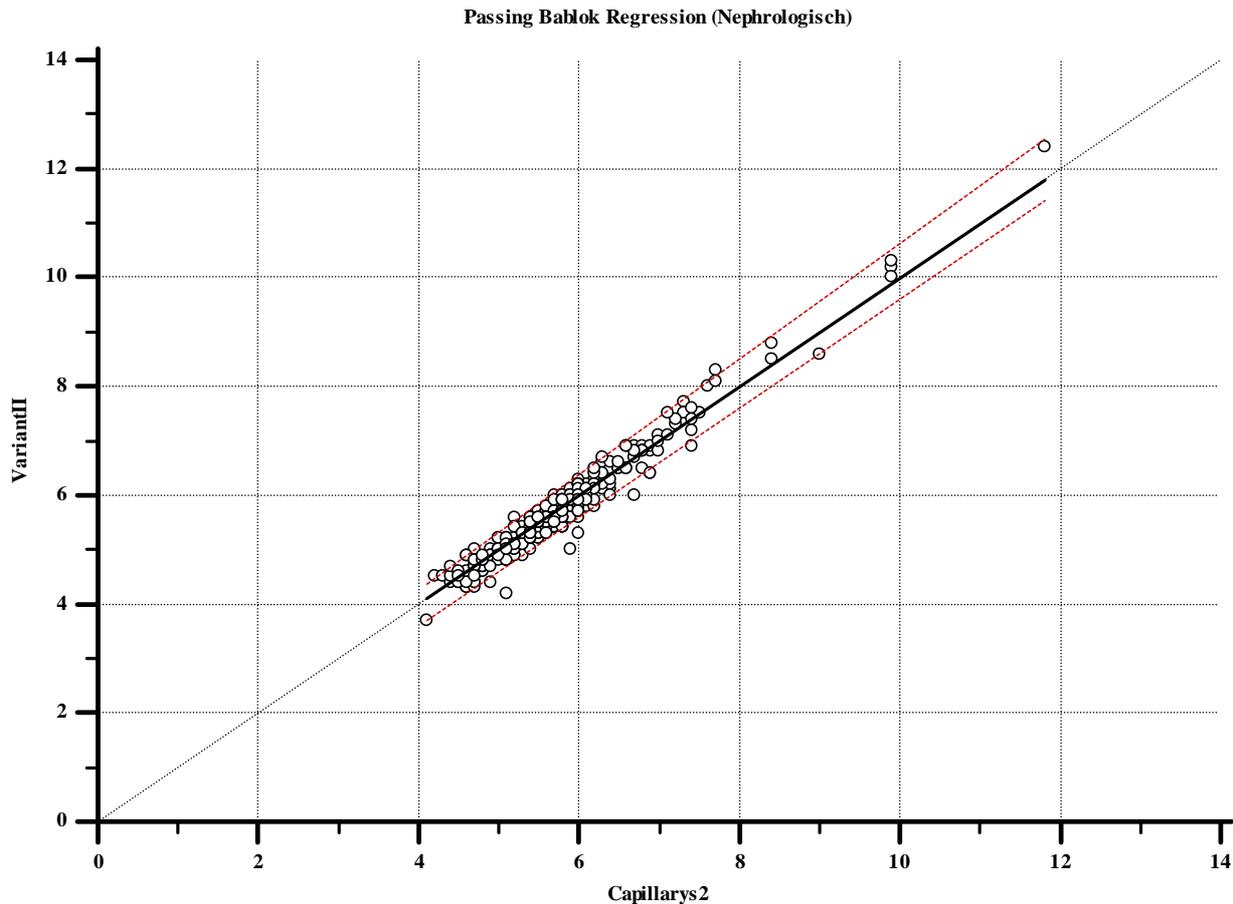


Abb. 8b: Passing Bablok Regression zum Methodenvergleich von Capillarys™ 2 Flex Piercing und Variant II bei nephrologischen Proben, Angaben in Prozent

Das Regressionsverfahren nach Passing Bablok ergibt für das 405 Patientenproben umfassende Kollektiv $Y = -0,00 + 1,00 x$ als Regressionsgerade. Die beiden hier verglichenen Messmethoden (Variant II gegen Capillarys™ 2 Flex Piercing) unterscheiden sich nicht signifikant um eine konstante Menge, da die Hypothese $A = 0$ beibehalten wird. Es ist von keiner proportionalen Differenz der Methoden auszugehen, da die Hypothese $B = 1$ angenommen wird. Da der Test auf Linearität $p < 0,01$ ergibt, liegt eine signifikante Abweichung von Linearität vor. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt eine gute Korrelation mit $r = 0,960$ und ist mit $p < 0,001$ signifikant.

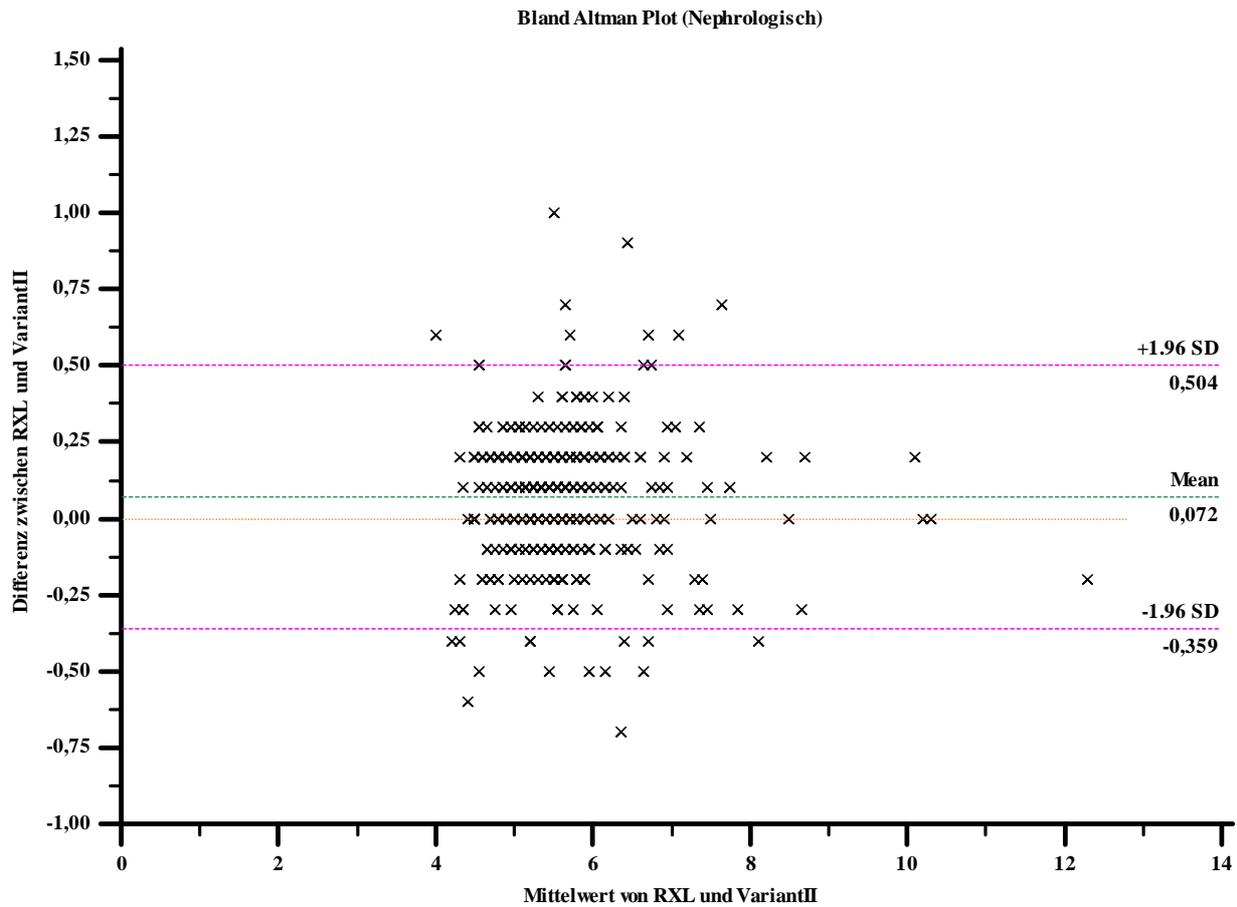


Abb. 9a: Bland Altman Plot zum Methodenvergleich von Dimension RXL Max und Variant II bei nephrologischen Proben, Angaben in Prozent

In dieser Darstellung ist erkennbar, dass der Dimension RXL Max um 0,072 % höher misst als der Variant II. Ein Zusammenhang zwischen Höhe der Mittelwerte und der Differenzen ist nicht ersichtlich.

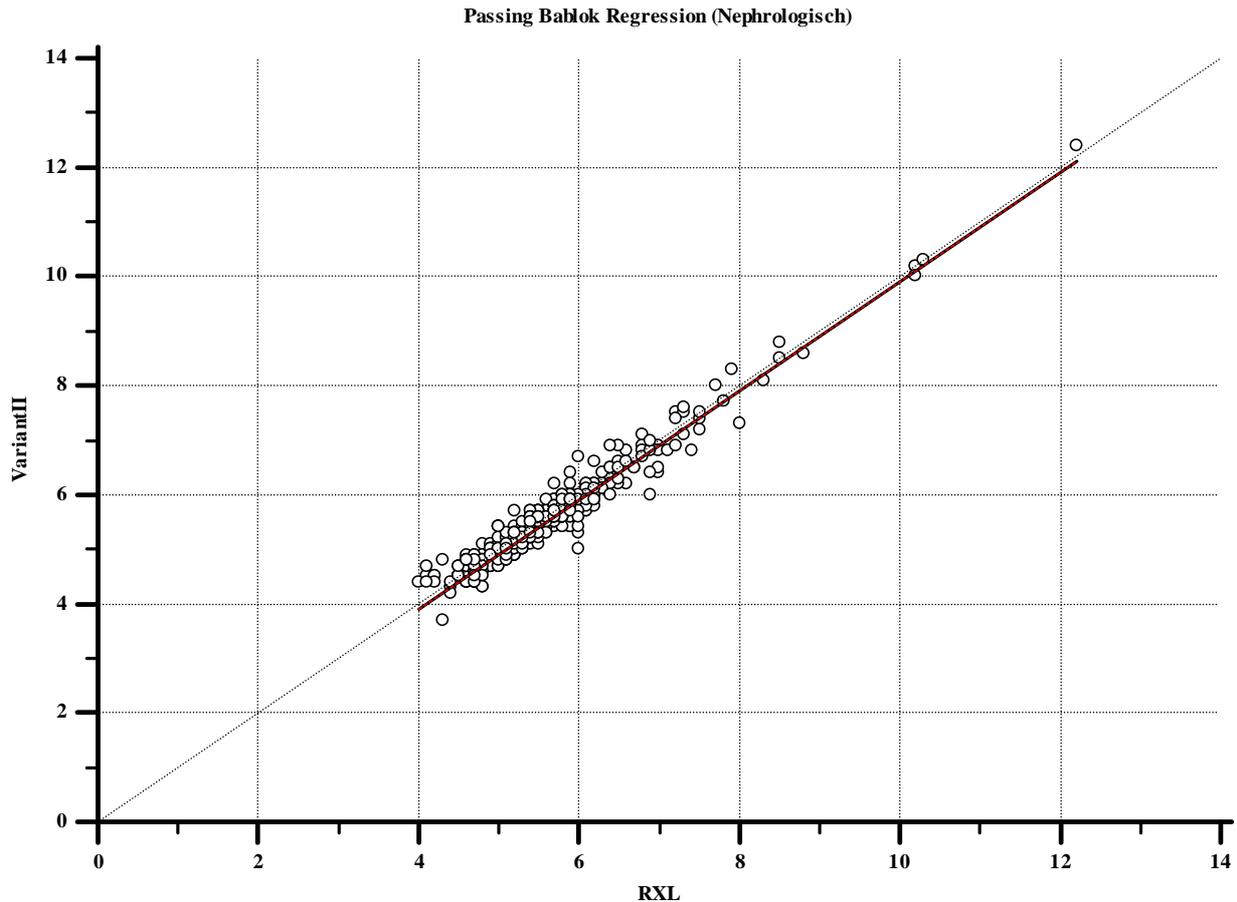


Abb. 9b: Passing Bablok Regression zum Methodenvergleich von Dimension RXL Max und Variant II bei nephrologischen Proben, Angaben in Prozent

Das Regressionsverfahren nach Passing Bablok ergibt für das 404 Patientenproben umfassende Kollektiv $Y = -0,10 + 1,00 \cdot x$ als Regressionsgerade. Die beiden hier verglichenen Messmethoden (Variant II gegen Dimension RXL Max) unterscheiden sich signifikant um eine konstante Menge, da die Hypothese $A = 0$ verworfen wird. Es ist von keiner proportionalen Differenz der Methoden auszugehen, da die Hypothese $B = 1$ angenommen wird. Da der Test auf Linearität $p > 0,05$ ergibt, liegt keine signifikante Abweichung von Linearität vor. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient zeigt eine gute Korrelation mit $r = 0,949$ und ist mit $p < 0,001$ signifikant.

4.3 Darstellung der HbA1c-Werte in ausgewählten Diagnosegruppen

4.3.1 Akutes Nierenversagen (ANV)

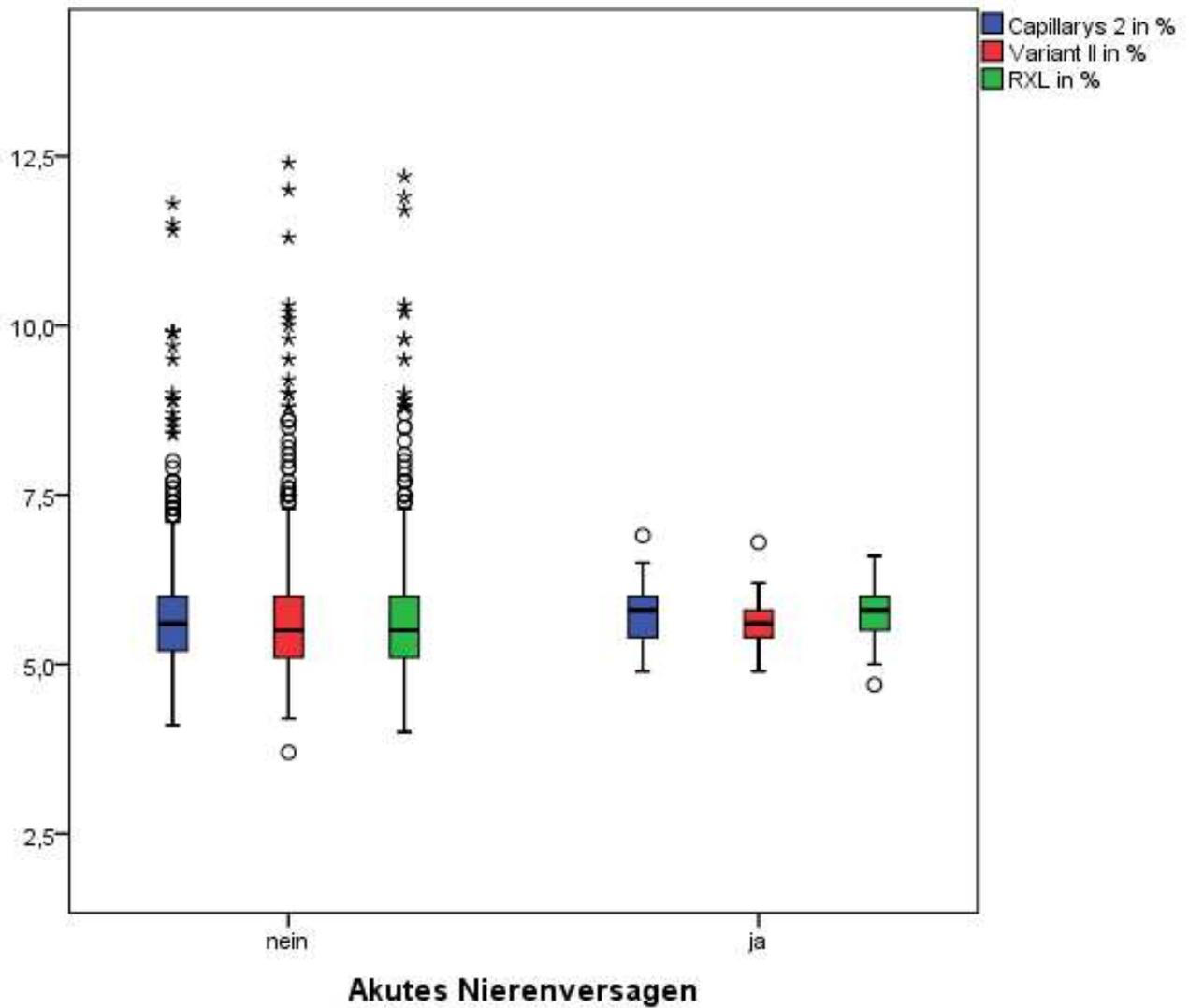


Abb. 10: Messungen der HbA1c-Werte am CapillaryTM 2 Flex Piercing, Variant II und Dimension RXL Max, Darstellung von Patienten mit und ohne Diagnose „akutes Nierenversagen“ als Boxplot

Tab. 9: Ergebnisse der HbA1c-Messung bei akutem Nierenversagen (ANV), Angaben in Prozent

	Capillarys ohne ANV	Capillarys mit ANV	Variant ohne ANV	Variant mit ANV	RXL ohne ANV	RXL mit ANV
Anzahl	577	45	577	45	578	45
Mittelwert	5,8	5,7	5,7	5,6	5,7	5,7
Median	5,6	5,8	5,5	5,6	5,5	5,8
Standardabweichung	1	0,5	1,1	0,4	1	0,4
Minimum	4,1	4,9	3,7	4,9	4	4,7
Maximum	11,8	6,9	12,4	6,8	12,2	6,6
Spannweite	7,7	2	8,7	1,9	8,2	1,9
Interquartilrange	0,8	0,6	0,9	0,4	0,9	0,5

Die Durchführung des Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben ergibt für den CapillarysTM 2 Flex Piercing $p = 0,136$ und für den Variant II $p = 0,145$. Damit wird eine gleiche Verteilung angenommen. Für den RXL hingegen wird keine gleiche Verteilung angenommen, da $p = 0,014$.

4.3.2 Chronische Niereninsuffizienz (CNI)

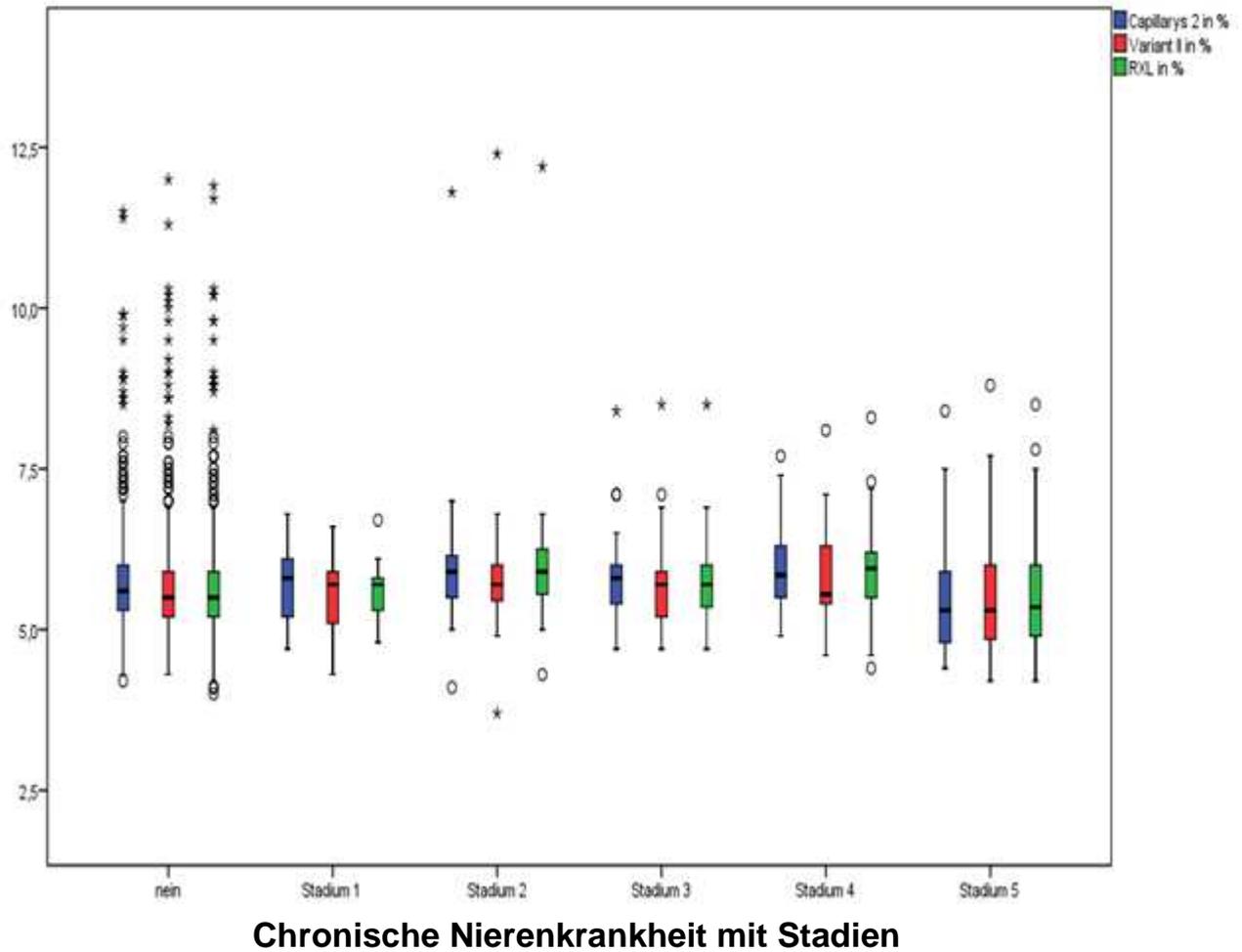


Abb. 11: Messungen der HbA1c-Werte am CapillaryTM 2 Flex Piercing, Variant II und Dimension RXL Max, Darstellung von Patienten mit und ohne Diagnose „chronische Nierenerkrankung“ in 5 Stadien als Boxplot

Tab. 10: Ergebnisse der HbA1c-Messung bei chronischer Niereninsuffizienz (CNI) in fünf Stadien, Angaben in Prozent

Capillarys 2	Keine CNI	CNI Stadium 1	CNI Stadium 2	CNI Stadium 3	CNI Stadium 4	CNI Stadium 5
Anzahl	383	9	19	51	18	141
Mittelwert	5,8	5,7	6,1	5,8	6	5,5
Median	5,6	5,8	5,9	5,8	5,9	5,3
Standardabweichung	1	0,6	1,5	0,6	0,8	0,8
Minimum	4,2	4,7	4,1	4,7	4,9	4,4
Maximum	11,5	6,8	11,8	8,4	7,7	8,4
Spannweite	7,3	2,1	7,7	3,7	2,8	4
Interquartilsrange	0,7	0,9	0,9	0,6	0,9	1,1

Variant II	Keine CNI	CNI Stadium 1	CNI Stadium 2	CNI Stadium 3	CNI Stadium 4	CNI Stadium 5
Anzahl	383	9	19	51	18	141
Mittelwert	5,8	5,5	6	5,7	5,9	5,5
Median	5,5	5,7	5,7	5,7	5,6	5,3
Standardabweichung	1,1	0,7	1,7	0,6	0,9	0,8
Minimum	4,3	4,3	3,7	4,7	4,6	4,2
Maximum	12	6,6	12,4	8,5	8,1	8,8
Spannweite	7,7	2,3	8,7	3,8	3,5	4,6
Interquartilsrange	0,7	1	0,7	0,7	1	1,2

RXL	Keine CNI	CNI Stadium 1	CNI Stadium 2	CNI Stadium 3	CNI Stadium 4	CNI Stadium 5
Anzahl	383	9	19	51	19	141
Mittelwert	5,7	5,6	6,1	5,7	6	5,5
Median	5,5	5,7	5,9	5,7	5,9	5,4
Standardabweichung	1,1	0,6	1,6	0,6	0,9	0,8
Minimum	4	4,8	4,3	4,7	4,4	4,2
Maximum	11,9	6,7	12,2	8,5	8,3	8,5
Spannweite	7,9	1,9	7,9	3,8	3,9	4,3
Interquartilsrange	0,7	0,6	0,8	0,7	0,7	1,1

Die Durchführung des Kruskal-Wallis-Test unabhängiger Stichproben ergibt für den Capillarys™ 2 Flex Piercing $p = 0,001$, für den Variant II $p = 0,048$ und für den RXL $p = 0,009$. Damit ist von keiner gleichen Verteilung auszugehen.

4.3.3 Nierenersatztherapie (Net)

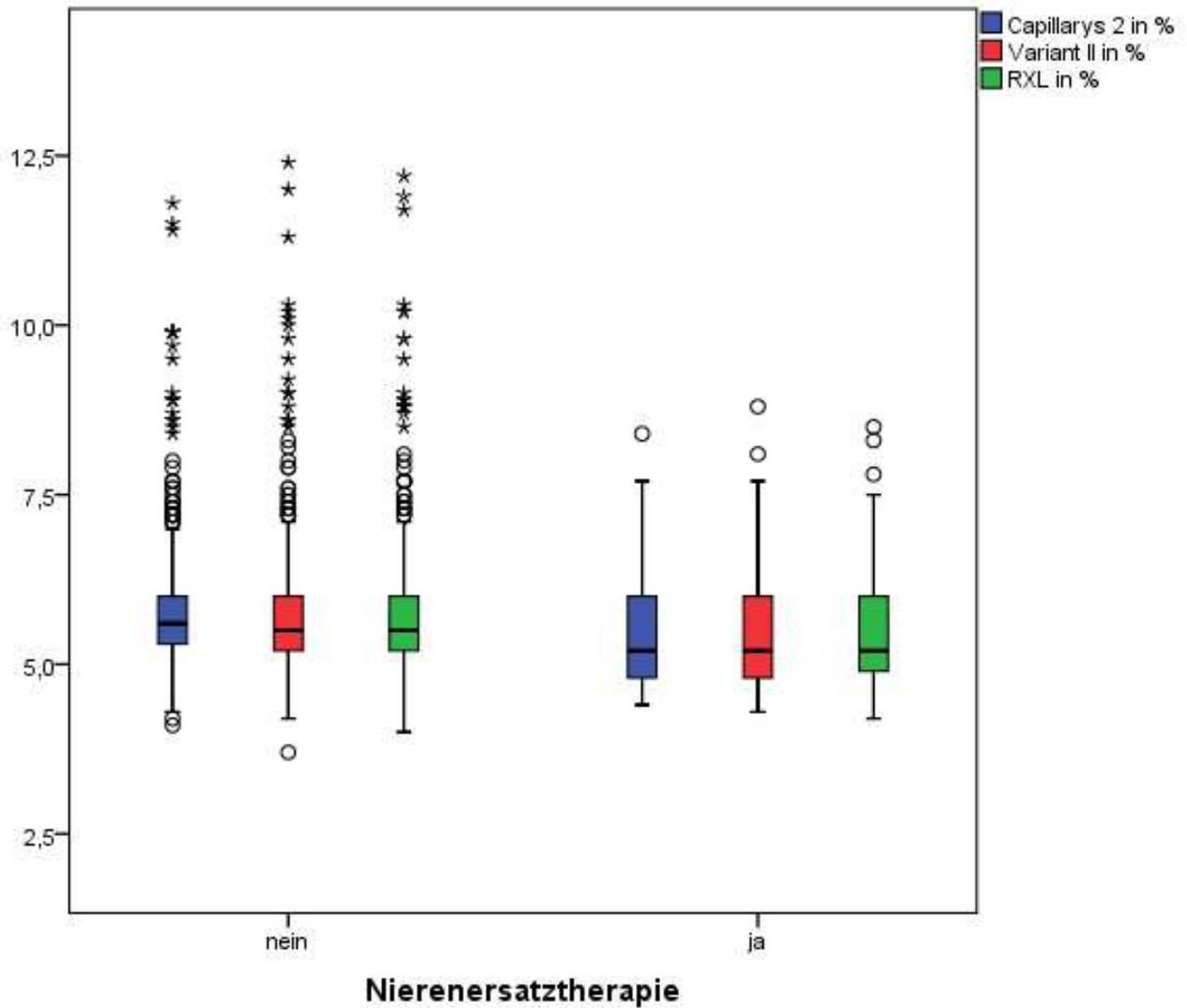


Abb. 12: Messungen der HbA1c-Werte am CapillaryTM 2 Flex Piercing, Variant II und Dimension RXL Max, Darstellung von Patienten mit und ohne Nierenersatztherapie als Boxplot

Tab. 11: Ergebnisse der HbA1c-Messung bei Nierenersatztherapie, Angaben in Prozent

	Capillarys ohne Nieren- ersatz- therapie	Capillarys mit Nieren- ersatz- therapie	Variant ohne Nieren- ersatz- therapie	Variant mit Nieren- ersatz- therapie	RXL ohne Nieren- ersatz- therapie	RXL mit Nieren- ersatz- therapie
Anzahl	496	126	496	126	498	125
Mittelwert	5,8	5,5	5,8	5,5	5,8	5,5
Median	5,6	5,2	5,5	5,2	5,5	5,2
Standardabweichung	1	0,8	1	0,9	1	0,9
Minimum	4,1	4,4	3,7	4,3	4	4,2
Maximum	11,8	8,4	12,4	8,8	12,2	8,5
Spannweite	7,7	4	8,7	4,5	8,2	4,3
Interquartilrange	0,7	1,2	0,8	1,2	0,8	1,1

Die Durchführung des Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben ergibt für den CapillarysTM 2 Flex Piercing $p = 0,000$, für den Variant II $p = 0,000$ und für den RXL $p = 0,002$. Damit ist von keiner gleichen Verteilung auszugehen.

4.3.4 Nierentransplantation (Ntx)

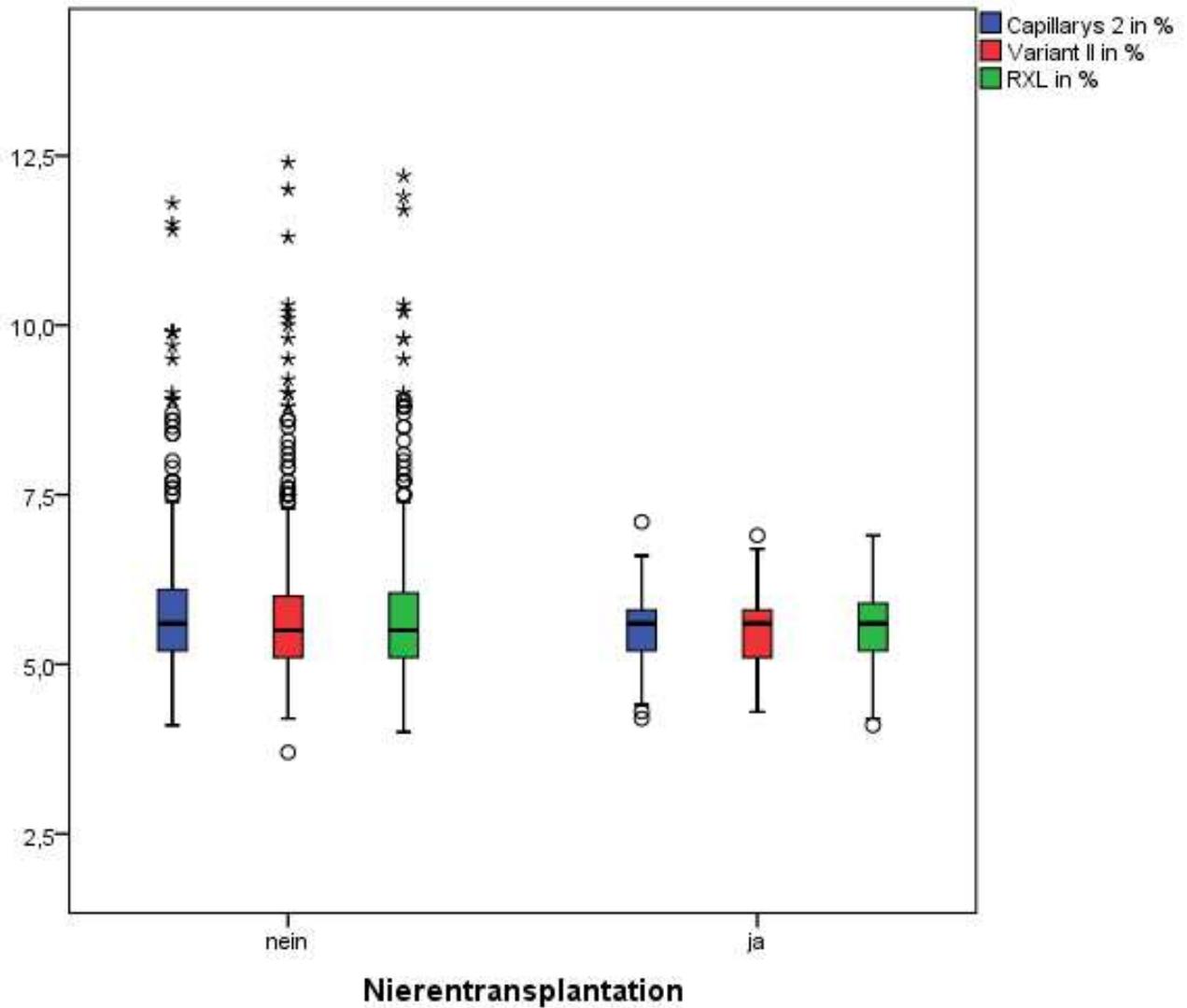


Abb. 13: Messungen der HbA1c-Werte am CapillaryTM 2 Flex Piercing, Variant II und Dimension RXL Max, Darstellung von Patienten mit und ohne Nierentransplantation als Boxplot

Tab. 12: Ergebnisse der HbA1c-Messung bei Nierentransplantation (Ntx), Angaben in Prozent

	Capillarys ohne Nierentransplantation	Capillarys mit Nierentransplantation	Variant ohne Nierentransplantation	Variant mit Nierentransplantation	RXL ohne Nierentransplantation	RXL mit Nierentransplantation
Anzahl	512	110	512	110	511	112
Mittelwert	5,8	5,5	5,8	5,4	5,8	5,5
Median	5,6	5,6	5,5	5,6	5,5	5,6
Standardabweichung	1	0,6	1,1	0,6	1,1	0,6
Minimum	4,1	4,2	3,7	4,3	4	4,1
Maximum	11,8	7,1	12,4	6,9	12,2	6,9
Spannweite	7,7	2,9	8,7	2,6	8,2	2,8
Interquartilrange	0,9	0,6	0,9	0,8	1	0,7

Die Durchführung des Mann-Whitney-U-Test unabhängiger Stichproben ergibt für den Capillarys™ 2 Flex Piercing $p = 0,054$, für den Variant II $p = 0,28$ und für den RXL $p = 0,597$. Damit wird eine gleiche Verteilung angenommen.

4.3.5 Hämoglobin

Bei der Betrachtung der Hämoglobinwerte und der HbA1c-Werte am Capillarys™ 2 Flex Piercing, Variant II und Dimension RXL Max im Hinblick auf eine statistische Signifikanz ergibt sich kein relevanter Zusammenhang. Für den Capillarys™ 2 Flex Piercing ($N = 597$) ist der p-Wert mit $0,035$ signifikant, allerdings lässt der Korrelationskoeffizient $r = 0,086$ kaum eine Aussage zu. Für den Variant II ($N = 597$) ist der p-Wert mit $0,178$ nicht signifikant, wobei $r = 0,055$ ist. Auch für den RXL ($N = 598$) ist der p-Wert mit $0,717$ nicht signifikant, hier ist $r = 0,015$.

4.4 Zusammenhang zwischen Blood Urea Nitrogen-Konzentration und HbA1c bei Nierenkranken

Um zu untersuchen, ob zwischen der Höhe der Blood Urea Nitrogen (BUN)-Konzentration und den mit den verschiedenen Messmethoden ermittelten HbA1c-Werten ein Zusammenhang besteht, wurde bei $N = 233$ Proben aus dem Kollektiv der Nierenkranken das BUN bestimmt. Die erste Gruppe mit einer BUN-Konzentration < 80

mg/dl beinhaltet N = 131 Proben, die zweite Gruppe mit einer BUN-Konzentration ≥ 80 mg/dl beinhaltet N = 102 Proben. Diesem im Vergleich zum Gesamtkollektiv der Nierenkranken (N = 407) niedrige Anteil an BUN-Bestimmungen (N = 233) liegt die jeweilige Laboranforderung zugrunde, denn nicht bei jeder Patientenprobe ist die BUN-Bestimmung im elektronischen Formular zeitgleich mit angefordert worden.

Tab. 13: Demographische Daten des Kollektivs Blood Urea Nitrogen-Bestimmung bei Nierenkranken (SD steht für Standardabweichung bzw. Standard Deviation, N steht für die jeweilige Anzahl der Proben)

	Blood Urea Nitrogen-Konzentration < 80 mg/dl	Blood Urea Nitrogen-Konzentration ≥ 80 mg/dl	p-Wert
Anzahl	131	102	
Männliches Geschlecht (%)	70/131 (53,4)	78/102 (76,5)	
Alter in Jahren (SD)	43 \pm 23,11 (N=131)	60 \pm 16,63 (N=102)	0,000
Nierenersatztherapie (%)	11/131 (8,4)	43/102 (42,2)	
Chronische Nierenkrankheit (%)			
Stadium 1	5/130 (3,8)	0/102 (0)	
Stadium 2	9/130 (6,9)	3/102 (2,9)	
Stadium 3	12/130 (9,2)	21/102 (20,6)	
Stadium 4	1/130 (0,8)	10/102 (9,8)	
Stadium 5	23/130 (17,7)	46/102 (45,1)	
Akutes Nierenversagen (%)	8/131 (6,1)	18/102 (17,6)	
Anämie (%)	23/131 (17,6)	56/102 (54,9)	
Transfusion von Vollblut oder Erythrozytenkonzentrat (%)	25/131 (19,1)	37/102 (36,3)	
Nierentransplantation (%)	25/131 (19,1)	33/102 (32,4)	
Diabetes (%)			
Typ 1	4/130 (3,1)	3/102 (2,9)	
Typ 2	17/130 (13,1)	17/102 (16,7)	
HbA1c vor Dialyse (%)	12/131 (9,2)	35/102 (34,3)	
Glomeruläre Filtrationsrate ml/min (%)			
<20	16/130 (12,3)	63/101 (62,4)	
20 – 70	54/130 (41,5)	36/101 (35,6)	
>70	60/130 (46,2)	2/101 (2)	
Glukose mg/dl im Plasma (SD)	121 \pm 58,31 (N=49)	126 \pm 42,08 (N=78)	0,042
Glukose mg/dl im Kapillarblut (SD)	110 \pm 68,34 (N=18)	96 \pm 29,90 (N=6)	0,974
Hämoglobinkonzentration g/dl (SD)	11,7 \pm 2,09 (N=130)	10,5 \pm 1,75 (N=102)	0,000
Blood Urea Nitrogen mg/dl (SD)	44 \pm 17,66 (N=131)	129 \pm 38,33 (N=102)	0,000
Cystatin C mg/l (SD)	1,37 \pm 0,69 (N=44)	2,69 \pm 0,8 (N=17)	0,000
Kreatinin mg/dl (SD)	1,80 \pm 1,7 (N=129)	4,50 \pm 2,64 (N=102)	0,000

Der Zusammenhang zwischen der Höhe des HbA1c-Wertes und der BUN-Konzentration lässt sich anhand von Boxplots veranschaulichen. In der ersten Gruppe mit einer Blood Urea Nitrogen (BUN)-Konzentration unter 80 mg/dl befinden sich 131 Proben nephrologischer Patienten. In der zweiten Gruppe mit BUN-Konzentrationen von 80 mg/dl und mehr befinden sich 102 Proben nephrologischer Patienten.

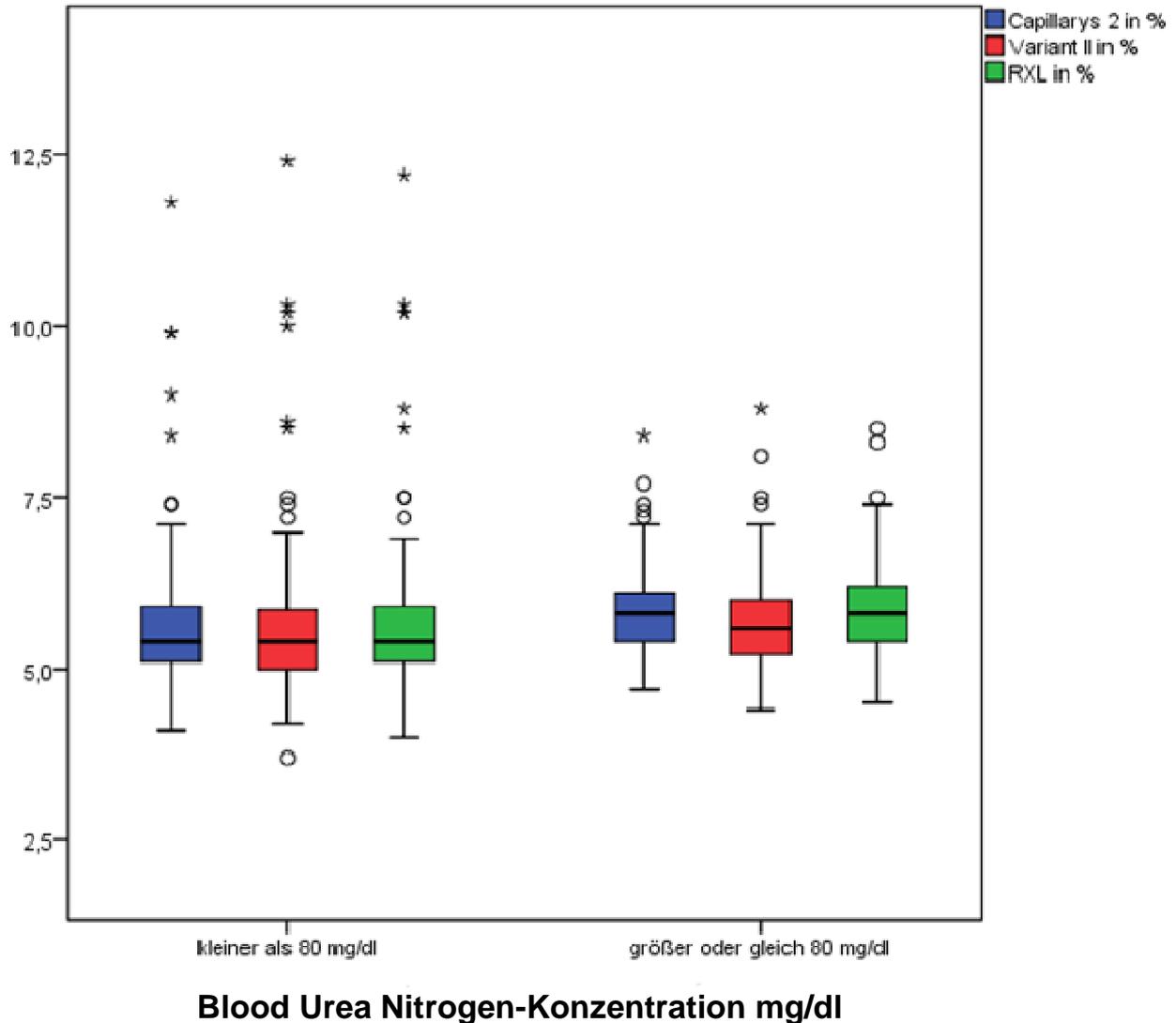


Abb. 14: Messungen der HbA1c-Werte am CapillaryTM 2 Flex Piercing, Variant II und Dimension RXL Max, Darstellung von HbA1c und Blood Urea Nitrogen (BUN)-Konzentration

Tab. 14: Ergebnisse der HbA1c-Werte bezogen auf die BUN-Konzentration, Angaben in Prozent

	Capillarys HbA1c < 80 mg/dl	Capillarys HbA1c ≥ 80 mg/dl	Variant HbA1c < 80 mg/dl	Variant HbA1c ≥ 80 mg/dl	RXL HbA1c < 80 mg/dl	RXL HbA1c ≥ 80 mg/dl
Anzahl	131	102	131	102	131	102
Mittelwert	5,7	5,8	5,6	5,7	5,7	5,9
Median	5,4	5,8	5,4	5,6	5,4	5,8
Standard- abweichung	1,1	0,7	1,2	0,7	1,2	0,8
Minimum	4,1	4,7	3,7	4,4	4	4,5
Maximum	11,8	8,4	12,4	8,8	12,2	8,5
Spannweite	7,7	3,7	8,7	4,4	8,2	4
Interquartil- range	0,8	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8

Die HbA1c-Werte in der zweiten Gruppe liegen beim Capillarys™ 2 Flex Piercing sichtbar höher. Der Mann Whitney U Test ergibt einen P-Wert von 0,005, weshalb die Nullhypothese abgelehnt wird. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient weist mit $r = 0,191$ eine schwach positive Korrelation auf ($p = 0,003$, $N = 233$).

Die HbA1c-Werte in der zweiten Gruppe liegen beim Variant II sichtbar höher. Der Mann Whitney U Test ergibt einen P-Wert von 0,004, weshalb die Nullhypothese abgelehnt wird. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient weist mit $r = 0,207$ eine schwach positive Korrelation auf ($p = 0,001$, $N = 233$).

Die HbA1c-Werte in der zweiten Gruppe liegen beim Dimension RXL Max sichtbar höher. Der Mann Whitney U Test ergibt einen P-Wert von 0,001, weshalb die Nullhypothese abgelehnt wird. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient weist mit $r = 0,224$ eine schwach positive Korrelation auf ($p = 0,001$, $N = 233$).

4.5 Vergleichsanalyse der Proben mit unterschiedlichen Diagnosen nach Messmethode

Bei 14 Proben unterscheiden sich die Methoden in der Diagnosestellung Diabetes mellitus oder Prädiabetes und in 59 Proben unterscheiden sich die Messungen hinsichtlich einer Einstufung „Prädiabetes“ oder „Unauffällig“. 3 Patientenproben wurden aus dem Kollektiv entfernt, da zu wenig Material vorhanden oder die Probe geronnen

war. Die drei Messmethoden ermitteln in 3,47 % der Fälle beim cut-off „Diabetes mellitus“ gegen „Prädiabetes“ und in 14,6 % beim cut-off „Prädiabetes“ gegen „Unauffällig“ keine übereinstimmende Diagnose.

„Diabetes mellitus“/„Prädiabetes“:

Von den 14 Fällen misst der Dimension RXL Max in 50 %, der Variant II in 35,7 % und der Capillarys™ 2 Flex Piercing in 14,29 % jeweils anders als die anderen beiden Methoden.

„Prädiabetes“/„Unauffällig“:

Von den 59 Fällen misst der Dimension RXL Max in 33,9 %, der Variant II in 42,37 % und der Capillarys™ 2 Flex Piercing in 23,73 % jeweils anders als die anderen beiden Methoden.

In der Subpopulation „Prädiabetes“ gegen „Unauffällig“ wurde für jede Messmethode ein Chi-Quadrat-Test mit folgenden Hypothesen durchgeführt:

H0 = Messmethoden stimmen überein und eine Methode misst anders als die anderen
Messmethoden sind gleichverteilt

H1 = es gibt signifikante Unterschiede

Die Capillarys™ 2 Flex Piercing Messmethode zählt signifikant häufiger zu den übereinstimmenden Methoden ($p < 0,000$; Bonferroni adjustiert). Die Dimension RXL Max Messmethode zählt ebenfalls signifikant häufiger zu den übereinstimmenden Methoden ($p < 0,04$; Bonferroni adjustiert). Die Variant II Methode ist nicht signifikant ($p = 0,024$). In 88 % dieser Fälle erfolgte eine HbA1c-Bestimmung durch den Variant II mit der Diagnose „Unauffällig“.

5. Diskussion

5.1 Messung von HbA1c

Wie eingangs beschrieben stehen für die Messung des HbA1c verschiedene Messverfahren zur Verfügung. Da die Referenzmethode der IFCC zu aufwendig ist, um sie in der täglichen Routine anzuwenden, werden Kalibratoren produziert, um die Routinemethoden auf die IFCC-Referenzmethode rückführen zu können (Mosca et al., 2007). In den letzten Jahrzehnten sind die bewährten Routinemethoden wie Ionenaustauschchromatographie, Elektrophorese, Affinitätschromatographie, Immunoassay und enzymatische Bestimmung fortlaufend von den verschiedenen Herstellern verbessert worden, wobei assayabhängige Störfaktoren zunehmend identifiziert und eliminiert wurden. Assayunabhängige Störungen durch akuten Blutverlust, Transfusionen, Anämien und verkürzte Erythrozytenlebensdauer müssen bei der Interpretation des HbA1c-Wertes identifiziert und berücksichtigt werden.

Für Diagnostik, Überwachung und Therapie des Diabetes mellitus ist es erforderlich, dass die verschiedenen Routinemethoden vergleichbare Resultate liefern. Frühere Studien aus den 90er Jahren haben gezeigt, dass die verschiedenen Routinemethoden vor Einführung der IFCC-Referenzmethode unterschiedliche Ergebnisse lieferten (Little et al., 1991; Weycamp et al., 1993; Hoshino et al., 1997; Mosca et al., 1997). Ein Methoden- oder Laborwechsel konnte Werteänderungen ergeben, die in keinen Zusammenhang mit der Diabeteseinstellung standen. Zu dieser Zeit wurde die Bio-Rex 70 Methode (HPLC) als Referenzmethode der DCCT angewandt, in einem analytisch wenig charakterisierten Peak im HPLC-Chromatogramm wurden diverse Verunreinigungen, beispielsweise carbamylisiertes und acetyliertes Hämoglobin, miterfasst (Eckfeldt und Bruns, 1997).

Im Jahr 2002 wurde von der IFCC eine neue Referenzmethode (HPLC-ESI/MS oder HPLC-CE) festgelegt und entsprechendes Referenzmaterial entwickelt. In Europa dürfen nur noch Produkte verkauft und Methoden angewandt werden, die auf die analytisch fundierte IFCC-Referenzmethode zurückführbar sind (Directive 98/79/EC, 1998). Kontinuität und Stabilität der HbA1c-Bestimmung können seitdem durch dieses Referenzsystem gewährleistet werden (Weycamp et al., 2008). Das HbA1c wird nach

dem IFCC-System in mmol/mol angegeben und die herkömmlichen Werte in Prozent werden rechnerisch abgeleitet.

HbA1c-Bestimmungen in nephrologischen Proben sind nach wie vor eine Herausforderung in der täglichen Routine, da zahlreiche Faktoren die Messung beeinflussen können. Nicht nur bei nephrologischen Patienten ist die exakte Bestimmung unabhängig von der verwendeten Messmethode von entscheidender Bedeutung um eine optimale Diabetestherapie und somit eine Verzögerung der Progression dieser chronischen Erkrankung zu gewährleisten (Coelho und Rodrigues, 2014).

In unserer Studie kamen die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Variant II), die Kapillaronenelektrophorese (CapillarysTM 2 Flex Piercing) und eine immunologische Messmethode (Dimension RXL Max) zum Einsatz. Diese drei Methoden sind auf das IFCC-Referenzsystem rückführbar. Es wurde an 624 Patientenproben der HbA1c-Wert mit den drei Analysegeräten bestimmt. Das Kollektiv wurde zunächst unterteilt in 407 Proben von nephrologischen Patienten und 217 Proben aus Routineeinsendungen. Der durchschnittliche HbA1c-Wert liegt bei den Routineproben um 0,2 bis 0,4 % höher als bei den nephrologischen Proben.

Da der Anteil an Diabetikern in beiden Gruppen mit 15,9 % (nephrologisch) und 15,4 % (Routine) ungefähr gleich hoch ist, kommen als Erklärung für die niedrigeren HbA1c-Werte in der nephrologischen Gruppe mehrere Faktoren in Betracht. Die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration liegt mit 11,2 g/dl im anämischen Bereich, der Anteil an chronisch niereninsuffizienten Patienten im Stadium 5 liegt mit 34,5 % um 33,6 %, der Anteil an transfundierten Patienten mit 24,8 % um 21,6 % höher als in der Routinegruppe. Das deutlich erhöhte Serumkreatinin von durchschnittlich 2,64 mg/dl weist auf eine niedrige GFR und somit auf eine eingeschränkte Nierenfunktion hin, tatsächlich stammen 52,6 % der nephrologischen Proben von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und 10,1 % von Patienten mit akutem Nierenversagen. Durch diese Faktoren lässt sich erklären, weshalb die HbA1c-Bestimmung bei den nephrologischen Proben methodenunabhängig niedriger ausfällt als bei den Routineproben (Schernthaner et al., 1979; Inaba et al., 2007; Peacock et al., 2008).

5.2 Vergleich der drei Messmethoden am Routinekollektiv

Im Vergleich zwischen Capillarys™ 2 Flex Piercing und Dimension RXL Max liegt eine sehr gute Korrelation mit $r = 0,964$ vor. Das Regressionsverfahren nach Passing Bablok zeigt, dass zwischen den beiden Messmethoden ein gleichbleibender Unterschied über den gesamten Messbereich auftritt. Der Methodenvergleich nach Bland-Altman zeigt, dass der Capillarys™ 2 Flex Piercing durchschnittlich um 0,163 % höher misst als der Dimension RXL Max.

Im Vergleich zwischen Capillarys™ 2 Flex Piercing und Variant II liegt eine sehr gute Korrelation mit $r = 0,958$ vor. Das Regressionsverfahren nach Passing-Bablok zeigt, dass zwischen den beiden Messmethoden ein gleichbleibender Unterschied über den gesamten Messbereich auftritt. Der Methodenvergleich nach Bland-Altman zeigt, dass der Capillarys™ 2 Flex Piercing durchschnittlich um 0,075 % höher misst als der Variant II.

Im Vergleich zwischen Dimension RXL Max und Variant II liegt eine sehr gute Korrelation mit $r = 0,951$ vor. Das Regressionsverfahren nach Passing-Bablok zeigt, dass ein Unterschied zwischen den beiden Messmethoden auftritt, der nicht über den gesamten Messbereich gleich bleibt. Der Methodenvergleich nach Bland-Altman zeigt, dass der Dimension RXL Max durchschnittlich um 0,1 % niedriger misst als der Variant II.

Der Capillarys™ 2 Flex Piercing misst somit statistisch signifikant höher als der Dimension RXL Max und der Variant II. Das Bland-Altman-Diagramm zeigt, dass HbA1c-Werte unter 6,5 % vom Capillarys™ 2 Flex Piercing tendentiell höher gemessen werden als von den Vergleichsmethoden. HbA1c-Werte über 6,5 % hingegen werden vom Capillarys™ 2 Flex Piercing tendentiell niedriger gemessen als von den beiden anderen Geräten. Eine Erklärung könnte die Verwendung zweier verschiedener Kalibratoren für den Capillarys™ 2 Flex Piercing sein, denn ein Kalibrator wird für ein normales HbA1c-Level und ein anderer Kalibrator für ein erhöhtes HbA1c-Level benötigt.

Eine gute Übereinstimmung zwischen den drei Messmethoden HPLC, Kapillarzonen-elektrophorese und immunologische Methode wird in aktuellen Veröffentlichungen

belegt (Chang et al., 1998; Matteucci et al., 2001; Tiran et al., 1994; Tran et al., 2009; Szymanovicz und Neyron, 2010; Genc et al., 2012; Jaisson et al., 2012). Es wurden verschiedene Geräte und Assays unterschiedlicher Hersteller getestet, unter anderem der BM/Hitachi 911 (Boehringer Mannheim[®]), der Diamat (Bio-Rad Laboratories[®]), der L-9100 (Merck/Hitachi[®]), der Abbott IMx (Abbott Laboratories[®]), der Tina-quant (Boehringer Mannheim[®]), der Tina-quant 2nd und 3rd (Roche Diagnostics[®]), der Adams HA-8160 (Arkray Inc[®]), der Capillarys[™] 2 Flex Piercing (Sebia[®]), der Variant II (Bio-Rad Laboratories[®]), der Integra 400, 700 und 800 (Roche Diagnostics[®]), der G7, G8 und 2.2+ (Tosoh Bioscience SA[®]), sowie der Dimension RXL (Siemens Healthcare Diagnostics[®]).

In diesem Zusammenhang lässt sich schlussfolgern, dass die von uns evaluierten Methoden in der klinischen Routine geeignet sind, um den HbA1c in der klinischen Praxis mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Ein Vergleich des Variant II, des Capillarys[™] 2 Flex Piercing und des Dimension RXL Max wurde bisher in keiner anderen Studie durchgeführt und veröffentlicht.

5.3 Vergleich der drei Messmethoden am nephrologischen Kollektiv

Im Vergleich zwischen Capillarys[™] 2 Flex Piercing und Dimension RXL Max liegt eine sehr gute Korrelation mit $r = 0,961$ vor. Das Regressionsverfahren nach Passing-Bablok zeigt, dass zwischen beiden Methoden kein relevanter Unterschied auftritt. Der Methodenvergleich nach Bland-Altman zeigt, dass der Capillarys[™] 2 Flex Piercing durchschnittlich um 0,021 % niedriger misst als der Dimension RXL Max, dies ist jedoch nicht klinisch relevant.

Im Vergleich zwischen Capillarys[™] 2 Flex Piercing (Kapillarzonenelektrophorese) und Variant II (HPLC) liegt eine sehr gute Korrelation mit $r = 0,960$ vor. Das Regressionsverfahren nach Passing-Bablok zeigt, dass zwischen beiden Methoden kein relevanter Unterschied auftritt. Der Methodenvergleich nach Bland-Altman zeigt, dass der Capillarys[™] 2 Flex Piercing durchschnittlich um 0,051 % höher misst als der Variant II, dies ist jedoch nicht klinisch relevant.

Im Vergleich zwischen Dimension RXL Max (immunologische Messmethode) und Variant II (HPLC) liegt eine sehr gute Korrelation mit $r = 0,949$ vor. Das Regressions-

verfahren nach Passing-Bablok zeigt, dass ein Unterschied zwischen den beiden Messmethoden auftritt, der nicht über den gesamten Messbereich gleich bleibt. Der Methodenvergleich nach Bland-Altman zeigt, dass der Dimension RXL Max durchschnittlich um 0,072 % höher misst als der Variant II, dies ist jedoch nicht klinisch relevant.

Eine gute Übereinstimmung zwischen den drei Messmethoden HPLC, Kapillarzonen-elektrophorese und immunologische Methode wurde in einer aktuellen Veröffentlichung belegt. In dieser Studie wurden 11 Geräte und Assays, der G7 und G8 (Tosoh Bioscience SA[®]), der Variant II NU, Variant II Turbo, der Variant II Turbo 2.0, D-10 und D-10 Dual (Bio-Rad Laboratories[®]), der HA-8160 (A. Menarini Diagnostics[®]), der Tinaquant 2nd (Roche Diagnostics[®]) mit Integra 800 (Roche Diagnostics[®]) und DCA 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics[®]) und der Hitachi 917 (Diazyme Europe GmbH[®]), an Patienten mit und ohne Nierenversagen und Diabetes getestet (Little et al., 2013).

Die gute Übereinstimmung zwischen den drei von uns evaluierten Messmethoden im nephrologischen Kollektiv erlaubt die Aussage, dass diese Methoden in der klinischen Routine auch für nierenkranke Patienten gut geeignet sind, um den HbA1c in der klinischen Praxis mit hoher Genauigkeit zu bestimmen.

5.4 Vergleich der drei Messmethoden bei akutem und chronischem Nierenversagen

Von den 624 Proben aus dem gesamten Patientenkollektiv stammen 45 Proben von Patienten mit akutem Nierenversagen. Um die zentrale Tendenz der Stichproben zu untersuchen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Medianen ist lediglich beim Dimension RXL Max auszugehen. Bei Patienten ohne akutes Nierenversagen beträgt der Median 5,5 %, wohingegen bei Patienten mit akutem Nierenversagen der Median 5,8 % beträgt. Beim Capillarys[™] 2 Flex Piercing und beim Variant II unterscheiden sich die Mediane nicht signifikant um 0,2 % beziehungsweise 0,1 %. Die Mittelwerte in allen drei Messmethoden unterscheiden sich nur geringfügig um maximal 0,1 %. Es ist davon auszugehen, dass akutes Nierenversagen keinen klinisch relevanten Einfluss auf die unterschiedlichen Messmethoden hat.

Von den 624 Proben aus dem gesamten Patientenkollektiv stammen 383 Proben von Patienten ohne chronische Niereninsuffizienz. Zum Kollektiv der chronischen Niereninsuffizienz im Stadium 5, die eine Nierenersatztherapie erfordert, gehören 141 Proben, die restlichen Proben stammen von Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz im Stadium 1 bis 4. Die Patienten in dieser Gruppe sind nicht dialysepflichtig. Nach Durchführung des Kruskal-Wallis-Test ist von keiner gleichen Verteilung auszugehen. In allen drei Messmethoden liegt in der Gruppe ohne Niereninsuffizienz der Median bei 5,6 % (Capillarys™ 2 Flex Piercing) beziehungsweise bei 5,5 % (Variant II und Dimension RXL Max). In den Gruppen mit Stadium 1 bis 4 liegt der Median mit Werten zwischen 5,6 % und 6,1 % vergleichsweise höher. In der Gruppe mit Stadium 5 ist der Median mit 5,3 % (Capillarys™ 2 Flex Piercing und Variant II) beziehungsweise 5,4 % (Dimension RXL Max) am niedrigsten. Aufgrund der Tatsache, dass bei terminaler Niereninsuffizienz die Lebensdauer der Erythrozyten verkürzt ist, erklären sich die niedrigeren Messwerte in dieser Gruppe (Schernthaner et al., 1979; Inaba et al., 2007; Peacock et al., 2008). Insgesamt gibt es bei den drei Messmethoden hier keine signifikanten Unterschiede.

5.5 Vergleich der drei Messmethoden bei Nierenersatztherapie und Nierentransplantation

Von den 624 Proben aus dem gesamten Patientenkollektiv stammen 126 Proben von Patienten mit Nierenersatztherapie. Um die zentrale Tendenz der Stichproben zu untersuchen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Demnach ist von keiner gleichen Verteilung auszugehen. Der Median beträgt bei Patienten ohne Nierenersatztherapie 5,6 % (Capillarys™ 2 Flex Piercing) beziehungsweise 5,5 % (Variant II und Dimension RXL Max). Bei Patienten mit Nierenersatztherapie hingegen liegt der Median bei 5,2 %. Wie bereits beschrieben, hängt dies mit einer verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten bei terminaler Niereninsuffizienz zusammen. Das Interquartilsrange ist bei allen drei Methoden in der Gruppe mit Nierenersatztherapie deutlich größer, um 0,5 % beim Capillarys™ 2 Flex Piercing, um 0,4 % beim Variant II und um 0,3 % beim Dimension RXL Max. Dies drückt eine größere HbA1c-Variabilität aus, die auf urämiebedingter Insulinresistenz, veränderter Insulinkinetik, reduzierter Glukoneogenese, Dialyse, Hochproteindiät und Bewegungsmangel beruht (Schernthaner und Sämman, 2010).

Von den 624 Proben aus dem gesamten Patientenkollektiv stammen 112 Proben von Patienten mit Nierentransplantation. Um die zentrale Tendenz der Stichproben zu untersuchen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt, demzufolge hier eine gleiche Verteilung angenommen werden kann. Die Nierentransplantation scheint keinen Einfluss auf die Messung des HbA1c-Wertes zu nehmen.

5.6 Vergleich der drei Messmethoden im Hinblick auf den Hämoglobinwert

Der Hämoglobinwert ist der wichtigste Parameter zur Erkennung einer Anämie, bei der die Hämoglobinkonzentration unterhalb des Normbereiches liegt. Die Lebensdauer der Erythrozyten ist bei der renalen Anämie verkürzt, was eine verminderte Glykierung des Hämoglobins und somit niedrigere HbA1c-Werte zur Folge hat (Panzer et al., 1982). Eine Eisenmangelanämie hingegen ist im Zusammenhang mit erhöhten HbA1c-Werten beobachtet worden (El-Agouza et al., 2002). Im Probenkollektiv liegt die Hämoglobinkonzentration in der nephrologischen Gruppe bei 11,2 g/dl, in der Routinegruppe bei 13,2 g/dl. Ein relevanter Zusammenhang zwischen Hämoglobinwert und HbA1c lässt sich bei Betrachtung der p-Werte und des Korrelationskoeffizienten nicht feststellen. Für den Capillarys™ 2 Flex Piercing ist der p-Wert zwar signifikant, der Korrelationskoeffizient lässt allerdings kaum eine Aussage zu.

5.7 Vergleich der drei Messmethoden im Hinblick auf den Blood Urea Nitrogen (BUN)-Wert

Um den Zusammenhang zwischen der Höhe der HbA1c-Werte und der Höhe der BUN-Konzentration zu untersuchen, wurden die 233 Proben aus dem insgesamt 407 Proben umfassenden Kollektiv der nephrologischen Patienten betrachtet, bei denen die BUN-Konzentration mitbestimmt wurde. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient weist mit $r = 0,191$ (Capillarys™ 2 Flex Piercing), $r = 0,207$ (Variant II) und $r = 0,224$ (Dimension RXL Max) jeweils eine schwach positive Korrelation auf, ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Messwerten ist somit anzunehmen.

Zur weiteren Betrachtung des Kollektivs der 233 Patienten lässt es sich in zwei Gruppen unterteilen. In der ersten Gruppe mit 131 Proben liegt die BUN-Konzentration unter 80 mg/dl, in der zweiten Gruppe mit 102 Proben liegt die BUN-Konzentration bei 80 mg/dl oder darüber. Die durchschnittliche BUN-Konzentration liegt in der ersten Gruppe bei 44

mg/dl, also knapp über dem Referenzbereich von 15 bis 39 mg/dl, in der zweiten Gruppe hingegen deutlich höher bei 129 mg/dl. Der durchschnittliche HbA1c-Wert liegt in der ersten Gruppe um 0,1 bis 0,2 % niedriger als in der zweiten Gruppe.

Der Anteil an Diabetikern in beiden Gruppen ist mit 16,2 % (Gruppe 1) und 19,6 % (Gruppe 2) ungefähr gleich hoch. Der Anteil an chronisch niereninsuffizienten Patienten im Stadium 5 liegt mit 45,1 % in Gruppe 2 um 27,4 % höher als in Gruppe 1. Das deutlich erhöhte Serumkreatinin von durchschnittlich 4,5 mg/dl in Gruppe 2 verglichen mit 1,8 mg/dl in Gruppe 1 weist auf eine niedrige GFR und somit auf eine eingeschränkte Nierenfunktion hin, ebenso das erhöhte Cystatin C von durchschnittlich 2,69 mg/l in Gruppe 2 verglichen mit 1,37 mg/l in Gruppe 1. Tatsächlich stammen 78,4 % der Proben aus Gruppe 2 von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und 17,6 % von Patienten mit akutem Nierenversagen.

Durch diese Faktoren lässt sich allerdings nicht eindeutig klären, weshalb die HbA1c-Bestimmung bei den Proben aus Gruppe 2 methodenunabhängig höher ausfällt als bei den Proben aus Gruppe 1. Die Proben aus Gruppe 2 stammen von deutlich azotämischen Patienten, die durchschnittlich bedeutend schlechtere Nierenwerte aufweisen als die Proben aus Gruppe 1. Nach Durchführung des Mann-Whitney-U-Test ist von keiner gleichen Verteilung der HbA1c-Werte auszugehen.

5.8 Zusammenhang von Blood Urea Nitrogen (BUN) und carbamylisiertem Hämoglobin

Wie bereits erwähnt führen chronisches Nierenversagen, Dialyse und Nierentransplantation zu einem Anstieg des carbamylierten Hämoglobins. Die Erhöhung des carbamylierten Hämoglobins korreliert linear mit der Nierenfunktion. Von einer Korrelation zwischen Gesamthämoglobin und carbamylisiertem Hämoglobin ist nicht auszugehen (Smith et al., 1988). Die Carbamylierungsrate steigt mit der Höhe des Harnstoffs im Blut, sie ist dabei von der BUN-Konzentration und der Dauer der Harnstoffexposition abhängig. Für BUN über 80 mg/dl ist das carbamylierte Hämoglobin bei chronischer Niereninsuffizienz daher stärker erhöht als bei akutem Nierenversagen (Stim et al., 1995).

Carbamylisiertes Hämoglobin interferiert in unterschiedlichem Ausmaß mit verschiedenen HbA1c-Assays. Ob die drei verschiedenen Messmethoden in unserer Studie, die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Variant II), die Kapillarzonenelektrophorese

(Capillarys™ 2 Flex Piercing) und eine immunologische Messmethode (Dimension RXL Max) von carbamylisiertem Hämoglobin beeinflusst werden, lässt sich mit unseren Ergebnissen nur indirekt über die Bestimmung der BUN-Konzentration untersuchen.

5.9 Capillarys™ 2 Flex Piercing

Die Kapillarzonenelektrophorese ermöglicht die Analyse von zahlreichen Hämoglobinvarianten (Gerritsma et al., 2000; Cotton et al., 2009). Die HbA1c-Bestimmung wird laut Hersteller nicht von labilem HbA1c, carbamylisiertem Hämoglobin oder acetyliertem Hämoglobin beeinflusst. Hämoglobinvarianten interferieren nicht, weshalb diese Methode zunächst als Referenztest für andere Routinemethoden angewandt wurde (Doelman et al., 1997). Allerdings war diese Methode aufgrund der langen Analysedauer und dem geringen Probendurchsatz nicht besonders geeignet für die HbA1c-Bestimmung in der täglichen Routine (Jenkins und Radnaïke, 2003). Erst die Geräte der neuen Generation erfüllen die Qualitätskriterien und sind als voll automatisierte Routinemethode neben HPLC und TINIA mit vergleichbarem zeitlichem und finanziellem Aufwand einsetzbar (Weycamp et al., 2009; Dusan et al., 2011). Der Capillarys™ 2 Flex Piercing weist in einer aktuellen Evaluation eine gute Korrelation mit dem Variant II auf, es besteht demnach Linearität im Wertebereich zwischen 3,9 % und 16,9 % ($r = 0,999$) bei hoher Genauigkeit der Methode (Jaisson et al., 2012).

In unserer Studie lässt sich beim Capillarys™ 2 Flex Piercing ein Unterschied von 0,1 % zwischen den durchschnittlichen HbA1c-Werten in den Gruppen 1 und 2 feststellen. In Gruppe 2 liegen BUN-Werte ab 80 mg/dl vor, entsprechend ist davon auszugehen, dass auch das carbamylierte Hämoglobin in dieser Gruppe erhöht ist. Der Median liegt in Gruppe 1 bei 5,4 %, in Gruppe 2 bei 5,8 %.

5.10 Variant II

Die HPLC ist eine etablierte Routinemethode zur Bestimmung von Hämoglobinvarianten und HbA1c (Weycamp et al., 1993; Bissé et al., 1995). Moderne Geräte eliminieren viele interferierende Addukte wie carbamylisiertes Hämoglobin, indem neues chromatographisches Material und verbesserte Gradienten eingesetzt werden (Little et al., 2002). In den ersten Evaluationen zeigte der Variant II bereits eine akzeptable Analyseleistung (Higgins et al., 2001; Moridani et al., 2003). Interferierende Substanzen wie labiles

HbA1c können durch spezielle Protokolle eliminiert werden (Szymezak et al., 2008). Die Methoden für den Variant II werden ständig weiterentwickelt, neuere Testkits sind weniger sensitiv gegenüber labilem HbA1c und carbamylisiertem Hämoglobin (Lavalard et al., 2009).

In unserer Studie lässt sich beim Variant II ein Unterschied von 0,1 % zwischen den durchschnittlichen HbA1c-Werten in den Gruppen 1 und 2 feststellen. In Gruppe 2 liegen BUN-Werte ab 80 mg/dl vor, entsprechend ist davon auszugehen, dass auch das carbamylierte Hämoglobin in dieser Gruppe erhöht ist. Der Median liegt in Gruppe 1 bei 5,4 %, in Gruppe 2 bei 5,6 %.

5.11 Dimension RXL Max

Die TINIA ist eine etablierte immunologische Routinemethode zur Bestimmung von HbA1c, die auf Antikörperbindung beruht und somit eine spezifische Messung ermöglicht. In Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass carbamyliertes Hämoglobin die Messung tatsächlich nicht beeinflusst (Rose et al., 1995). Hämoglobinvarianten beeinflussen die Messung in der Regel nicht, lediglich hohe HbF-Werte interferieren (Chang et al., 1998). HPLC und TINIA werden in zahlreichen Studien als gleichwertige Methoden angesehen (Shiba et al., 1996; Matteucci et al., 2001; Genc et al., 2012). In einer Vergleichsstudie von drei Immunoassaymethoden, zu denen auch der Dimension RXL Max gehört, mit zwei HPLC-Assays zeigten die Immunoassaymethoden mit Variationskoeffizienten von 2,56 %, 2,29 % und 2,25 % (Dimension RXL Max) schlechtere analytische Performance als die HPLC-Assays mit 1,66 % und 1,14 % (Tran et al., 2009).

In unserer Studie lässt sich beim Dimension RXL Max ein Unterschied von 0,2 % zwischen den durchschnittlichen HbA1c-Werten in den Gruppen 1 und 2 feststellen. In Gruppe 2 liegen BUN-Werte ab 80 mg/dl vor, entsprechend ist davon auszugehen, dass auch das carbamylierte Hämoglobin in dieser Gruppe erhöht ist. Der Median liegt in Gruppe 1 bei 5,4 %, in Gruppe 2 bei 5,9 %.

5.12 Vergleich der drei Messmethoden im Hinblick auf HbA1c

Da es für Diagnose und Therapie des Diabetes mellitus von entscheidender Bedeutung ist, den HbA1c-Wert möglichst genau zu bestimmen, sind bereits Abweichungen der

Messungen in einem Bereich von über 0,1 % für viele Patienten von klinischer Relevanz. Für die Diagnose gilt ein HbA1c-Wert von 6,5 % als Grenze, ein niedrigerer Wert im prädiabetischen Bereich von 5,7 bis 6,5 % erfordert gegebenenfalls die Durchführung eines Glukosetests. Im Falle einer antihyperglykämischen Therapie sollte bei einem HbA1c-Wert über 6,5 % ein orales Antidiabetikum verabreicht werden, über 7,5 % sollte sogar zusätzlich eine Insulinkombinationstherapie erfolgen (Matthaei et al., 2011). Weicht der gemessene HbA1c also vom tatsächlichen HbA1c-Wert ab, so zieht dies Konsequenzen für das Behandlungsregime des Patienten nach sich.

In unserer Studie befanden sich im Routinekollektiv 69 (Capillarys™ 2 Flex Piercing), 51 (Variant II) beziehungsweise 43 (Dimension RXL Max) Proben im prädiabetischen Bereich. Im diabetischen Bereich befanden sich 46 (Capillarys™ 2 Flex Piercing), 49 (Variant II) beziehungsweise 42 (Dimension RXL Max) Patientenproben. Im nephrologischen Kollektiv befanden sich 122 (Capillarys™ 2 Flex Piercing), 100 (Variant II) beziehungsweise 125 (Dimension RXL Max) Proben im prä-diabetischen Bereich. Im diabetischen Bereich befanden sich 45 (Capillarys™ 2 Flex Piercing), 46 (Variant II) beziehungsweise 47 (Dimension RXL Max) Patientenproben.

In beiden Kollektiven gab es Ausreißer mit Differenzen von 0,5 % und mehr zwischen den verschiedenen Methoden. Im Routinekollektiv betraf dies 21 Messungen an 20 Patienten, im nephrologischen Kollektiv betraf dies 34 Messungen an 22 Patienten. Die betroffenen Proben wiesen überdurchschnittlich oft eine niedrige GFR und ein hohes Kreatinin auf, auch das Vorliegen einer mittelschweren bis schweren chronischen Niereninsuffizienz lag häufiger vor.

Vergleicht man in unserer Studie die Mittelwerte für HbA1c in den unterschiedlichen Probenkollektiven, sind die größten Abweichungen im Routinekollektiv, der Gruppe mit BUN-Werten über 80 mg/dl und bei chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 1 festzustellen. Bei der Bestimmung am Routinekollektiv weicht der Dimension RXL Max um 0,163 % vom Capillarys™ 2 Flex Piercing und um 0,1 % vom Variant II nach unten ab. In der Gruppe mit BUN-Werten über 80 mg/dl weicht der Dimension RXL Max hingegen um 0,1 % vom Capillarys™ 2 Flex Piercing und um 0,2 % vom Variant II nach oben ab. Da in dieser Gruppe aufgrund des deutlich erhöhten BUN von einer erhöhten Rate an carbamylisiertem Hämoglobin auszugehen ist, stellt sich die Frage, ob carbamylisiertes Hämoglobin die HbA1c-Messung des Dimension RXL Max beeinflusst.

Da dieses Gerät allerdings auf einer immunologischen Methode basiert, die laut Hersteller lediglich die an der N-terminalen Gruppe der Betakette glykierten Hämoglobinvarianten mit identischen Epitopen wie HbA1c messen soll, werfen diese Resultate die Frage auf, wie spezifisch der in diesem Assay verwendete Antikörper an HbA1c bindet. Immunoassays gelten allerdings prinzipiell gegenüber carbamylisiertem Hämoglobin als unempfindlich.

Ein weiter wichtiger Aspekt für die HbA1c-Bestimmung in nephrologischen Proben sind die Grenzwerte in denen ein Messunterschied in den verschiedenen Methoden zu einer anderen Diagnose führen würde (American Diabetes Association, 2013). In unserer Studie zeigte sich, dass bei 3,47 % der gemessenen Proben (in 14 Fällen) keine übereinstimmende Diagnose bezüglich Diabetes mellitus oder Prädiabetes erreicht werden konnte. Insbesondere im Bereich Prädiabetes oder Unauffällig hätte bei 14,6 % der gemessenen Proben (in 59 Fällen) die HbA1c-Bestimmung zu einer unterschiedlichen Eingruppierung des Patienten geführt. Dabei zählten der Capillarys™ 2 Flex Piercing und der Dimension RXL Max häufiger zu den Messmethoden, welche übereinstimmende Ergebnisse lieferten. Der Variant II hingegen zeigt nur eine zufällige Übereinstimmung im Vergleich mit den anderen Messmethoden. In den Fällen, in denen der Variant II anhand seiner HbA1c-Bestimmung ein anderes Ergebnis bezüglich Prädiabetes oder Unauffällig liefert, liegt sein Messergebnis in 88 % unterhalb der beiden anderen Messergebnisse.

Bisher würde die Unterscheidung Prädiabetes oder Unauffällig in der Praxis bezüglich der Therapie des Diabetes mellitus keine Änderung bewirken (Bundesärztekammer et al., 2010). Studien empfehlen prädiabetischen Patienten follow-up, Gewichtsreduktion und intensiverte Bewegung (American Diabetes Association, 2012), demnach würde die Wahl der Messmethode durchaus das follow-up und das Risikoverhalten beeinflussen. Um vergleichbare Werte zu erhalten ist es also empfehlenswert, intraindividuell jeweils mit der gleichen Messmethode die HbA1c-Bestimmungen durchzuführen, um eine longitudinale Vergleichbarkeit sicherzustellen. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass ein HbA1c-Anstieg auch unterhalb des cut-offs für Prädiabetes mit einem deutlich erhöhten Risiko für einen Diabetes mellitus im Verlauf verbunden ist. Patienten mit einem HbA1c-Wert zwischen 5,5 und 6,0 % hatten in Studien ein bis zu 25 % erhöhtes Risiko in den nächsten 5 Jahren einen manifesten Diabetes mellitus zu entwickeln (Zhang et al., 2010).

Unsere Studie veranschaulicht deutlich, dass Messunterschiede durch verschiedene Messverfahren zu Fehleingruppierungen führen können. Insbesondere bei bereits nierengeschädigten Patienten sind präventive Maßnahmen erforderlich, um eine weitere Progression zu vermeiden. Zusammenfassend lässt sich jedoch festhalten, dass alle drei dargestellten Messmethoden zum Einsatz im Routinelabor prinzipiell gut einsetzbar sind.

Die drei von uns evaluierten Methoden wurden bei Nierenerkrankungen bisher noch nicht miteinander verglichen. Außerdem ist die differenzierte Betrachtung der Nierenerkrankungen (akutes und chronisches Nierenversagen, Nierenersatztherapie, Nierentransplantation, Anämie) bisher nicht durchgeführt worden.

6. Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist durch eine Erhöhung der Blutglukose gekennzeichnet, die mit dem Risiko für schwere Begleit- und Folgeerkrankungen an zahlreichen Organsystemen verbunden ist. Im Verlauf ihrer Erkrankung entwickeln etwa ein Drittel der Diabetiker im Zusammenhang mit einer diabetischen Nephropathie Nierenkomplikationen. Gerade bei diesen Patienten ist die HbA1c-Bestimmung für die Behandlungsplanung von großer Bedeutung, um eine Progression der Nierenschädigung zu vermeiden oder zu verzögern. Insbesondere chronische Nierenerkrankungen erschweren aber die korrekte Messung und Interpretation dieses Wertes, da der HbA1c-Wert je nach Stoffwechsellage erhöht oder erniedrigt sein kann. Steigen die Blood-Urea-Nitrogen-Werte, so kann die Messung durch die Carbamylierung von Hämoglobin vor allem in der Ionenaustauschchromatographie und der Elektrophorese falsch hoch ausfallen. Tatsächlich ist der HbA1c-Wert bei Urämie methodenunabhängig erniedrigt. Es liegen Insulinresistenz, veränderte Insulinkinetik und verminderte Glukoneogenese vor, es kommt zu kürzerer Erythrozytenüberlebenszeit und hyporegenerativer Anämie. In dieser Arbeit wurden drei auf die International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Referenzmethode rückführbare Labormethoden miteinander verglichen. An einem Patientenkollektiv von 407 nephrologischen Proben und 217 Routineproben aus den Einsendungen an das Zentrallabor der Universität Bonn wurden mit Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Variant II von Biorad Laboratories[®]), Kapillarzonenelektrophorese (Capillarys[™] 2 Flex Piercing von Sebia[®]) und Immunoassay (Dimension RXL Max von Siemens Healthcare Diagnostics[®]) die HbA1c-Werte bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die HbA1c-Werte bei den Routineproben erwartungsgemäß um 0,2 bis 0,4 % höher lagen als bei den nephrologischen Proben. Zwischen den drei Messmethoden liegt außerdem eine sehr gute Korrelation vor. Die genauere Betrachtung der Kollektive hinsichtlich der Diagnosen zeigte bei chronischen Nierenerkrankungen einen höheren HbA1c bei den nicht dialysepflichtigen Stadien 1 bis 4, im dialysepflichtigen Stadium 5 ergeben sich niedrigere Messwerte. Das Kollektiv der nephrologischen Patienten ergab für alle drei Methoden eine schwach positive Korrelation zwischen HbA1c und Blood Urea Nitrogen-Konzentration (Capillarys[™] 2 Flex Piercing 0,191; Variant II 0,207; Dimension RXL Max 0,224). Ein Einfluss von carbamylisiertem Hämoglobin auf die HbA1c-Messung war vor allem für den Dimension RXL Max nicht zu erwarten, da Immunoassays gegenüber carbamylisiertem Hämoglobin als unempfindlich gelten. Für die Kapillarzonenelektrophorese und Hochleistungs-

flüssigkeitschromatographie gilt, dass die Geräte der neuen Generation wie der CapillaryTM 2 Flex Piercing und der Variant II nicht störanfällig gegenüber carbamylisiertem Hämoglobin sind. Bei der Einordnung in drei Diagnosegruppen („Diabetes mellitus“, „Prädiabetes“ und „Unauffällig“) lässt sich für den Variant II festhalten, dass mit dieser Messmethode signifikant mehr Proben als unauffällig eingeordnet werden als mit den anderen beiden Methoden. In 88 % der Fälle erfolgte in der Subpopulation „Prädiabetes“/„Unauffällig“ durch den Variant II die Diagnose „Unauffällig“. In der Praxis ist eine intraindividuelle Kontinuität der Messmethode zu empfehlen, um den Verlauf der Blutzuckereinstellung anhand des HbA1c so zuverlässig wie möglich verfolgen zu können. Alle drei Analysesysteme sind für die Messung bei Routinepatienten sowie bei nephrologischen Patienten in der klinischen Routine gut geeignet.

7. Literaturverzeichnis

Abrahamson M, Mason RW, Hansson H, Buttle DJ, Grubb A, Ohlsson K. Human cystatin C. *Biochem J* 1991; 273: 621-626

Adair GS, Bock AV, Field H Jr. The hemoglobin system: VI. The oxygen dissociation curve of haemoglobin. *J Biol Chem* 1925; 63: 529-545

Allen DW, Schroeder WA, Balog J. Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: a study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J Am Chem Soc* 1958; 80: 1628-1634

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33: S62-69

American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1994; 17: 616-623

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2012. *Diabetes Care* 2012; 35 Suppl 1: S11-63

American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 106-108

Armbruster DA. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin Chem* 1987; 33: 2153-2163

Ationu A. Carbamylation and glycosylation of haemoglobin in vitro: effects of cyanate and glucose. *Med Lab Sci* 1992; 49: 34-37

Atkinson DE. Functional roles of urea synthesis in vertebrates. *Physiological Zoology* 1992; 65: 243-267

Balion CM, Draisey TF, Thibert RJ. Carbamylated haemoglobin and carbamylated plasma protein in hemodialyzed patients. *Kidney International* 1998; 53: 488-495

Bannon P, Lessard F, Lepage R, Joly JG, Dufresne L. Glycated haemoglobin in uremic patients as measured by affinity and ion-exchange chromatography. *Clin Chem* 1984; 30: 485-486

Baynes JW, Bunn HF, Goldstein D, Harris M, Martin DB, Peterson C, Winterhalter K. National Diabetes Data Group: Report of the Expert Committee on Glycosylated Hemoglobin. *Diabetes Care* 1984; 7: 602-606

Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the second international consensus conference of the acute dialysis quality initiative (ADQI) group. *Critical Care* 2004; 8: R204-212

Bissé E, Huaman-Guillen P, Wieland H. Chromatographic Evaluation of Minor Hemoglobins: Clinical Significance of Hemoglobin A1d, Comparison with Hemoglobin A1c, and Possible Interferences. *Clin Chem* 1995; 41: 658-663

Bland J, Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-310

Bookchin RM, Gallop PM. Structure of haemoglobin A1c: nature of the N-terminal beta chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun* 1968; 32: 86-93

Brückel J, Joost HG, Kerner W, Müller UA, Schleicher E, Schulze M, Ziegler A. Stellungnahme der Deutschen Diabetes Gesellschaft, diabetesDE und des Kompetenznetzes Diabetes mellitus zur Verwendung des HbA1c-Wertes als Biomarker zur Diabetesdiagnose, 2010

Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-163

Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Nierenerkrankungen bei Diabetes im Erwachsenenalter – Kurzfassung Version 1.X. 2010. <http://www.diabetes.versorgungsleitlinien.de> (Zugriffsdatum: 10.1.2013)

Bundesverband Niere e.V. Der Nierenpatient: offizielles Organ des Bundesverbandes Niere e. V. Hämodialyse 2008; 33

Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM. The biosynthesis of human hemoglobin A1c. *J Clin Invest* 1976; 57: 1652-1659

Carrera T, Bonamusa L, Almirall L, Navarro JM. Should age and sex be taken into account in the determination of HbA1c reference range? *Diabetes Care* 1998; 21: 2193

Chachou A, Randoux C, Millart H, Chanard J, Gillery P. Influence of in vivo haemoglobin carbamylation on HbA1c measurement by various methods. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 321-326

Chang J, Hoke C, Ettinger B, Penerian G. Evaluation and interference study of hemoglobin A1c measured by turbidimetric inhibition immunoassay. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 274-278

Chevenne D, Fonfrede M, Ducroq R, Chauffert M, Trivin F. Uremia and HbA1c measured by high-performance liquid chromatography. *Diabetes Care* 1998; 21: 463-464

CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009; 113: S1-130

Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 1976; 16: 31-41

Coelho S, Rodrigues A. Hemoglobin A1c in Patients on Peritoneal Dialysis: How Should We Interpret It? *Ther Apher Dial* 2014

Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation. *Diabetes Care* 2007; 30: 2399-2400

Cotton F, Malaviolle X, Vertongen F, Gulbis B. Evaluation of an automated capillary electrophoresis system in the screening for hemoglobinopathies. *Clin Lab* 2009; 55: 217-221

Danne T, Mueller-Wieland D, Lackner K, Schleicher E. HbA1c – bisher übliche Einheiten können neben den neuen weiterverwendet werden. Empfehlung der deutschen Diabetes-Gesellschaft, diabetesDE und der deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. *Dtsch Arztebl* 2009; 106: 1633

Davenport A, Jones SR, Goel S, Astley JP, Hartog M. Differentiation of acute from chronic renal impairment by detection of carbamylated haemoglobin. *Lancet* 1993; 341: 1614-1617

Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices. *Official Journal of the European Communities* 1998; 331: 1-3

Dix D, Cohen P, Kingsley S, Lea MJ, Senkbeil J, Sexton K. Interference by lactescence in glycohemoglobin analysis. *Clin Chem* 1979; 25: 494-495

Doelman CJ, Siebelder CW, Nijhof WA, Weykamp CW, Janssens J, Penders TJ. Capillary electrophoresis system for hemoglobin A1c determinations evaluated. *Clin Chem* 1997; 43: 644-648

Dusan K, Kasicka V, Cottet H. Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing. *Anal Biochem* 2011; 413: 8-15

Eckardt KU, Bärthlein B, Baid-Agrawal S, Beck A, Busch M, Eitner F, Ekici AB, Floege J, Gefeller O, Haller H, Hilge R, Hilgers KF, Kielstein JT, Krane V, Köttgen A, Kronenberg F, Oefner P, Prokosch HU, Reis A, Schmid M, Schaeffner E, Schultheiss UT, Seuchter SA, Sitter T, Sommerer C, Walz G, Wanner C, Wolf G, Zeier M, Titze S. The German Chronic Kidney Disease (GCKD) study: design and methods. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1454-1460

Eckardt KU, Kim J, Kronenberg F, Aljama P, Anker SD, Canaud B, Molemans B, Stenvinkel P, Schernthaner G, Ireland E, Fouqueray B, Macdougall IC. Hemoglobin Variability does not predict mortality in european hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 1765-1775

Eckfeldt JH, Bruns DE. Another step toward standardization of methods for measuring hemoglobin A1c. *Clin Chem* 1997; 43: 1811-1813

El-Agouza I, Abu Shahla A, Sirdah M. The effects of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol* 2002; 24: 285-289

Feldman HA, Singer I. Endocrinology and metabolism in uremia and dialysis: a clinical review. *Medicine* 1974; 54: 345-376

Filser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly. *Am J Kidney Dis* 2001; 37: 79-83

Flückiger R, Harmon W, Meier W, Loo S, Gabbay KH. Hemoglobin carbamylation in uremia. *N Engl J Med* 1981; 304: 823-827

Flückiger R. Nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen bei Diabetes mellitus: Bedeutung für die Therapieüberwachung und die Entwicklung diabetischer Spät komplikationen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1989; 70

Forsham PH. Diabetes Mellitus: A Rational Plan for Management. *Postgrad Med* 1982; 71: 139-154

Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clin Diabetes* 2008; 26: 77-82

Gabbay KH, Hasty K, Breslow JL, Ellison RC, Bunn HF, Gallop PM. Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 44: 859-864

Genc S, Omer B, Aycan-Ustyol E, Ince N, Bal F, Gurdol F. Evaluation of turbidimetric inhibition immunoassay (TINIA) and HPLC methods for glyated haemoglobin determination. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 481-485

Gerritsma J, Sinnige D, Drieze C, Sittrop B, Houtsma P, Hulshorst-Jansen N, Huisman W. Quantitative and qualitative analysis of haemoglobin variants using capillary zone electrophoresis. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 380-389

Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986; 32: B64-70

Goldstein DE, Peth SB, England JD, Hess RL, Da Costa J. Effects of acute changes in blood glucose on HbA1c. *Diabetes* 1980; 29: 623-628

Haeckel R, Brinck U, Colic D, Janka HU, Püntmann I, Schneider J, Viebrock C. Comparability of blood glucose concentrations measured in different sample systems for detecting glucose intolerance. *Clin Chem* 2002; 48: 936-939

Hanas R. Psychological impact of changing the scale of reported HbA(1c) results affects metabolic control. *Diabetes Care* 2002; 25: 2110-2111

Hansen KW, Erlandsen A, Helleberg K, Danielsen H. Uremia and HbA1c. *Diabetes Care* 1997; 20: 1341-1342

Hasuike Y, Nakanishi T, Maeda K, Tanaka T, Inoue T, Takamitsu Y. Carbamylated hemoglobin as a therapeutic marker in hemodialysis. *Nephron* 2002; 91: 228-234

Hayashino Y, Fukuhara S, Akiba T, Akizawa T, Asano Y, Saito A, Bragg-Gresham JL, Ramirez SP, Port FK, Kurokawa K. Diabetes, glycaemic control and mortality risk in patients on haemodialysis: the Japan Dialysis Outcomes and Practice Pattern Study. *Diabetologia* 2007; 50: 1170-1177

Higgins TN, Blakney GB, Dayton J. Analytical evaluation of the Bio-Rad variant II automated HbA(1C) analyzer. *Clin Biochem* 2001; 34: 361-365

Higgins PJ, Bunn HF. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of haemoglobin. *J Biol Chem* 1981; 256: 5204-5208

Hoberman HD. Post-translational modification of hemoglobin in alcoholism. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 113: 1004-1009

Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, Hoshino T, John WG, Kobold U, Little R, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Susanto F, Takei I, Thienpont L, Umemoto M, Wiedmeyer HM. IFCC reference system for measurement of haemoglobin A1c in human blood and the national standard schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004; 50: 166-174

Hollander P. The Case for Tight Control in Diabetes. *Postgrad Med* 1984; 75: 80-87

Holmquist WR, Schroeder WA. A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A1c. *Biochemistry* 1966; 5: 2489-2503

Hoshino T, Okahashi M, Arai H. Survey and assessment of the actual state of routine measurement of glycohaemoglobin/GHb by commercial methods: warning to the users and the providers. *J Pharm Biomed Anal* 1997; 15: 1551-1562

Huisman TH, Dozy AM. Studies on the heterogeneity of haemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *J Lab Clin Med* 1962; 60: 302-319

Inaba M, Okuno S, Kumeda Y, Yamada S, Imanishi Y, Tabata T, Okamura M, Okada S, Yamakawa T, Ishimura E, Nishizawa Y. Glycated albumin is a better glycemic indicator than glycated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effects of anemia and erythropoietin injection. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 896-903

Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Zentrallabor der Universitätsklinik Bonn, 2013: Leistungsverzeichnis des Zentrallabors. <http://www.meb.uni-bonn.de/klinbiochem/inhalt.htm> (Zugriffsdatum: 12.1.2013)

Jaisson S, Leroy N, Meurice J, Guillard E, Gillery P. First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing[®] (Sebia) as a new analyzer for HbA1c assay by capillary electrophoresis. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 1769-1775

Jenkins M, Ratnaïke S. Capillary electrophoresis of hemoglobin. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 747-754

Jeppson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M, Weykamp C. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 78-89

Jörris A, Frei U. Akutes Nierenversagen. *Internist* 2001; 42: 379-403

Jovanovic L, Peterson CM. The clinical utility of glycosylated haemoglobin. *Am J Med* 1981; 70: 331-338

Kalantar-Zadeh K, Kopple JD, Regidor DL, Jing J, Shinaberger CS, Aronovitz J, McAllister CJ, Whellan D, Sharma K. A1C and survival in maintenance hemodialysis patients. *Diabetes Care* 2007; 30: 1049-1055

Kierdorf HP, Seeliger S. Acute renal failure in multiple organ dysfunction syndrome. *Kidney Blood Press Res* 1997; 20: 164-166

Kleinhauer E, Kohne E, Kulozik AE. Anomale Hämoglobine und Thalassämiesyndrome: Grundlagen und Klinik. Landsberg; ecomed Verlagsgesellschaft, 1996

Knapp ML, Mayne PD. Development of an automated kinetic Jaffé method designed to minimise bilirubin interference in plasma creatinine assays. *Clin Chim Acta* 1987; 168: 239-246

Kobold U, Jeppson JO, Dülffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K. Candidate reference methods for HbA1c based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997; 43: 1944-1951

Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A. Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1976; 295: 417-420

Koskinen LK, Korpela MM, Lahtela JT, Laippala PJ, Pikkarainen PH, Koivula TA. Effect of acetaldehyde and acetylsalicylic acid on HbA1c chromatography in the FPLC method with Mono C cation exchanger. *Clin Chim Acta* 1998; 275: 53-61

Koskinen LK, Lahtela JT, Koivula TA. Fetal haemoglobin in diabetic patients. *Diabetes Care* 1994; 17: 828-831

Kribben A, Philipp T. Diagnostik des akuten Nierenversagens. *Med Klinik* 1997; 92: 327-328

Kruskal WH, Wallis WA. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 1952; 47: 583-621

Landaw SA. Homeostasis, survival, and red cell kinetics: measurement and imaging of red cell production. In: Hoffman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology: basic principles and practice*, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1995: 448-458

Larsen ML, Horder M, Mogensen EF. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; 323: 1021-1025

Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: An improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 2002; 48: 699-707

Lavalard E, Szymezak J, Leroy N, Gillery P. Evaluation of Variant II analyzer equipped with the new 270-2101 NU kit (Bio-Rad) for HbA_{1c} assay. *Ann Biol Clin* 2009; 67: 55-65

Little RR, Rohlfing CL, Tennill AL, Hanson SE, Conolly S, Higgins T, Wiedmeyer CE, Weykamp CW, Krause R, Roberts W. Measurement of HbA_{1c} in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2013; 418: 73-76

Little RR, Tennill AL, Rohlfing C, Wiedemeyer HM, Khanna R, Goel S, Agrawal A, Madsen R, Goldstein DE. Can glycohemoglobin be used to assess glycemic control in patients with chronic renal failure? *Clin Chem* 2002; 48: 784-786

Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Naito HK, Goldstein DE. Interlaboratory comparison of glycohemoglobin results: College of American Pathologists survey data. *Clin Chem* 1991; 37: 1725-1729

Mann HB, Whitney DR. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Annals of Mathematical Statistics* 1947; 18: 50-60

Marks V. Blood glucose: its measurement and clinical importance. *Clin Chim Acta* 1996; 251: 3-17

Martina WV, Martijn EG, van der Molen M, Schermer JG, Muskiet FAJ. B-N-terminal glycohemoglobins in subjects with common hemoglobinopathies: relation with fructosamine and mean erythrocyte age. *Clin Chem* 1993; 39: 2259-2265

Matteucci E, Cinapri V, Rossi L, Lucchetti A, Giampietro O. Glycated hemoglobin measurement: intermethod comparison. *Diabetes Nutr Metab* 2001; 14: 217-219

Matthaei S, Bierwirth R, Fritsche A, Gallwitz B, Häring HU, Joost HG, Kellerer M, Kloos C, Kunt T, Nauck M, Schernthaner G, Siegel E, Thienel F. Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2. *Diabetologie* 2011; 6: 131-136

Metha RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. 2007; 11: 31

Moridani MY, Verjee Z, Allen LC. Analytical evaluation of hemoglobin A(1c) dual kit assay on Bio-Rad Variant II: an automated HPLC hemoglobin analyzer for the management of diabetic patients. *Clin Biochem* 2003; 36: 317-320

Morioka T, Emoto M, Tabata T, Shoji T, Tahara H, Kishimoto H, Ishimura E, Nishizawa Y. Glycemic control is a predictor of survival for diabetic patients on hemodialysis. *Diabetes Care* 2001; 24: 909-913

Mosca A, Goodall I, Hoshino T, Jeppsson JO, John WG, Little RR, Miedema K, Myers GL, Reinauer H, Sacks DB, Weykamp CW. Global standardization of glycate haemoglobin measurement: the position of the IFCC Working Group. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1077-1080

Mosca A, Paleari R, Trapolino A, Capani F, Pagano G, Plebani M. A re-evaluation of glycohemoglobin standardisation: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 243-248

Nakao T, Matsumo H, Okada T, Han M, Hidaka H, Yoshino M, Shino T, Yamada C, Nagaoka Y. Influence of erythropoietin treatment on hemoglobin A1c levels in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *Intern Med* 1998; 37: 826-830

Nathan DM, Francis TB, Palmer JL. Effects of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29: 466-469

Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The Clinical Information Value of the Glycosylated Hemoglobin Assay. *N Engl J Med* 1984; 310: 341-346

National Kidney Foundation – K/DOQI. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. *Am Jm Kidney Dis* 2002; 39: S1-266

Nordin G, Dybkaer R. Recommendation for term and measurement unit for “HbA1c”. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 1081-1082

Oimomi M, Ishikawa K, Kawasaki T, Kubota S, Yoshimura Y, Baba S. Carbamylation of haemoglobin in renal failure and clinical aspects. *Metabolism* 1984; 33: 999-1002

Oomichi T, Emoto M, Tabata T, Morioka T, Tsujimoto Y, Tahara H, Shoji T, Nishizawa Y. Impact of glycemic control on survival of diabetic patients on chronic regular hemodialysis: a 7-year observational study. *Diabetes Care* 2006; 29: 1496-1500

Panzer S, Kronik G, Lechner K, Bettelheim P, Neumann E, Dudczak R. Glycosylated hemoglobins (Ghb): an index of red cell survival. *Blood* 1982; 59: 1348-1350

Passing H, Bablok W. A New Biometrical Procedure for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-720

Payne RB. Creatinine clearance and glomerular filtration rate. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 98-99

Peacock TP, Shihabi ZK, Bleyer AJ, Dolbare EL, Byers JR, Knovich MA, Calles-Escandon J, Russel GB, Freedman BI. Comparison of glycosylated albumin and haemoglobin A1c levels in diabetic subjects on hemodialysis glycosylated albumin in diabetic ESRD. *Kidney Int* 2008; 73: 1062-1068

Peghini RE, Fehr J. Anämieabklärung. *Schweiz Med Forum* 2002; 37: 857-888

Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992; 38: 1933-1953

Perutz MF, Rossman MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of haemoglobin: a three – dimensional Fourier synthesis at 5.5Å resolution, obtained by x – ray analysis. *Nature* 1960; 185: 416-422

Rahbar S. An abnormal haemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 1968; 22: 296-298

Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual haemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 36: 838-843

Reinauer H. Biochemistry of protein glycation in diabetes mellitus. *Klin Lab* 1993; 39: 984-987

Reinauer H, Niederau CM. Glykosylierte Hämoglobine - Bildung und Beseitigung der Aldiminform. *Lab Med* 1984; 8: 68-73

Ricks J, Molnar MZ, Kovesdy CP, Shah A, Nissenson AR, Williams M, Kalantar-Zadeh K. Glycemic control and cardiovascular mortality in hemodialysis patients with diabetes: a 6-year cohort study. *Diabetes* 2012; 61: 708-715

Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little R, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 2002; 25: 275-278

Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, Grotz VL, Tennill A, England J, Madsen R, Goldstein D. Biological Variation of Glycohemoglobin. *Clin Chem* 2002; 48: 1116-1118

Rose AM, Tongate C, Valdes R Jr. A haemoglobin A1c immunoassay method not affected by carbamylated haemoglobin. *Ann Clin Lab Sci* 1995; 25: 13-19

Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, MacLaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48: 436-472

Sakurabayashi I, Watano T, Yonehara S, Ishimaru K, Hirai K, Komori T, Yagi M. New enzymatic assay for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2003; 49: 269-274

Schernthaner G, Sämann M. Probleme der HbA1c-Bestimmung bei Nierenversagen. *Diabetesforum* 2010

Schernthaner G, Stummvoll HK, Müller MM. Glycosylated haemoglobin in chronic renal failure. *Lancet* 1979; 1: 774

Schnedl WJ, Reisinger EC, Katzensteiner S, Lipp RW, Schreiber F, Hopmeier P, Krejs GJ. Haemoglobin O Padova and falsely low haemoglobin A1c in a patient with type 1 diabetes. *J Clin Pathol* 1997; 50: 434-435

Schneider CA, Ferrannini E, DeFronzo R, Schernthaner G, Yates J, Erdmann E. Effect of Pioglitazone on cardiovascular outcome in diabetes and chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19: 182-187

Schulze MB, Holmberg C, Hoffmann K, Boeing H, Joost HG. Kurzfragebogen zur Bestimmung des Diabetesrisikos auf Grundlage des Deutschen Diabetes-Risiko-Scores. *Ernährungs-Umschau* 2007; 698-703

Schwartz GJ, Brion LP, Spitzer A. The use of plasma creatinine concentration for estimating glomerular filtration rate in infants, children, and adolescents. *Pediatr Clin North Am* 1987; 34: 571-590

Shaw AB. Haemolysis in chronic renal failure. *Br Med J* 1967; 2: 213-216

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global Estimates of the Prevalence of Diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 4-14

Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int* 1985; 28: 830-838

Shiba T, Yano M, Maehata E, Kiyose H, Kotaki Y, Fukuzawa N, Hagura R. Standardization of HbA1c value and its comparison to immunoassay--two years of experience. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 32: 175-182

Smith WGJ, Holden M, Benton M, Brown CB. Carbamylated haemoglobin in chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 1988; 178: 297-304

Smith WGJ, Holden M, Benton M, Brown CB. Glycosylated and Carbamylated Haemoglobin in Uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4: 96-100

Spearman C. The proof and measurement of association between two things. *Amer J Psychol* 1904; 15: 72-101

Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL. Disorders of Hemoglobin: Genetics, pathophysiology and clinical management. Cambridge; University Press 2001

Stim J, Shaykh M, Anwar F, Ansari A, Arruda JA, Dunea G. Factors determining hemoglobin carbamylation in renal failure. *Kidney Int* 1995; 48: 1605-1610

Suhonen L, Stenman UH, Koivisto V, Teramo K. Correlation of HbA1c, glycated serum proteins and albumin, and fructosamin with the 24-h glucose profile of insulin-dependent pregnant diabetics. *Clin Chem* 1989; 35: 922-925

Svendsen PA, Christiansen JS, Andersen AR, Welinder B, Nerup J. Fast glycosylation of hemoglobin. *Lancet* 1979; 1: 603

Szymanowicz A, Neyron MJ. Comparative study of G8 glycated haemoglobin testing system and the Integra 800 immunoassay. *Ann Biol Clin* 2010; 68: 227-233

Szymezak J, Leroy N, Lavalard E, Gillery P. Interference of labile glycated hemoglobin on HbA(1c) assay by a high pressure liquid chromatography method. *Ann Biol Clin* 2008; 66: 459-463

Tegos C, Beutler E. Glycosylated hemoglobin A2 components. *Blood* 1980; 56: 571-572

The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1999; 22: 5-19

Tiran A, Pieber T, Tiran B, Halwachs-Baumann G, Dobnig H, Gruebelnig H, Wilders-Truschnig MM. Automated determination of glycated hemoglobin: comparative evaluation of five assay systems. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 128-134

Tran DV, Lyon AW, Higgins TN, Wesenberg JC, Vandergouwe L, Wiley CL, Cembrowski GS. Use of serial patient hemoglobin A1c differences to determine long-term imprecision of immunoassay and high-performance liquid chromatography analyzers. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 424-428

Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971; 284: 353-357

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-853

USRDS. USRDS 2008 Annual Data Report, 2008

Weiner K. Whole blood glucose. What are we actually measuring? *Ann Clin Biochem* 1995; 32: 1-8

Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO, Goodall I, Miedema K, Myers G, Reinauer H, Sacks DB, Slingerland R, Siebelder C. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: a 6-year progress report. *Clin Chem* 2008; 54: 240-248

Weykamp C, Waenink-Wiegers H, Kemna E, Siebelder C. HbA1c: performance of the Sebia Capillarys 2 Flex Piercing. *Ann Biol Clin* 2009; 67: 55-65

Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Glycohemoglobin: Comparison of 12 analytical methods, applied to lyophilized haemolysates by 101 laboratories in an external quality assurance programme. *Ann Clin Biochem* 1993;30:169-174

Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Influence of haemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 1993; 39: 1717-1723

Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem* 1993; 39: 138-142

Widness JA, Rogler-Brown TL, McCormick KL, Petzold KS, Susa JB, Schwartz HC, Schwartz R. Rapid fluctuations in glycohemoglobin (hemoglobin A1c) related to acute changes in glucose. *J Lab Clin Med* 1980; 95: 386-394

Williams ME, Lacson E Jr, Teng M, Ofsthun N, Lazarus JM. Hemodialyzed type I and type II diabetic patients in the US: characteristics, glycemic control, and survival. *Kidney Int* 2006; 70: 1503-1509

Wilson DH, Bogacz JP, Forsythe CM, Turk PJ, Lane TL, Gates RC, Brandt DR. Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott IMx analyzer: novel approaches for separation and detection. *Clin Chem* 1993; 39: 2090-2097

Winocour PH, Bhatnagar D, Kalsi P, Hillier VF, Anderson DC. Relative clinical usefulness of glycosylated serum albumin and fructosamine during short-term changes in glycemic control in IDDM. *Diabetes Care* 1989; 12: 665-672

World Health Organisation. Nutritional anemias: report of a WHO scientific group. WHO 1968

World Health Organisation. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation,- 2011: www.who.int/diabetes/.../report-hba1c_2011.pdf (Zugriffdatum: 15.10.2014)

Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiological Reviews* 2000; 80: 1107-1213

8. Danksagung

Ich möchte allen Personen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren, meinen Dank aussprechen, insbesondere:

Herrn PD Dr. med B. Zur für die Überlassung des Themas zur Bearbeitung, sowie für die wertvollen Ratschläge und Hinweise bei der Anfertigung dieser Arbeit,

Frau Dr. med U. Klarmann-Schultz für die statistische Beratung,

Frau A. Cieslak aus dem Medizinische Dekanat für die Durchsicht hinsichtlich äußerer Form der Dissertationsschrift,

Frau J. Papkoj-Bebec für ihre technische Unterstützung,

den Mitarbeiterinnen des Zentrallabors des Universitätsklinikums Bonn für die Unterstützung bei der Durchführung der Messungen,

den Firmen Biorad Laboratories[®], Sebia[®] und Siemens Healthcare Diagnostics[®] für die Bereitstellung von Geräten und Material.