

## Emoglobina glicata: confronto tra metodo immunochimico Roche Diagnostics su strumento Integra 400 e metodo HPLC Menarini su strumento HA8140

Maurizio Vana, Carmela Maria Attisano, Franco Giardini

Ospedale Oftalmico di Torino - Laboratorio Analisi - Via Juvarrà 19, TORINO

### ABSTRACT

#### Glycated hemoglobin: comparison of the immunochemical Roche method on Integra 400 and of the HPLC Menarini method on HA 8140

HbA<sub>1c</sub> is an useful marker of glicemic control diabetic patients: several methods have been proposed for its assay. Immunochemical methods recently made available do not require dedicated instruments to measure HbA<sub>1c</sub> in blood samples. The purpose of this paper is to compare an immunochemical method implemented on a random access clinical-chemistry analyzer with a HPLC method largely used in the clinical laboratory. The evaluation included day to day and intra-run precision assesment, and method comparison using patient samples without any variant hemoglobin. HbA<sub>1c</sub> has also been comparatively measured in some additional samples from patients carriers of the variant hemoglobins S and C. Laboratory management aspects concerning the use of the Cobas Integra 400 analyzer, already available in the laboratory, are discussed.

### RIASSUNTO

L'HbA<sub>1c</sub> è un importante marcatore per il controllo del compenso glicemico per il quale sono stati proposti numerosi metodi analitici. Recentemente sono stati proposti anche metodi immunochimici che consentono di evitare l'uso di strumentazioni cromatografiche dedicate che sono di più difficile gestione. Questo lavoro si propone di effettuare un confronto tra un metodo in HPLC largamente utilizzato nei laboratori che effettuano il dosaggio dell'HbA<sub>1c</sub> ed un metodo immunochimico applicabile su di un normale analizzatore random access di chimica-clinica. Sono state valutate la precisione all'interno e tra le serie e la correlazione tra i metodi utilizzando pazienti privi di varianti emoglobiniche atipiche. Alcuni pazienti con varianti emoglobiniche di tipo "S" e "C" sono stati valutati separatamente ed i risultati sono riportati nel seguente lavoro. Si è anche esaminato l'aspetto gestionale dell'utilizzo dell'analizzatore Cobas Integra 400, già presente in laboratorio, per la misura dell'emoglobina glicata.

### INTRODUZIONE

L'emoglobina glicata (HbA<sub>1c</sub>) è il più importante marcatore biochimico per il controllo del metabolismo glucidico nei pazienti diabetici (1). La determinazione dell'HbA<sub>1c</sub> si è imposta in questi ultimi anni perché si tratta di una misurazione accurata e a basso costo. Sono stati proposti diversi metodi in HPLC, con colonne a scambio ionico e ad affinità, nonché immunologici su analizzatori di chimica clinica (3,5,6,7).

Nel nostro laboratorio afferiscono campioni provenienti da tre differenti centri di diabetologia presenti sul territorio, per una media di circa 60 campioni al giorno con punte di 80-85 campioni.

Nel settore proteine specifiche e farmaci è presente un analizzatore Integra 400 della Roche collegato on-line al sistema informativo del laboratorio. Questo ci ha indotto ad avviare un confronto dei valori di HbA<sub>1c</sub> misurati immunochimicamente con tale strumento con quelli ottenuti con tecnica HPLC con l'analizzatore Menarini HA8140, anch'esso collegato on-line, abitualmente utilizzato per determinare HbA<sub>1c</sub>. Questo confronto ha lo scopo di valutare la correlazione tra le due metodiche, di valutare la precisione

intra-serie e tra le serie del metodo immunochimico oltre che l'impatto organizzativo di una eventuale esecuzione dell'analisi di tutto il pannello diabetico su di un unico strumento.

### MATERIALI E METODI

Il Menarini HA8140 è un cromatografo dedicato alla determinazione dell'HbA<sub>1c</sub>. È dotato di un campionatore che provvede ad effettuare la diluizione con un apposito lisante. 20 µL di emolisato vengono incubati a 40°C, per 2 minuti e mezzo, al fine di eliminare la frazione labile (2), dopodiché sono introdotti in una colonna a scambio ionico e la separazione avviene in gradiente discontinuo con l'utilizzo di tre tamponi a diversa concentrazione salina che vengono fatti fluire sequenzialmente in colonna per mezzo di una pompa non reciprocante. Al fine di mantenere una pressione costante è utilizzato un attenuatore di pressione. L'assorbanza dell'eluato viene misurata a 414 nm.

Il Cobas Integra 400 di Roche Diagnostics è un'analizzatore automatico "random access" in grado di eseguire un ampio spettro di determinazioni chimico-cliniche, comprendente proteine specifiche, farmaci e droghe d'abuso.

Per determinare l'HbA<sub>1c</sub> il campione di sangue intero viene emolizzato automaticamente nella cuvetta di prediluizione. La pepsina presente nel reagente lisante degrada l'Hb rilasciata rendendo le strutture β-N-terminali maggiormente accessibili agli anticorpi. L'Hb totale viene determinata usando un metodo colorimetrico esente da cianuro in soluzione alcalina. L'HbA<sub>1c</sub> viene misurata mediante anticorpi monoclonali coniugati a particelle di lattice.

Al fine di valutare la correlazione tra i due metodi abbiamo analizzato 107 campioni di sangue intero raccolto in vacutainer contenente K2-EDTA provenienti dai tre centri dell'A.S.L. Torino 1. I campioni sono stati conservati in congelatore a -20°C e scongelati poco prima dell'esecuzione su HPLC Menarini HA8140 e su Integra 400.

I campioni sono stati suddivisi in modo casuale in tre gruppi di circa 35 campioni l'uno. Per non interferire con la normale routine, comprendente circa 60 campioni, si è provveduto ad analizzare un gruppo di campioni al giorno, durante i tre giorni consecutivi al termine del lavoro ordinario. Entrambi gli strumenti hanno provveduto a lisare in modo automatico i campioni di sangue intero.

Al fine di valutare la precisione nella serie e tra le serie del metodo utilizzato su Integra 400 sono stati preparati tre pool di sangue utilizzando campioni prelevati in vacutainer contenenti K2-EDTA in modo da avere una percentuale di HbA<sub>1c</sub> rispettivamente di circa 6.0%, 8.0% e 11.0%. Il sangue di questi tre pool è stato aliquotato in provette da 0.5 mL e conservato in congelatore a -20°C. Si è poi provveduto ad analizzare in duplicato, all'inizio e alla fine della routine, un campione per livello al fine di valutare la precisione entro la serie e tra le serie e ad allestire, alla fine della sperimentazione, una serie di 21 replicati di ciascun livello per una ulteriore valutazione della precisione all'interno della serie.

All'inizio e alla fine di tutte le sessioni analitiche si è provveduto ad analizzare i controlli a concentrazione nota di seguito menzionati per verificare l'attendibilità dei sistemi in valutazione, provvedendo all'occorrenza alla loro ricalibrazione. Anche i risultati così ottenuti sono stati utilizzati per il calcolo della imprecisione analitica.

Sono state utilizzate le seguenti apparecchiature e reattivi: HPLC Menarini HA8140, colonna cromatografica Menarini lotto numero 0G1182, Set HA8140 lotto numero 0103, Tampone B lotto numero 003, HbA<sub>1c</sub> Calibrators

lotto 0101, Glyco Hb Control Lotto numero 9335/2.

Analizzatore Integra 400, Calibratore lotto numero 61130001, Reagente lotto numero 61840090, Controllo Normale lotto numero P0938 ed il Controllo Patologico U0533.

Nel corso della valutazione sono stati inoltre analizzati alcuni campioni con varianti emoglobiniche, rappresentate da una variante C e tre varianti S. Trattandosi di pazienti il cui stato emoglobinico era già noto al laboratorio non sono state effettuate ulteriori indagini riguardanti le varianti emoglobiniche.

### Metodi statistici

I risultati ottenuti nel confronto tra metodi sono stati elaborati attraverso l'analisi della regressione di Passing e Bablok. Lo studio dell'imprecisione tra serie è stato effettuato seguendo le linee guida del NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) Documento EP-T2. Sono stati calcolati i CV% tra i giorni e totale.

### RISULTATI

I valori di imprecisione analitica nella misura della HbA<sub>1c</sub> con il metodo immunoturbidimetrico Roche su strumento Cobas Integra 400 sono riportati nelle tabelle 1 e 2.

I risultati del confronto tra i metodi immunoturbidimetrico ed HPLC, su 107 campioni di sangue, sono riportati come grafico di dispersione nella figura 1. La analisi della regressione/correlazione di tali risultati ha dato  $y = -0.26 + 1.06x$  ed  $R^2 = 0.976$ , dove y rappresenta i valori ottenuti con il metodo immunochimico, x quelli ottenuti con metodo HPLC.

I valori di HbA<sub>1c</sub> ottenuti con i due metodi in 4 campioni di sangue contenenti varianti emoglobiniche sono riportati nella tabella 3. La figura 2 mostra il tracciato cromatografico (HPLC) del campione contenente HbC.

### DISCUSSIONE

I valori di imprecisione nella serie (CV% < 1.5) e tra le serie (CV% Totale < 3) ottenuti in questa sperimentazione sono da considerarsi ottimi.

Il confronto tra metodi ha evidenziato un'elevata correlazione tra il Cobas Integra 400 di Roche Diagnostics e HPLC Menarini.

#### Tabella 1

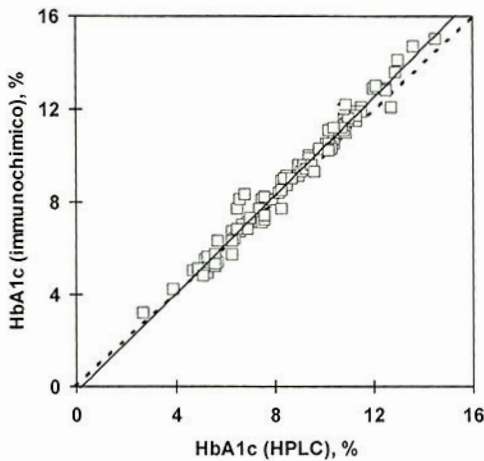
Valutazione della imprecisione analitica, secondo il protocollo NCCLS EP5-T2, nella determinazione immunoturbidimetrica della HbA<sub>1c</sub> con strumento Cobas Integra 400

Statistica	Campione				
	CS N	CS P	Pool Basso	Pool Medio	Pool Alto
Media	5,9	11,6	6,2	8,6	11,5
DS entro la serie	0,05	0,07	0,04	0,06	0,07
DS tra le serie	0,10	0,17	0,09	0,13	0,17
DS totale	0,15	0,30	0,13	0,12	0,26
CV entro la serie (%)	0,81	0,62	0,68	0,66	0,62
CV totale (%)	2,53	2,59	2,11	2,44	2,26

**Tabella 2**

Valutazione della imprecisione analitica nella determinazione immunoturbidimetrica della HbA<sub>1c</sub> con strumento Cobas Integra 400, da misure replicate effettuate nella serie (n = 21) sulle tre miscele preparate in laboratorio

Statistica	Campione		
	Pool Basso	Pool Medio	Pool Alto
Media	6,21	8,61	11,60
DS	0,06	0,11	0,15
CV, %	1,00	1,26	1,31

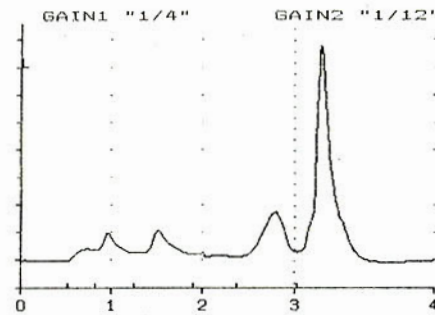


**Figura I**

Determinazione della HbA<sub>1c</sub> in 107 campioni di sangue. L'analisi della regressione/correlazione (secondo Passing e Bablock) ha dato:  $y = -0,26 + 1,06x$ ;  $R^2 = 0,976$ . La retta di regressione (linea continua) è confrontata con la retta della equivalenza (linea tratteggiata).

```

** ABNORMAL SEPARATION (1D)**
      TIME      AREA      %
-----
P5 00:35"      2851      4.1
P5 01:07"      6958      4.4
P5 01:11"      1665      1.0
P5 01:48"      4928      51.1
P5 01:58"      7286      57.8
    
```



**Figura II**

Tracciato cromatografico (HPLC) di un campione contenente emoglobina C. L'emoglobina variante eluisce come picco P5, a 2 minuti e 48 secondi

**Tabella 3**

Valori di HbA<sub>1c</sub> misurati con due metodi in tre campioni contenenti varianti emoglobiniche

Campione	Variante	HbA <sub>1c</sub> , %	
		Immunoturbidimetria	Cromatografia
a	C	5,9	n.d.*
b	S	11,0	10,5
c	S	9,4	7,3
d	S	14,1	11,3

\*n.d. = non determinabile

L'analisi dei campioni contenenti varianti emoglobiniche HbS effettuato su Cobas Integra 400 e HPLC ha fornito risultati compatibili con lo stato glicemico dei pazienti. Tuttavia non è stato possibile effettuare una valutazione della correlazione a causa dell'esiguo numero di questi campioni. Per quanto riguarda il campione contenente HbC il Cobas Integra 400 ha fornito un valore di HbA<sub>1c</sub> compatibile con il controllo glicemico del paziente, mentre la metodica in HPLC ha prodotto un tracciato sul quale non è possibile identificare in modo corretto e certo il picco relativo all'HbA<sub>1c</sub>.

Per quanto riguarda la qualità del servizio offerta a più

punti prelievo, si è osservata una netta diminuzione dei tempi di refertazione passando per una routine di 50 campioni giornalieri dai 220 minuti per l'HPLC a 60 minuti per l'Integra 400, permettendo la refertazione di tutto il pannello diabetologico entro il primo pomeriggio in modo da consentire una gestione ottimale del day-hospital di diabetologia che prevede la dimissione del paziente entro le ore 15.

Inoltre l'esecuzione dell'HbA<sub>1c</sub> su di uno strumento in chimica liquida consente di eliminare la strumentazione per HPLC dedicata con un risparmio di costi, spazi dedicati alla strumentazione e allo stoccaggio di reattivi e consente inoltre un migliore turn-over del personale non necessitando l'utilizzo di personale addestrato appositamente al funzionamento di una strumentazione HPLC.

Infine, nel caso di laboratori ai quali normalmente non afferiscono pazienti provenienti da centri anti-diabetici, l'esecuzione dell'HbA<sub>1c</sub> su Cobas Integra 400 consente di consolidare, all'interno del pannello metabolico, un importante marker di controllo glicemico con un limitatissimo investimento economico.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Stott A, Casson IF, Higgins GJ. Glycated haemoglobin assays. Approaches to standardization of results. Diabet Med 2001 Apr;18(4):274-9

2. Chachou A, Randoux C, Millart H, Chanard J, Gillery P. Influence of in vivo hemoglobin carbamylation on HbA<sub>1c</sub> measurements by various methods. *Clin Chem Lab Med* 2000 Apr;38(4):321-6
3. Thoma J, Stirn F, Kutter D. Influence of urea on HbA<sub>1c</sub>-determinations by Menarini HA-8140 and on the difference between immunoturbidimetric and HPLC-HbA<sub>1c</sub>-results. *Clin Lab*. 2000;46(5-6):261-8.
4. Weykamp CW, Martina WV, van der Dijs FP, Penders TJ, van der Slik W, Muskiet FA. Hemoglobins S and C: reference values for glycohemoglobin in heterozygous, double-heterozygous and homozygous subjects, as established by 13 methods. *Clin Chim Acta* 1994 Dec 16;231(2):161-71
5. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 1993 Aug;39(8):1717-23
6. Turpeinen U, Karjalainen U, Stenman UH. Three assays for glycohemoglobin compared. *Clin Chem* 1995 Feb; 41(2): 191-5
7. Hamwi A, Schweiger CR, Veitl M, Schmid R. Quantitative measurement of HbA<sub>1c</sub> by an immunoturbidimetric assay compared to a standard HPLC method. *Am J Clin Pathol* 1995 Jul;104(1):89-95