

Valutazione della commutabilità per il sistema analitico Cobas Integra dei materiali di controllo utilizzati nella VEQ per l'emoglobina glicata*

Paola Ponso¹, Alberto Dolci², Luisa Scapellato², Monica Milano², Renata Paleari^{3,4}, Andrea Mosca^{3,4}, Mauro Panteghini^{2,4}

¹Scuola di Specializzazione in Biochimica Clinica, Università degli Studi, Milano

²Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera 'Luigi Sacco', Milano

³Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università degli Studi, Milano

⁴Centro Interdipartimentale per la Riferibilità Metrologica in Medicina di Laboratorio (CIRME), Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Evaluation of commutability for Cobas Integra analytical system of the EQA materials for hemoglobin A_{1c}.

We recently introduced the immunoturbidimetric determination of hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) on the Roche Cobas Integra 400. Assay accuracy was checked by the National EQA scheme. In the first four exercises performed during 2006 we found a constant significant overestimation (mean \pm SE, 10.1% \pm 0.32%) when results were compared to the reference method values. We observed, however, that this unacceptable performance was shared with the majority of the EQA participants using the same analytical system. As the manufacturer declares that HbA_{1c} results by Integra are traceable to the reference method, we evaluated the commutability of the EQA materials for the Integra method. 58 fresh whole blood samples (WB) (HbA_{1c} range, 4.6%-8.8%) and 22 EQA materials [8 from EQA 2005 scheme (EQA05), 8 from EQA 2006 (EQA06), and 6 from a different source (NEW)] were analyzed on both Integra and HPLC Tosoh G7, a system for which the commutability of EQA materials against the reference method was previously shown. Commutability of EQA materials was estimated by applying limits of \pm 2.5% the mean percentage difference (1.35%) found on WB samples between the two methods, i.e. -1.15% to +3.85%. All EQA06 (mean difference, 8.2%) and 7 out of 8 EQA05 samples (mean difference, 6.5%) were not commutable. On the contrary, 5 out of 6 NEW samples (mean difference, 1.8%) were commutable between the methods. We demonstrated that EQA materials currently employed in the National HbA_{1c} scheme are not commutable for the Cobas Integra system.

INTRODUZIONE

L'emoglobina glicata o β N1-deossifruuttosil-emoglobina (HbA_{1c}) si forma per una reazione non enzimatica di glicazione, che consiste in una condensazione tra il gruppo aldeidico del glucosio e il gruppo amminico N-terminale della catena β dell'emoglobina. L'American Diabetes Association raccomanda la sua determinazione in tutti i soggetti con diabete mellito in terapia al fine di monitorare il loro controllo glicometabolico a medio-lungo termine (1). Questa indicazione è riportata anche nel documento della National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) sul ruolo del laboratorio nella diagnosi del diabete e nella gestione del paziente diabetico (2). Recenti studi hanno inoltre indicato che in soggetti non diabetici aumenti anche lievi delle concentrazioni ematiche di HbA_{1c} sono correlati ad un aumento del rischio cardiovascolare (3, 4).

Da un punto di vista analitico sono disponibili numerose metodiche per la determinazione della HbA_{1c}, che si basano su tre principi analitici: 1) stima della differenza di carica elettrica tra HbA_{1c} e altre emoglobine (HPLC, isoelettrofocalizzazione ed elettroforesi); 2) rilevazione per

affinità del composto di condensazione tra glucosio e catena β dell'emoglobina (cromatografia di affinità); 3) rilevazione per via immunologica dei primi amminoacidi della catena β glicata e non glicata (metodiche immunochimiche) (5, 6). L'iniziale rilevante discordanza tra i risultati di queste metodiche ha portato allo sviluppo di programmi di armonizzazione, tra i quali il principale è senz'altro quello americano [National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP)] (7). Il riferimento delle misure di HbA_{1c} a tale sistema ha permesso di rendere i risultati più confrontabili e di introdurre nei programmi di VEQ materiali con valori assegnati mediante metodiche certificate NGSP al fine di valutare le prestazioni dei singoli laboratori partecipanti. Requisito fondamentale per poter utilizzare i risultati delle misure effettuate su tali materiali quale strumento per giudicare la prestazione analitica dei singoli laboratori partecipanti ad una VEQ è, tuttavia, la commutabilità dei materiali medesimi. Per commutabilità si intende la concordanza fra la relazione matematica dei risultati analitici ottenuti con due metodi per la misura della HbA_{1c} nel materiale utilizzato e la relazione matematica ottenuta per la stessa grandezza in

*Questo lavoro è stato in parte presentato al 39° Congresso Nazionale SIBioC, 2-5 ottobre 2007, Rimini (Biochim Clin 2007;31:425).

campioni biologici umani (nel caso della HbA_{1c} nel sangue intero fresco) (8). In termini forse più comprensibili, la commutabilità si può anche definire come la caratteristica di un materiale di controllo di mostrare per i differenti sistemi analitici le stesse proprietà mostrate dai campioni biologici di origine umana (9).

Il nostro laboratorio ha recentemente introdotto per la determinazione della HbA_{1c} un metodo immunochimico in completa automazione (Roche Cobas Integra). I primi esercizi di VEQ effettuati hanno, tuttavia, mostrato un'evidente sovrastima dei valori forniti quando confrontati con il valore NGSP. Analizzando i dati dei partecipanti alla VEQ, abbiamo però rilevato che questa sovrastima, giudicata "non accettabile" dall'organizzatore della VEQ, era mediamente comune alla maggioranza del gruppo di partecipanti che utilizzavano il sistema Integra. Due erano quindi le possibili spiegazioni: 1) che il sistema Cobas Integra per la misura della HbA_{1c} non fosse correttamente standardizzato rispetto al metodo NGSP scelto come riferimento, oppure 2) che il materiale utilizzato per la VEQ non fosse commutabile per la metodica suddetta. Avendo acquisito dati dal produttore che certificavano la riferibilità del sistema (10), abbiamo deciso di verificare sperimentalmente la commutabilità dei materiali utilizzati nella VEQ. In particolare, il sistema Integra è stato confrontato con un metodo HPLC per il quale era stata in precedenza dimostrata la commutabilità dei materiali VEQ quando confrontato con il metodo NGSP (11).

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati analizzati 58 campioni di sangue EDTA (WB) ottenuti da residui dell'attività ordinaria del laboratorio e resi anonimi prima dell'uso. I campioni sono stati conservati a 4 °C per 24 ore prima di essere analizzati. In contemporanea, sono stati analizzati 22 materiali di controllo: 8 relativi allo schema del 2005 del Programma VEQ Intersocietario AIPaC-AMD-SIBioC-SID-SIMeL (EQA05), 8 relativi allo schema del 2006 (EQA06) e 6 prodotti a scopo di ricerca presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università di Milano (NEW). I materiali EQA05 e EQA06, seppur di diverso lotto, erano preparati seguendo la medesima procedura (12).

Tutti i materiali di controllo erano liofilici e sono stati ricostituiti simultaneamente prima dell'uso. Tutti i campioni sono stati analizzati nella stessa seduta analitica, sul sistema Integra il mattino e sul sistema HPLC il pomeriggio dello stesso giorno.

Metodi analitici

Metodo Cobas Integra Hemoglobin A_{1c} (Roche Diagnostics). In questo metodo l'emoglobina totale è misurata in colorimetria, mentre la HbA_{1c} è determinata in immunoturbidimetria. Il risultato dell'HbA_{1c} si ricava dal rapporto percentuale tra le concentrazioni delle due emoglobine. In breve, l'emoglobina ottenuta dall'emoli-

sato è degradata per proteolisi dalla pepsina per rendere l'estremo aminoterminale della catena β più accessibile alla reazione immunologica, mediata da un anticorpo monoclonale coniugato a particelle di lattice, che riconosce specificamente solo i frammenti aminoterminali glicati. Gli anticorpi in eccesso dopo la reazione vengono agglutinati da un polimero che trasporta numerosi peptidi di sintesi che riproducono la struttura aminoterminale glicata della catena β . La variazione della torbidità in soluzione, misurata alla lunghezza d'onda di 552 nm, è inversamente proporzionale alla quantità di glicopeptidi che si sono legati all'anticorpo. Per la calibrazione dell'HbA_{1c} è utilizzato un polipeptide sintetico contenente la struttura aminoterminale glicata della catena β .

Metodo HLC-723 G7 (Tosoh Bioscience). Si tratta di un sistema HPLC automatizzato che separa rapidamente l'emoglobina in sei frazioni, inclusa l'HbA_{1c}, utilizzando una colonna a scambio ionico (13). Ogni frazione emoglobinica è eluita dalla colonna tramite un gradiente discontinuo di tre tamponi a differente concentrazione salina ed è monitorata alla lunghezza d'onda di 415 nm. I risultati sono espressi come area percentuale di ogni picco cromatografico rispetto all'area della HbA₀.

Valutazione della commutabilità dei materiali

La commutabilità dei materiali VEQ valutati è stata stimata utilizzando come limite di accettabilità un valore compreso tra $\pm 2,5\%$ lo scostamento medio percentuale ottenuto nel confronto strumentale eseguito sui campioni WB.

RISULTATI

Risultati del programma di VEQ

Nei 4 esercizi effettuati nel 2° semestre 2006 (campioni VEQ 2006 E/F/G/H), i risultati da noi forniti con il metodo Cobas Integra hanno mostrato un costante errore di sovrastima (media \pm SE, 10,1% \pm 0,32%) rispetto ai valori assegnati con metodo NGSP. Tale prestazione è stata classificata come "non accettabile" dall'organizzatore della VEQ.

Analizzando i dati forniti dal gruppo dei partecipanti utilizzando il sistema analitico Integra (n=10) si è potuto, tuttavia, evidenziare che tale sovrastima era, almeno in parte, comune alla maggioranza di loro (media \pm SE, 4,8% \pm 0,96%).

Correlazione tra metodi

I dati di correlazione tra le misure di HbA_{1c} ottenute sui 58 campioni WB con i metodi immunometrico e HPLC (intervallo di concentrazione HbA_{1c}, 4,6%-8,8%) sono rappresentati nella Figura 1. Al di là dell'ottimo coefficiente di correlazione (r=0,998), la presenza di un significativo valore di intercetta (0,71%) dimostra la diversa specificità analitica dei due principi metodologici qui utilizzati per la misura dell'HbA_{1c}.

Sui 58 campioni WB analizzati, lo scostamento medio Cobas Integra/HPLC era pari a 1,35% (DS 2,6%).

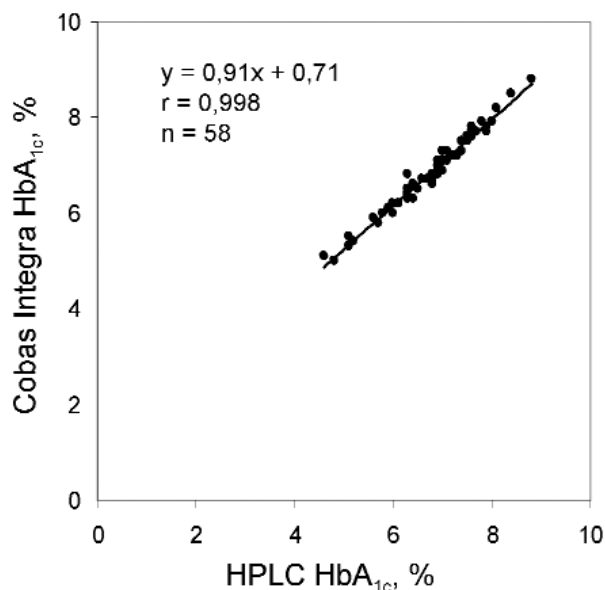


Figura 1
Correlazione tra i metodi HPLC e Cobas Integra nella misura dell'emoglobina glicata (HbA_{1c}) sui campioni umani.

Il limite di accettabilità per la commutabilità dei materiali VEQ era quindi compreso tra -1,15% e +3,85%.

Commutabilità dei materiali per VEQ

La Figura 2 illustra i risultati relativi alla commutabilità dei materiali di controllo valutati. Tutti i campioni EQA06 (scostamento medio, +8,2%) e 7 degli 8 campioni EQA05 (scostamento medio, +6,5%) non erano commutabili per i metodi valutati. Al contrario, 5 dei 6 campioni NEW (scostamento medio, +1,8%) erano commutabili, mostrando comportamenti simili ai campioni WB.

DISCUSSIONE

La partecipazione ad un programma di VEQ è un requisito fondamentale per verificare la qualità analitica delle misurazioni effettuate in laboratorio. Uno degli aspetti più critici di un programma di VEQ è l'assegnazione del valore al materiale di controllo al quale confrontare le misure dei partecipanti, al fine di ricavarne l'errore totale (differenza tra la misura eseguita ed il valore assegnato) e, di conseguenza, stimare l'inaccuratezza della misura. Il valore di confronto può essere assegnato come valore "vero", come media di consenso tra tutti i partecipanti, come media di consenso per ciascun principio analitico o, infine, come media di consenso per

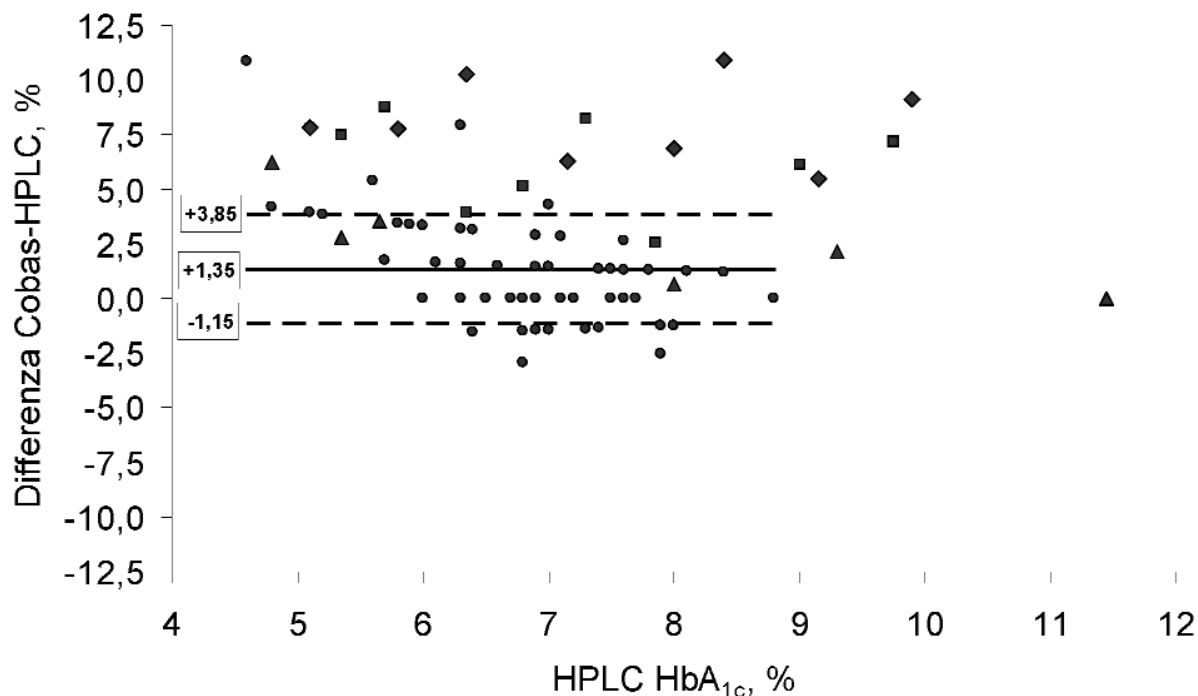


Figura 2
Risultati della commutabilità dei materiali per VEQ valutati.
I punti rappresentano lo scostamento percentuale tra i metodi per i campioni di sangue EDTA (WB) analizzati (n=58), mentre lo scostamento tra metodi per i materiali di controllo è riportato come quadrati (VEQ 2005), rombi (VEQ 2006) e triangoli (materiali NEW). La linea continua rappresenta lo scostamento medio percentuale tra Cobas Integra e HPLC sui 58 campioni WB, mentre le linee tratteggiate corrispondono al limite di accettabilità superiore ed inferiore utilizzati per definire la commutabilità dei materiali VEQ. I materiali commutabili sono quelli che mostrano risultati di scostamento compresi in tali limiti.

specifico sistema analitico. Per poter utilizzare un valore "vero" come confronto, sono necessari alcuni requisiti fondamentali: 1) disponibilità di un sistema di riferimento, che includa un metodo di riferimento con il quale definire il valore "vero"; 2) stessa, o almeno simile, specificità analitica per il misurando da parte dei metodi commercialmente disponibili; 3) commutabilità dei materiali di controllo, ovvero che tali materiali mostrino per ciascun metodo la stessa correlazione ottenuta misurando le matrici biologiche utilizzate per la misura di quell'analita nel laboratorio clinico (8).

Nel caso dell'HbA_{1c} esiste un sistema (ed un metodo) al quale fare riferimento per ottenere il valore "vero" e la specificità dei metodi commerciali è abbastanza simile. Tuttavia, per utilizzare il valore "vero" come confronto nel programma VEQ per HbA_{1c}, è necessario utilizzare materiali di controllo commutabili per soddisfare appieno i requisiti sopra descritti. Nella nostra specifica esperienza, quando il passaggio da un metodo commerciale in HPLC ad un metodo immunochimico ha coinciso con lo scadimento dell'accuratezza della misura dell'HbA_{1c} a livelli inaccettabili, secondo le valutazioni fornite dal programma VEQ Intersocietario AIPaC-AMD-SIBioC-SID-SIMeL, abbiamo cercato di capire le ragioni di tale scadimento, registrato in presenza di un CQI per l'esattezza sempre accettabile, considerando tutti gli aspetti sopra riportati. In particolare, le ragioni di questo scadimento avrebbero potuto essere attribuite a due motivi: la mancata riferibilità al metodo NGSP del nuovo sistema analitico di misura dell'HbA_{1c} o l'utilizzo di materiale per la VEQ non commutabile per il sistema Cobas Integra. A proposito del primo aspetto, la ditta produttrice del sistema analitico fornisce prove sperimentali che tale metodo è correttamente standardizzato (10). Escludendo la prima possibile causa, abbiamo verificato la commutabilità dei materiali di controllo della VEQ.

I dati sperimentali ottenuti in questo lavoro hanno confermato la non commutabilità dei materiali di controllo utilizzati nel programma VEQ Intersocietario AIPaC-AMD-SIBioC-SID-SIMeL per il sistema Roche Cobas Integra. Infatti, mentre lo scostamento medio rilevato tra il metodo Integra in uso nel nostro laboratorio ed il metodo HPLC (utilizzato come surrogato del metodo NGSP) era, per i campioni umani, pari a 1,35%, nei materiali di controllo della VEQ esso risultava molto più elevato, tra 6,5% per i materiali EQA05 e 8,2% per i materiali EQA06. E' interessante anche notare che, in un lavoro parallelo (dati non presentati), abbiamo valutato la commutabilità degli stessi materiali sul sistema analitico Integra 400, utilizzando per la misura un nuovo tipo di reagente (Cobas Integra Tina-quant HbA_{1c} gen. 2), che a breve dovrebbe sostituire il reagente attualmente in uso (14), e che, anche per questa nuova metodica, è stata rilevata una non commutabilità dei materiali EQA06. Significativamente differente è apparso il comportamento del materiale NEW, che ha mostrato uno scostamento medio del 1,8%, molto simile a quello rilevato nei materiali umani, dimostrandosi sostanzialmente commutabile. E' da notare che i materiali NEW sono di produzione differente rispetto a quelli ora in uso nella

VEQ (la principale differenza risiede nella mancanza di albumina aggiunta come stabilizzante). Appare quindi consigliabile utilizzare questi ultimi, laddove disponibili, o materiali con caratteristiche simili nei prossimi cicli di VEQ, se si vuol continuare a confrontare le prestazioni dei laboratori con il valore "vero".

In conclusione, i nostri dati dimostrano che i materiali attualmente utilizzati nel programma di VEQ Intersocietario AIPaC-AMD-SIBioC-SID-SIMeL per l'HbA_{1c} non sono commutabili per il sistema Roche Cobas Integra. Di conseguenza, i risultati degli esercizi di VEQ dei partecipanti utilizzando questo strumento non devono essere valutati in confronto al valore assegnato con il metodo NGSP, ma vanno esclusivamente confrontati con il valore di consenso relativo a tale sistema analitico.

RINGRAZIAMENTI

Gli Autori ringraziano Giovanni Doglio (Roche Diagnostics) per il supporto logistico fornito.

BIBLIOGRAFIA

1. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27(suppl 1):S15-35.
2. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
3. Park S, Barrett-Connor E, Wingard DL, et al. GHb is a better predictor of cardiovascular disease than fasting or post-challenge plasma glucose in women without diabetes. The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 1996;19:450-6.
4. Khaw KT, Wareham N, Bingham S, et al. Association of haemoglobin A_{1c} with cardiovascular disease and mortality in adults: the European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med* 2004;141:413-20.
5. Mosca A. Avanzamenti nella misura e nell'utilizzo clinico dell'emoglobina glicata. *Biochim Clin* 2006;30:487-92.
6. John WG. Haemoglobin A_{1c}: analysis and standardisation. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1199-212.
7. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, et al. The National Glycohemoglobin Standardization Program: a five-year progress report. *Clin Chem* 2001;47:1985-92.
8. Vesper HW, Miller WG, Myers GL. Reference materials and commutability. *Clin Biochem Rev* 2007;28:139-47.
9. Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: new challenges. *Clin Chim Acta* 2005;355:1-12.
10. 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.
11. Mosca A, Paleari R, Madè A, et al. Commutability of control materials in glycohemoglobin determinations. *Clin Chem* 1998;44:632-8.
12. Mosca A, Paleari R, Trapolino A, et al. A re-evaluation of glycohemoglobin standardization: the Italian experience with 119 laboratories and 12 methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997;35:243-8.
13. Terreni A, Paleari R, Calzini A, et al. Evaluation of the analytic performances of the new HPLC system HLC-723 G7 for the measurement of hemoglobin A_{1c}. *Clin Biochem* 2003;36:607-10.
14. Lenters-Westra E, Miedema K, Slingerland RJ. Evaluation of a new HbA_{1c} method on Cobas Integra 800 and its certification as a NGSP secondary reference method. *Clin Chem* 2007;53:A183.