Utilizzo di un pool di sangue umano fresco congelato per la valutazione intralaboratorio dell'imprecisione della determinazione dell'emoglobina glicata

Federica Braga[1,2], Alberto Dolci[2], Luisa Scapellato[2], Andrea Mosca[1,3], Mauro Panteghini[1,2]
[1]Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano
[2]Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche, Ospedale 'Luigi Sacco' e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica, Dipartimento di Scienze Cliniche, Università degli Studi, Milano
[3]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Fresh-frozen human whole blood for intralaboratory evaluation of imprecision of glycated hemoglobin determination. Glycated hemoglobin (HbA_{1c}) has a key role for the assessment of glycemic state in diabetic subjects. To guarantee the clinical reliability of HbA_{1c} methods regular IQC programs are mandatory. These programs may give immediate information on the reliability of the analytical system used in the laboratory, providing that employed materials are stable and commutable. In this study we investigated two different preparations to be used as IQC material for HbA_{1c}, i.e. a classical lyophilized material (CQI1) and a freshly collected whole blood pool stored at -20 °C (CQI2). We also checked the stability of CQI2 at -20 °C compared to -80 °C storage. HbA_{1c} was determined by an immunoturbidimetric assay on Roche Cobas Integra. The mean (±SD) HbA_{1c} concentrations in the two materials were 9.1%±0.05 in CQI1 and 6.9%±0.05 in CQI2, respectively. In a following period of 20 weeks the HbA_{1c} recovery was between 94.6% and 105.7% for CQI1 and between 94.4% and 109.4% for CQI2. Most of CQI1 fluctuations were paired to similar fluctuations of CQI2, proving that these changes were independent of the material properties. When compared with results obtained at -80 °C storage, the HbA_{1c} concentrations in the CQI2 at -20 °C were stable over the whole study period. In conclusion, our findings demonstrate that fresh-frozen pooled whole blood stored at -20 °C is a suitable and cheap material for use in the IQC programmes for HbA_{1c}.

INTRODUZIONE

L'emoglobina glicata o ßN1-deossifruttosil-emoglobina (HbA_{1c}) è il prodotto della reazione non enzimatica di condensazione tra il gruppo aldeidico del glucosio e il gruppo amminico della valina terminale della catena β dell'emoglobina A_0 (1). La sua concentrazione ematica è quindi funzione della glicemia media nelle 6-8 settimane precedenti il prelievo. Per questo motivo, il monitoraggio delle concentrazioni di HbA_{1c} è divenuto un parametro irrinunciabile nella valutazione del grado di controllo glico-metabolico nella malattia diabetica e nel predire il rischio di complicanze vascolari di questi soggetti (2). Inoltre, secondo le più recenti raccomandazioni della Società Americana di Diabetologia (ADA), è stato assegnato alla HbA_{1c} anche un ruolo diagnostico (3). In particolare, una concentrazione di HbA_{1c} ≥6,5% (47 mmol/mol) è oggi considerata uno dei criteri per porre la diagnosi di malattia diabetica (4).

L'impiego in clinica delle metodiche per la determinazione dell'HbA_{1c}, richiede quindi un attento controllo delle loro caratteristiche di attendibilità analitica attraverso l'attuazione di adeguati programmi di CQI (5). Luraschi et al. (6) hanno dimostrato che l'implementazione giornaliera di un CQI attraverso l'utilizzo di materiali appropriati, in aggiunta alla partecipazione a programmi di VEQ con esercizi di comparazione tra i metodi, può fornire importanti informazioni riguardo al mantenimento delle prestazioni della determinazione dell'HbA_{1c} entro i limiti di accettabilità stabiliti. E' importante rilevare che l'attuazione del CQI dovrebbe preferibilmente basarsi sulla effettuazione di due programmi separati, dedicati rispettivamente alla verifica dell'esattezza nell'ottica del concetto di riferibilità metrologica e alla valutazione dell'imprecisione analitica (CQI-V) (5). Per quest'ultima, la determinazione quotidiana dell'analita in questione su un materiale di controllo a concentrazione intorno al livello decisionale dell'analita è quella che può fornire i risultati più adeguati (7-9). Nel caso specifico della HbA_{1c} non essendo purtroppo disponibili in commercio materiali di controllo adeguati per quest'ultima applicazione, è difficile operare questo tipo di valutazione nella modalità corretta.

Scopo di questo studio è stata la valutazione di due materiali (uno liofilo e uno ottenuto da sangue intero fresco) per il loro possibile impiego in un CQI-V relativo alla determinazione della HbA_{1c}.

MATERIALI E METODI

Sono stati valutati due materiali di controllo, uno liofilo (CQI1) e uno ottenuto come pool di sangue intero fresco (CQI2). Il CQ1 era costituito da emolisato di origine umana, successivamente liofilizzato, crioprotetto e stabilizzato (10). Il giorno della sua preparazione, 60 fiale da 0,2 mL erano ricostituite e trasferite in un'unica provetta ad ottenere un volume finale di materiale ricostituito pari a 12 mL. Un'aliquota era subito analizzata in triplicato per

determinare la concentrazione di HbA_{1c} nel CQI1. Successivamente, altre 120 aliquote da circa 100 µL del CQI1 erano congelate a -20 °C. Per la preparazione del CQI2 erano selezionati 5 campioni di sangue intero in EDTA, con concentrazioni di HbA_{1c} di ~7,0%, pervenuti in laboratorio come richieste ordinarie e resi opportunamente anonimi, per ottenere un volume finale di pool pari a ~15 mL. Anche il CQI2 era prima analizzato in triplicato per determinare il valore di HbA_{1c} e successivamente congelato a -20 °C. Inoltre, aliquote di CQI2 in un numero sufficiente erano anche conservate a -80 °C.

Per la determinazione della HbA_{1c} durante ogni giornata lavorativa (per un periodo totale di 20 settimane), ogni sera del giorno precedente un'aliquota di entrambi i materiali era tolta dal congelatore e trasferita a 4 °C per tutta la notte. La mattina successiva le due aliquote erano lasciate a temperatura ambiente per almeno 30 min ed analizzate. Inoltre, un'aliquota di CQI2 conservata a -80 °C era analizzata con periodicità quindicinale per poter confrontare la stabilità dello stesso materiale conservato a -20 °C e a -80 °C.

La HbA_{1c} era determinata con un metodo immunoturbidimetrico omogeneo competitivo completamente automatizzato sul sistema Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics) (10). Il calibratore utilizzato nel metodo è riferibile al sistema metrologico di riferimento IFCC per la determinazione dell'HbA_{1c} con una incertezza nota e dichiarata (11). Per la validazione di ogni serie analitica era determinato il controllo dell'esattezza a due livelli (HbA_{1c} Control N e HbA_{1c} Control P, Roche Diagnostics) specifico per il saggio utilizzato.

L'analisi dei dati è stata condotta tenendo presente che un andamento fluttuante è indice di una variabilità prevalentemente analitica (imprecisione del metodo), mentre un allontanamento costante, progressivo e unidirezionale nel tempo dal valore "target" ottenuto sul materiale fresco (deriva) può essere di fatto riconducibile ad un'instabilità del materiale valutato.

RISULTATI

Il valore assegnato ai due materiali, analizzati a fresco prima delle suddivisioni in aliquote, è risultato (media±SD) di 9,1%±0,05 per il CQI1 e di 6,9%±0,05 per il CQI2. Il valore medio di HbA_{1c} determinata sul CQI1 lungo tutta la durata dello studio (20 settimane, n=94) è risultato pari a 9,0% (CV 2,4%), mentre il valore medio del CQI2, conservato a -20 °C, è risultato pari a 6,9% (CV 2,6%). Sulle aliquote di CQI2 conservate a -80 °C, la concentrazione media di HbA_{1c} è risultata pari a 6,9% (CV 1,6%, n=11).

Il recupero della HbA_{1c}, espresso come percentuale rispetto al valore assegnato al campione fresco, è risultato per tutta la durata dello studio compreso tra un minimo di 94,6% e un massimo del 105,7% per il CQI1, e tra 94,4% e 109,4% per il CQI2. Per il CQI2 conservato a -80 °C, il recupero era compreso tra 96,8% e 102,1%.

L'analisi dei risultati delle determinazioni di HbA_{1c} sui differenti materiali rendeva possibile evidenziare un andamento fluttuante delle determinazioni, indice di una variabilità imputabile esclusivamente all'imprecisione del metodo e non ad eventuale instabilità dei materiali analizzati (Figura 1). Inoltre, l'andamento dei valori di CQI1 era sostanzialmente sovrapponibile a quello dei valori di CQI2, confermando l'indipendenza di tali variazioni dalle caratteristiche dei materiali. Lo scostamento percentuale del risultato di HbA_{1c} dell'ultima aliquota analizzata (dopo 20 settimane di congelamento) era pari a +1,7% per il CQI1 e -1,1% per il CQI2. Gli eventi di intervento strumentali, quali calibrazioni, cambio di lotto dei reagenti, interventi tecnici di manutenzione ordinaria o straordinaria, parevano influenzare in maniera simile gli andamenti relativi ai due materiali, senza specifici comportamenti di questi ultimi, confermandone ulteriormente la stabilità (Figura 2).

La differenza media assoluta tra i risultati sulle aliquote di CQI2 conservate a -20 °C e a -80 °C, determinate negli stessi giorni (n=10), era pari a -0,04% in concentrazione di HbA_{1c}, con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra -0,06% e -0,01%. La Figura 1 mostra l'ottima concordanza dei dati ottenuti sul materiale CQI2 alle due condizioni di conservazione fino al 140° giorno di analisi.

DISCUSSIONE

Per la corretta realizzazione di un programma di CQI è necessario l'impiego di materiali di controllo di provata stabilità e con proprietà chimico-fisiche il più possibile simili ai campioni biologici dei pazienti, cioè dotati di

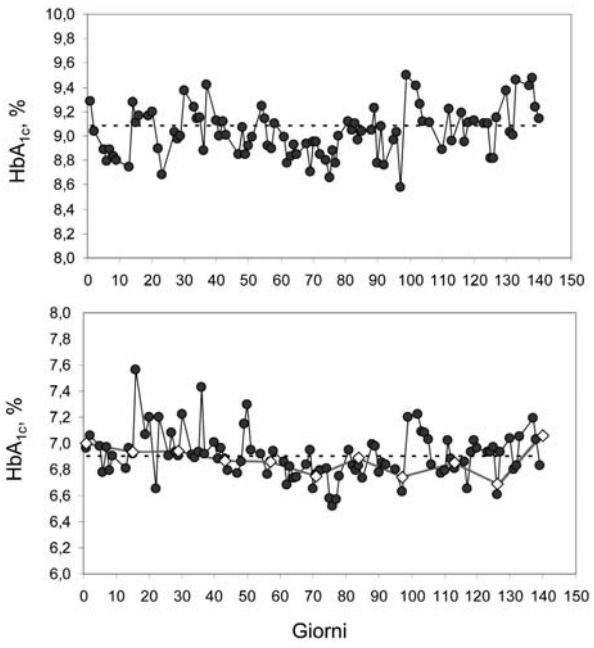


Figura 1
Risultati delle determinazioni dei materiali di controllo valutati (CQI1, sopra; CQI2, sotto), analizzati in ogni serie analitica dell'attività ordinaria del laboratorio per circa 5 mesi consecutivi. La linea tratteggiata centrale indica la concentrazione di HbA_{1c} determinata sul materiale fresco. Per il materiale CQI2 i rombi indicano l'andamento del campione conservato a -80 °C.

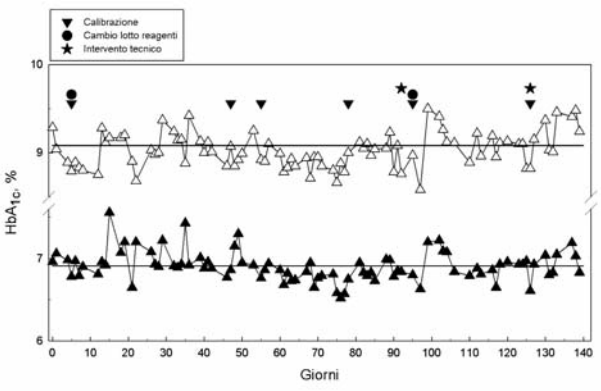


Figura 2
Rielaborazione della Figura 1 per individuare gli eventi di intervento sull'analizzatore utilizzato per le misure di HbA_{1c} (nuove calibrazioni, cambio di lotto dei reagenti, interventi tecnici di manutenzione ordinaria e straordinaria) nel corso dello svolgimento dello studio. La linea continua indica la concentrazione di HbA_{1c} determinata sul materiale fresco (CQI1, sopra; CQI2, sotto).

commutabilità (9). Infatti, la mancanza di commutabilità e/o l'instabilità dei materiali utilizzati possono introdurre variabili, a volte difficilmente evidenziabili, rendendo i programmi non solo poco efficaci, ma a volte confondenti. Nello specifico caso della HbA_{1c}, data l'importante ricaduta della qualità analitica delle metodiche utilizzate per la sua determinazione sull'efficacia clinica dell'esame e il ristretto margine di errore concesso (12), è indispensabile caratterizzare attentamente i materiali di controllo prima che questi vengano impiegati nell'ambito di programmi di CQI e VEQ (6, 10).

In questo lavoro abbiamo valutato il possibile impiego di un pool di sangue intero fresco congelato a -20 °C come alternativa ai più tradizionali materiali di controllo liofili per l'applicazione in un CQI-V. Tutti i parametri valutati (stabilità, percentuale di scostamento dei valori ottenuti al termine delle 20 settimane dello studio, recupero di HbA_{1c}) hanno permesso di dimostrare l'interscambiabilità di impiego dei due tipi di materiale per l'implementazione di un programma di CQI-V. Abbiamo anche valutato la stabilità del CQI2, conservato a -20 °C, paragonandola ai dati sullo stesso materiale conservato a -80 °C, considerando quest'ultima la temperatura di conservazione ideale per il mantenimento di tutte le caratteristiche chimiche e fisiche del sangue intero fresco per periodi fino a 10 anni (13).

Premesso che la stabilità dell'HbA_{1c} nel campione analizzato appare dipendente dal principio metodologico utilizzato per la sua determinazione, un campione di sangue intero rimane stabile a temperatura ambiente solo per pochi giorni, se analizzato con metodi cromatografici a scambio ionico, e per circa una settimana, se analizzato con metodi colorimetrici e in cromatografia di affinità (14). Alla temperatura di 4 °C è stata dimostrata una buona stabilità per almeno 8 giorni per la maggior parte dei metodi disponibili (14), mentre, a nostra conoscenza, non esistono dati in letteratura riguardanti la stabilità di un campione di sangue intero quando conservato a -20 °C, limitandone di fatto fino ad ora il possibile impiego in un CQI. Riteniamo, quindi, che i risultati del presente studio rappresentino un importante contributo alla conoscenza della stabilità della HbA_{1c} in due differenti tipi di materiali per CQI, anche se i dati ottenuti sono impiegabili limitatamente al solo metodo immunochimico utilizzato in questo lavoro. Considerando che non tutti i laboratori clinici possiedono un congelatore a -80 °C, è inoltre un importante risultato pratico aver dimostrato la sostanziale concordanza dei valori ottenuti per il materiale CQI2, quando conservato a -20 °C e a -80 °C.

In termini pratici, questo studio dimostra la possibilità di utilizzare un materiale di controllo costituito da sangue intero fresco congelato a -20 °C per l'implementazione di un CQI-V per la HbA_{1c}, di fatto più economicamente conveniente rispetto all'impiego di un materiale liofilo, peraltro di difficile ottenimento. Oltre a possedere per definizione il requisito della commutabilità, materiali di questo tipo sono facilmente ottenibili in qualsiasi realtà di laboratorio e più pratici da impiegare rispetto a materiali liofili, che devono essere ogni volta ricostituiti.

Un aspetto critico dell'applicazione del protocollo descritto nel lavoro è lo scongelamento delle aliquote dei materiali di controllo. Per rigore metodologico è stato applicato un protocollo di scongelamento graduale molto stringente, mantenendo il campione per una fase intermedia di 12 ore a 4 °C. Sembrerebbe, tuttavia, dai dati disponibili in letteratura, che questa procedura di scongelamento non sia del tutto necessaria, potendo abbreviarla ad un'ora nell'attuazione di un programma di CQI-V (15).

In conclusione, sulla scorta dei risultati ottenuti in questo studio, è possibile raccomandare l'impiego di un pool di sangue intero, aliquotato e conservato a -20 °C per un arco temporale di almeno 20 settimane, per implementare il programma di CQI-V della misurazione della HbA_{1c}, almeno per quei laboratori che utilizzino metodi immunoassistiti.

BIBLIOGRAFIA

1. Bunn HF, Haney DN, Kamin S, et al. The biosynthesis of human haemoglobin A1c. Slow glycosylation of haemoglobin in vivo. J. Clin Invest 1976;57:1652-9.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2010. Diabetes Care 2010;33(suppl 1):S11-61.
3. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2010;33(suppl 1):S62-9.
4. Panteghini M. Un nuovo referto per l'emoglobina glicata: il futuro è qui. Biochim Clin 2010;34:93-5.
5. Panteghini M. Application of traceability concepts to analytical quality control may reconcile total error with uncertainty of measurement. Clin Chem Lab Med 2010;48:7-10.
6. Luraschi P, Brambilla S, Mozzi R, et al. Monitoring analytical quality in routine glycohemoglobin measurements. Clin Chem 2002;48:1594-7.
7. Dolci A, Dominici R, Luraschi P, et al. 10% CV concentration for the fourth generation Roche cardiac troponin T assay derived from Internal Qualtiy Control data. Clin Chem Lab Med 2006;44:1495-6.
8. Infusino I, Mozzi R, Panteghini M. Imprecisione di alcuni metodi di misura dell'albumina derivata dai dati di un

Controllo di Qualità Interno. Biochim Clin 2008;32:217-8.
9. Dolci A, Scapellato L, Panteghini M. La determinazione dei biomarcatori di neoplasia su analizzatore Roche Modular consente di rispettare ampiamente gli obiettivi desiderabili di imprecisione. Biochim Clin 2009;33:271-2.
10. Ponzo P, Dolci A, Scapellato L, et al. Valutazione della commutabilità per il sistema analitico Cobas Integra dei materiali di controllo utilizzati nella VEQ per l'emoglobina glicata. Biochim Clin 2008;32:44-7.
11. Groche D, Hoeno W, Hoss G, et al. Standardization of two immunological HbA_{1c} routine assays according to the new IFCC reference method. Clin Lab 2003;49:657-61.
12. Mosca A, Branca MT, Carta M, et al. Raccomandazioni per l'implementazione della standardizzazione internazionale della misura dell'emoglobina glicata in Italia. Biochim Clin 2009;33:258-61.
13. Rolandsson O, Marklund SL, Norberg M, et al. HbA_{1c} can be analyzed in blood kept frozen at -80 degrees C and is not commonly affected by hemolysis in the general population. Metab Clin Experim 2004;53:1496-9.
14. Little RR, England JD, Wiedmeyer HM, et al. Effects of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. Clin Chem 1983;29:1113-5.
15. Mosca A. La determinazione dell'emoglobina glicata nel sangue umano: attualità e prospettive. Biochim Clin 2008;32:27-35.