

Sistema Menarini ADAMS 8160 per la rivelazione e misura delle frazioni emoglobiniche mediante cromatografia a scambio ionico HPLC: valutazione analitica

Roberta Martina Mozzi¹, Silvia Sarpau¹, Donatella Caruso², Flavio Giavarini², Carlo Franzini³

¹Laboratorio di analisi Chimico Cliniche, Ospedale L. Sacco, Milano.

²Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano.

³Dipartimento di Scienze Cliniche Luigi Sacco, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi di Milano

ABSTRACT

System Menarini ADAMS-8160 for detection and measurement of haemoglobin fractions by ionic exchanged chromatography HPLC: analytical evaluation

The evaluated system is a dedicated ion-exchange chromatography-based automated HPLC analyzer, allowing with a single short-time (4 minutes) run to measure both glycated haemoglobin (glycoHb), and minor (HbA2 and HbF) and variant haemoglobins in blood. Results were compared with those from the Bio Rad Variant and Variant II analyzers. In the glycoHb assay the evaluated system exhibited excellent precision (overall and within-the-series CV values in the interval 0.6 - 1.9 %); agreement with the comparison system was also good, showing mean underestimation of - 0.27 %Hb (- 3.86 %) at the decision level (glycoHb = 7.0 %Hb); the interference from carbamylated Hb (in vitro incubation with cyanate and uremic patients samples) appeared to be negligible if any; and less pronounced than in the comparison system; no interference was recorded from very high concentrations of labile-glycoHb. HbF appeared to be precisely quantitated, with results in good agreement with the comparison system. Slightly higher imprecision (CV values in the interval 1.1 - 3.9 %) was observed in HbA2 assay; in the measurement of this last minor haemoglobin, agreement with the comparison was not quite satisfactory. The evaluated system failed in revealing 2 rare haemoglobin variants out of 46 rare and common variants tested. Hb testing with the Menarini ADAMS-8160 system showed excellent practicability. The advantages of performing with the same instrument different tests, relevant to different pathologies, are highlighted.

RIASSUNTO

Il sistema valutato è un analizzatore automatico dedicato HPLC, basato sulla cromatografia a scambio ionico. In una singola, breve corsa (4 minuti) il sistema consente la misura della emoglobina glicata (glico Hb) e delle emoglobine minori (HbA2 and HbF), e la rilevazione delle emoglobine varianti. I risultati sono stati confrontati con quelli forniti dai sistemi Bio Rad Variant e Variant II. Nella misura della glicoHb il sistema ha mostrato ottima precisione (valori di CV globali e nella serie nell'intervallo 0,6 - 1,9 %); l'accordo con il sistema di confronto era anche buono, con una sottostima media di - 0,27 %Hb (- 3,86 %) al livello decisionale (glicoHb = 7,0 %Hb); l'interferenza da emoglobina carbamilita (incubazione in vitro con cianato e campioni da pazienti uremici) era nulla o trascurabile e comunque meno evidente di quella del sistema di confronto. Non era evidente alcuna interferenza dalla presenza di alte concentrazioni di glicoHb-labile. La HbF era misurata con elevata precisione e con valori in ottimo accordo con il sistema di confronto. Nella determinazione della HbA2 si registrava una imprecisione leggermente più elevata (valori di CV nell'intervallo 1,1 - 3,9 %), e l'accordo con il sistema di confronto non era completamente soddisfacente. Il sistema non evidenziava 2 rare varianti emoglobiniche delle 46 varianti comuni e rare esaminate. L'analisi delle emoglobine con il sistema Menarini ADAMS-8160 ha mostrato una eccellente praticabilità. Vengono sottolineati i vantaggi di poter eseguire differenti analisi, pertinenti a patologie differenti, con il medesimo strumento.

INTRODUZIONE

La misura della percentuale di emoglobina glicata circolante (qui di seguito indicata come glicoHb) è il più importante esame (1,2) per la verifica del controllo glicometabolico del paziente diabetico di tipo 1 e 2. Per la misura di tale componente esistono numerosi metodi, basati su approcci differenti, capaci di fornire risultati differenti (3). Peraltro, due importanti e diversi capitoli della patologia umana basano la diagnosi e la sorveglianza su

misure di frazioni emoglobiniche del sangue. Mentre il primo, già menzionato, riguarda una modificazione post-traduzionale (glicazione) della emoglobina; il secondo, comprendente il gruppo eterogeneo delle sindromi emoglobinopatiche e talassemiche, riguarda le modificazioni congenite dell'assetto emoglobinico, diagnosticabili mediante la misurazione delle due frazioni emoglobiniche minori, HbA2 ed HbF, ed il rilievo della presenza di eventuali varianti emoglobiniche (4). Nonostante le fondamentali differenze tra i due gruppi di patologie, ed i differenti

meccanismi che portano alle modificazioni dell'assetto emoglobinico, la tecnologia analitica oggi più adatta ad adeguate misure di routine è comune, ed è rappresentata dalla cromatografia a scambio ionico in modalità HPLC.

Per tali misurazioni esistono diverse strumentazioni automatiche, caratterizzate da adeguata praticabilità ed affidabilità analitica, che sono state oggetto di differenti valutazioni (5-8). In questo lavoro viene riportata la valutazione di uno di tali strumenti, sistema Menarini ADAMS 8160, che con un unico programma di sufficiente brevità consente di effettuare le analisi pertinenti ai due gruppi di patologie.

MATERIALI E METODI

È stato valutato il sistema Menarini ADAMS 8160 con il programma da 240 secondi. Come confronto è stato utilizzato il sistema Variant II, (Bio Rad) con il programma "HbA1c Dual program" (180 secondi) per le glicohb, ed il sistema Variant, (Bio Rad) con il programma "β-thal short program" (360 secondi) per le emoglobine minori (HbA2 ed HbF) e varianti. Per entrambi gli strumenti si utilizzavano reagenti (emolizzanti e tamponi di eluizione), calibratori e controlli forniti dalla rispettive ditte. Le operazioni di calibrazione e di analisi erano eseguite seguendo le istruzioni fornite.

Le prove di imprecisione, sia per glicohb che per HbA2 ed F, sono state effettuate con due materiali di controllo (Menarini) a due livelli di concentrazione. Il protocollo prevedeva analisi in duplicato (imprecisione entro la serie) ripetute 10 volte nell'arco di 40 giorni (imprecisione globale).

Se non altrimenti specificato, per le varie determinazioni si sono impiegati campioni di sangue freschi da paziente prelevati su EDTA, inviati in laboratorio per analisi diagnostiche correnti ed analizzati in giornata, indipendentemente dalla diagnosi clinica. Tra di essi sono stati selezionati 19 campioni provenienti da pazienti nefropatici con concentrazioni plasmatiche di creatinina ≥ 4 mg/dL. Sono stati inoltre selezionati alcuni campioni contenenti varianti emoglobiniche, evidenziate casualmente nel corso di misure di glicohb, oppure rilevate in seguito a specifica richiesta.

Per indurre carbamilazione *in vitro*, si sono incubate emazie lavate e sospese in soluzione fisiologica in presenza di cianato di sodio (9) alle concentrazioni finali di 0,5 e 1,0 mmol/L, nonché in assenza di cianato. Dopo incubazione a 37 °C per 2 ore le emazie sono state lavate e risospese in soluzione fisiologiche, e quindi analizzate sui sistemi analitici in valutazione e di confronto. Per indurre glicazione *in vitro* delle Hb (10), aliquote di 500 μ L di sangue intero venivano addizionate di aliquote di 25 μ L di soluzione fisiologica e di soluzione di glucosio 200 g/L, ottenendo concentrazioni finali di glucosio pari a 0 e 9,5 g/L. Le miscele venivano analizzate immediatamente e dopo 1 e 2 ore di incubazione a 37 °C.

Gli emolizzati sono stati preparati trattando con acqua distillata e tetracloruro di carbonio emazie lavate tre volte, e quindi centrifugando (11). Gli emolizzati, di concentrazione emoglobinica compresa tra 10 e 16 g/dL, sono stati congelati a -80 °C e conservati prima della analisi fino ad

un anno. Le emoglobine varianti, rivelate mediante HPLC (sangue intero) e/o elettroforesi su gel di agarosio (emolizzati), sono state presuntivamente identificate in base al tempo di eluizione nel sistema HPLC specifico, e quindi identificate mediante tecniche di spettrometria di massa.

A tal fine aliquote dell'emolisato (diluizione 1:10) sono state iniettate in una colonna RP -C4 (Vydac 214TP54 - 4,6x250 mm; The separations Group, Hesperia, CA, USA) collegata ad uno spettrometro di massa (LCQ-ThermoQuest-Finnigan, San Jose, CA, USA) dotato di sorgente electrospray-ion trap (LC-MS-ESI). Sono stati acquisiti spettri di massa per l'intera durata dell'analisi in un intervallo compreso tra 300-2000 Da. Nel caso in cui non sia stato possibile identificare la variante solo sulla base dei PM delle singole catene, si è proceduto al sequenziamento di peptidi ottenuti dal digerire le catene stesse mediante tecnica della tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS). I peptidi sono stati separati su colonna RP-C18 (Inertsil ODS2 5² 4,6x250 mm; GL Sciences Inc., Tokyo, Japan) e lo ione precursore del peptide anomalo è stato selezionato per la collisione. La sequenza aminoacidica è stata assegnata sulla base degli ioni prodotto rilevati nello spettro di massa e confermata utilizzando il database Sequest (ThermoQuest-Finnigan-Xcalibur BioWork, USA). (12,13).

I risultati analitici, nella misura sia di glicohb sia di HbA2 ed HbF, sono stati espressi come percentuale delle emoglobina totale, come indicato dalla rispettive Ditte. L'unità di misura ("percentuale della emoglobina totale") viene indicata come "%Hb", per evitare confusione con l'unità "%" usata per esprimere parametri statistici (per esempio, coefficiente di variazione) normalizzati. Per l'analisi statistica si sono utilizzati metodi parametrici consueti (media, deviazione standard, coefficiente di variazione). Associazione ed accordo dei risultati nel confronto intermetodi (14) sono stati valutati con la regressione lineare (non parametrica) di Passing e Bablok (PB) (15) e con la distribuzione delle differenze (16), rappresentate graficamente da grafico di dispersione e "difference plot", con il calcolo della deviazione standard residua e del coefficiente di correlazione. Le significatività delle differenze tra valori medi sono state verificate con il test di Student bilaterale per dati appaiati.

RISULTATI

I valori di imprecisione per le tre frazioni emoglobiniche studiate sono stati calcolati dai risultati ottenuti nella analisi di due materiali di controllo, come descritto. I valori calcolati sono riportati nella tabella 1; i valori ottenuti per i coefficienti di variazione della HbF a livello 0,18 %Hb non sono stati considerati significativi perché misurati in prossimità del limite di rivelazione della metodica.

I risultati del confronto intermetodi per la misura di glicohb, su 200 campioni di sangue fresco con valori di glicohb nell'intervallo compreso tra 4,1 e 13,4 %Hb, sono rappresentati graficamente nelle figure 1 e 2, mentre i parametri delle corrispondenti analisi statistiche sono riportati nella tabella 2. Per quanto concerne la glicohb, si

Tabella 1
Imprecisione entro la serie e globale, a due livelli di concentrazione

Analita	n	Media, % Hb	Imprecisione entro la serie CV,%	Imprecisione globale CV, %
GlicoHb	10	6,28	1,91	1,18
GlicoHb	10	10,84	0,61	0,62
HbA2	10	3,12	1,50	3,94
HbA2	10	5,98	1,11	1,54
HbF	10	0,18	(*)	(*)
HbF	10	7,04	0,67	1,20

(*) Valori non significativi perché misurati in prossimità del limite di rivelazione del metodo

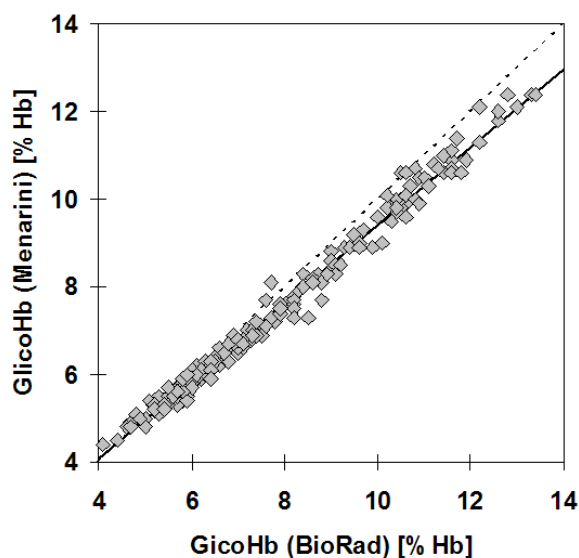


Figura 1
Confronto dei valori di glicoHb ottenuti con il sistema in valutazione (asse delle ordinate) con quelli del sistema di confronto (asse delle ascisse), nella analisi di 200 campioni freschi di sangue. Tutti i valori in % della emoglobina totale (%Hb). Le rette continua e tratteggiata indicano, rispettivamente, la retta di regressione (secondo Passing e Bablock) e la retta dell'accordo teorico ($y = x$).

osserva (sistema in esame rispetto al sistema di confronto) la presenza di errore sistematico sia proporzionale (pendenza = 0,89) sia costante (intercetta = 0,50 %Hb), entrambi statisticamente significativi. I due errori di segno differente si compensano parzialmente generando sovrastima per valori < 4,5 %Hb, sottostima per valori > 4,5 %, equivalenza per glicoHb = 4,5 %Hb. Al valore critico di glicoHb = 7 %Hb per il sistema di confronto, il sistema in valutazione fornisce glicoHb = 6,73 %Hb, corrispondente ad una sottostima del 3,86 %. In media, la sottostima è di 0,33 %Hb, con una oscillazione abbastanza ampia attorno a questo valore (DS delle differenze = + 0,32 %Hb). La associazione tra le serie di valori fornite dai due sistemi è documentata da $S.yx = 0,23$ %Hb e da $r = 0,994$.

Il confronto intermetodi è stato eseguito su 50 campioni, analizzati in duplicato con i due sistemi, sia per HbA2 (figura 3 e tabella 2) sia per HbF (figura 4 e tabella 2). Per la HbA2 si osservano errori sistematici sia proporzionale (pendenza = 0,83) sia costante (intercetta = 0,67), che si compensano parzialmente generando (sistema in valutazione verso sistema di confronto) sovrastima e sottostima per valori di HbA2 rispettivamente inferiori o superiori a 3,95 %Hb. Al livello critico di 3,50 %Hb misurato con il sistema di confronto corrisponde un valore di 3,58 %Hb misurato con il sistema in valutazione, pari ad una sovrastima del 2,3 %. La associazione tra le due serie di misura è di poco inferiore al caso precedente ($S.yx = 0,31$ %Hb;

Tabella 2
Parametri statistici del confronto tra sistema in valutazione e sistema di confronto, nella misura di emoglobina glicata e delle emoglobine minori A2 ed F. Tra parentesi l'intervallo di confidenza 95% del rispettivo parametro

Analita	N	Regressione lineare P.B. (*)			Differenze (#)		R
		Pendenza	Intercetta %Hb	S.yx %Hb	Media %Hb	D.S. %Hb	
GlicoHb	200	0,89 (0,88/0,91)	0,50 (0,38/0,60)	0,23	- 0,33 (-0,37/-0,28)	0,32	0,994
HbA2	50	0,83 (0,77/0,90)	0,67 (0,48/0,85)	0,31	0,06 (-0,05/0,17)	0,39	0,963
HbF	50	0,97 (0,95/1,00)	-0,06 (-0,01/0,03)	0,18	-0,11 (-0,17/-0,052)	0,20	0,994

(*) Regressione di Passing e Bablock: valori del sistema in valutazione (y) su valori del sistema di confronto (x).

(#) Parametri della distribuzione delle differenze [(sistema in valutazione) - (sistema di confronto)]

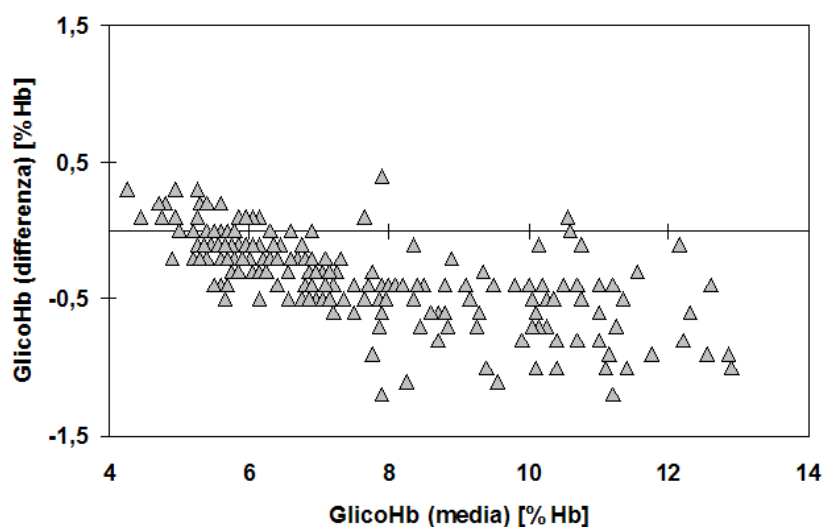


Figura 2.

Confronto tra i due sistemi analitici (in valutazione e di confronto) nella misura di glicoHb in 200 campioni di sangue. Le differenze [(sistema in valutazione) - (sistema di confronto)] sono riportate contro le medie dei valori ottenuti con i due metodi

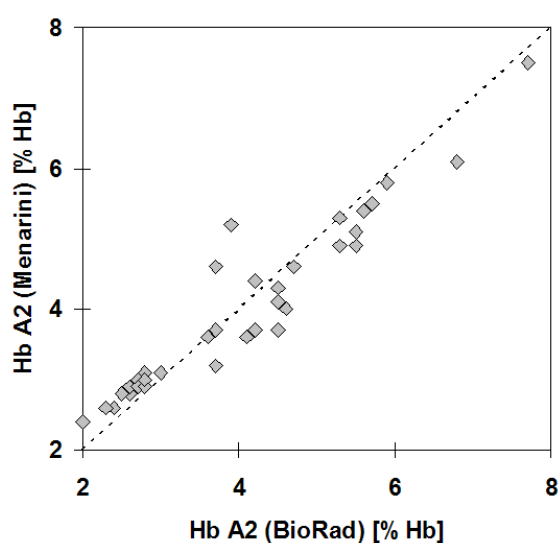


Figura 3

Confronto tra i due sistemi analitici nella determinazione della HbA2 in 50 campioni di sangue. La linea tratteggiata indica l'accordo teorico ($y = x$)

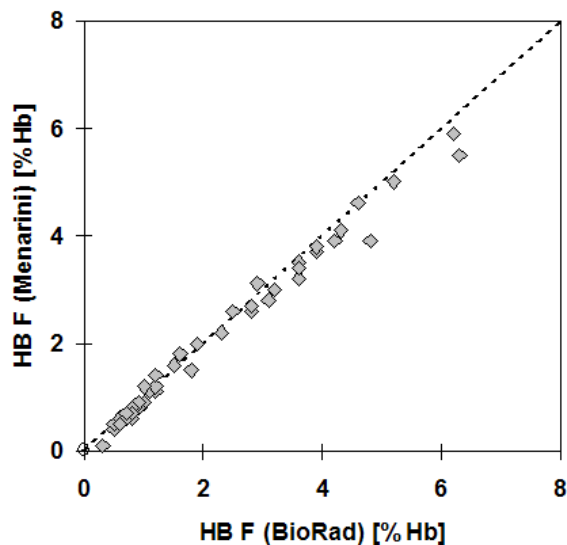


Figura 4

Confronto tra i due sistemi analitici nella determinazione della HbF in 50 campioni di sangue. La linea tratteggiata indica l'accordo teorico ($y = x$)

$r = 0,963$). Per quanto riguarda la HbF, il grado di associazione tra le due misure appare migliore che nei casi precedenti.

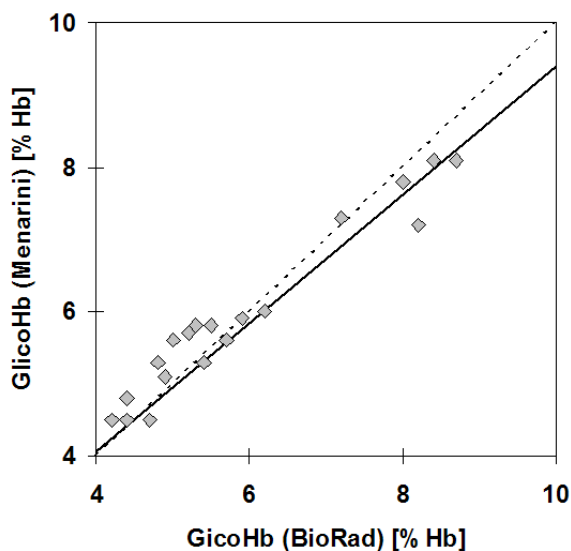
Nella figura 5 i singoli valori di glicoHb ottenuti con i due metodi in 19 campioni di sangue da soggetti nefropatici (creatinina del siero $\geq 4,0$ mg/dL) sono confrontati con la retta di regressione precedentemente ottenuta nell'analisi dei 200 campioni e con la retta della equivalenza ($y = x$). Il grafico mostra che la relazione intermetodi per i campioni uremici, verosimilmente contenenti proporzioni significative di emoglobina carbamidata, non differisce da

quella precedentemente riscontrata per gli altri campioni. I risultati degli esperimenti di carbamildazione in vitro mediante incubazione con cianato sono riassunti nella tabella 3. In questi esperimenti la carbamildazione ha provocato una piccola ma significativa riduzione della glicoHb misurata con il sistema in valutazione, proporzionale alla concentrazione di cianato e quindi, verosimilmente, alla quantità di Hb carbamidata. Il fenomeno è risultato lievemente più accentuato, e non sempre di segno uniforme, nelle misure con il sistema di confronto, nel quale peraltro il picco allargato sul cromatogramma derivante dalla carba-

Tabella 3

Effetto della incubazione in vitro del sangue con concentrazioni di cianato pari a 0, 0,5 e 1,0 mmol/L. Valori medi di glicohb misurati con il sistema in valutazione e con il sistema di confronto

Gruppo di campioni	Parametro statistico	Glicohb (sistema valutato)			Glicohb (sistema di confronto)		
		Cian.0	Cian.0,5	Cian.1,0	Cian.0	Cian.0,5	Cian.1,0
I	N	10	10	10	10	9	5
	m, % Hb	5,03	4,99	4,88	4,82	3,99	3,82
	DS, % Hb	0,30	0,30	0,52	0,44	0,38	0,52
II	N	9	9	9	9	7	7
	m, % Hb	8,07	7,90	7,72	8,52	7,29	9,33
	DS, % Hb	2,84	2,75	2,69	2,95	2,89	2,36

**Figura 5**

Come la figura 1, relativa all'analisi di 19 campioni da pazienti nefropatici (creatinina del siero 4,0 mg/dL). I singoli valori sono confrontati con la retta di regressione della figura 1 (linea continua) e con la retta dell'accordo ($y = x$)

milazione non sempre permetteva una sicura misurazione delle percentuali di glicohb.

Negli esperimenti di incubazione con glucosio lo strumento in valutazione ha misurato concentrazioni di glicohb-labile crescenti con il tempo di incubazione, e concentrazioni di glicohb-stabile invariate nel medesimo periodo di incubazione. Ugualmente invariate con il tempo di incubazione sono rimaste le concentrazioni di glicohb-stabile misurate con il sistema di confronto, con il quale peraltro non era possibile misurare le elevate concentrazioni di glicohb-labile generate durante la incubazione. Ripetendo gli esperimenti di incubazione in assenza di glucosio, entrambi i sistemi analitici misuravano valori assai costanti delle due le forme (labile e stabile) di glicohb.

Nella tabella 4 alcuni risultati della rilevazione/misura delle possibili varianti emoglobiniche ottenuti con il sistema in valutazione sono confrontati con quelli del sistema di confronto. Nel corso di questa parte di valutazione il

cambio di colonna ha provocato una improvvisa variazione del tempo di eluizione e della percentuale emoglobinica per la HbS, della quale si sono analizzati 14 campioni con la prima colonna, 11 con la seconda; peraltro sia il tempo di eluizione che i valori di percentuale emoglobinica sono rimasti relativamente costanti nell'ambito delle misure effettuate con l'una che con l'altra colonna. Si osserva inoltre che il sistema in valutazione non ha evidenziato 2 delle 46 varianti studiate (di cui una HbBari, l'altra non ancora identificata) e che in un certo numero di occasioni la variante non si è sufficientemente separata da permettere una valutazione quantitativa.

DISCUSSIONE

Per quanto concerne la determinazione di glicohb lo strumento in valutazione è apparso caratterizzato da eccellente precisione, compatibile con i requisiti richiesti (17). Si osservi che in una sperimentazione approfondita ma necessariamente limitata nel tempo, e con uno strumento nuovo, i valori di variabilità osservata tendono ad essere "ideali". Peraltro si è potuto osservare, con un sistema differente, che i valori di imprecisione globale ricavati da un programma di controllo interno della qualità si possono mantenere entro valori simili per un periodo lungo come un anno (18,19).

Come precedentemente menzionato, è possibile che sistemi differenti forniscano risultati differenti. Per quanto concerne la determinazione di glicohb si tende ad evitare ciò con due programmi di standardizzazione, di cui uno (DCCT-NGSP) utilizzato nei più importanti studi epidemiologici (17), un altro (IFCC) basato fondamentalmente sulla applicazione alla misura di un modello metrologico completo (20). Entrambi gli strumenti, valutato e di confronto, rispondevano dichiaratamente alla standardizzazione DCCT-NGSP. In effetti le prove di confronto inter-metodi dimostrano un accordo tra i due sistemi discretamente buono, dove modesti errori sistematici, costante e proporzionale, di segno diverso, si compensano al valore di glicohb = 4,5 %Hb, mentre rimane una sottostima modesta (- 0,27 %Hb pari ad una variazione del 3,9 %) del sistema valutato rispetto al confronto al valore critico di glicohb = 7,0 %Hb. Naturalmente il disegno sperimentale

Tabella 4

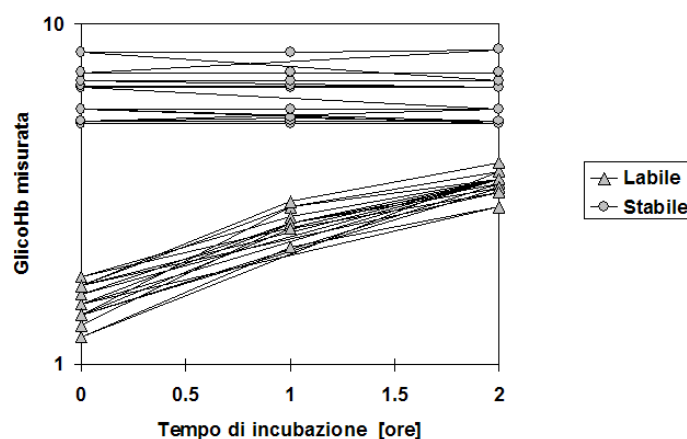
Risultati dell'analisi di 46 campioni contenenti emoglobine varianti con i due sistemi

Variante	Mutazione	N	Sistema in Valutazione			Confronto	
			Evidenz.	Tempo secondi	%Hb	Evidenz.	%Hb
S(*)	β 6(A3)Glu \rightarrow Val	14	SI	230	35 \pm 2,5	SI	37 \pm 2,5
S(*)	β 6(A3)Glu \rightarrow Val	11	SI	226	23 \pm 2,6	SI	36 \pm 2,6
D	β 121(GH4)Glu \rightarrow Gln	7	SI	230	(**)	SI	37 \pm 2,5
C	β 6(A3)Glu \rightarrow Lys	3	SI	227/230	39 \pm 5,4	SI	37 \pm 1,2
Lepore	δ 68Leu-bIVS-II-8	3	SI	(**)	(**)	SI	(**)
Camperdown	104(G6)Arg Ser	3	SI	(**)	(**)	SI	44 \pm 6,6
E	β 26(B8)	1	SI	(**)	(**)	SI	(**)
Bari	α 45His \rightarrow Gin	1	NO	(**)	(**)	SI	26
K-Woolwich	β 132(H10)Lys \rightarrow Gin	1	SI	(**)	(**)	SI	39
Handsworth	α 18Gly \rightarrow Arg	1	SI	230	6,8	SI	15,1
(?)	(?)	1	NO	(**)	(**)	SI	12,4

(*) 25 campioni con HbS divisi in due gruppi di 14 e 11, analizzati prima e dopo sostituzione della colonna

(**) dati non disponibili per cattiva separazione o per sovrapposizione con la HbA2

(?) variante non identificata

**Figura 6**

Concentrazioni di glicohb, rispettivamente labile e stabile; misurate con il sistema in valutazione in 10 campioni di sangue incubati in presenza di glucosio alla concentrazione di 950 mg/dL. Si osservi la scala logaritmica delle ordinate

di questa valutazione non offre indicazioni su quale dei due strumenti fornisce valori corretti. In un precedente lavoro abbiamo riportato risultati simili (intercetta = 0,68 %Hb; pendenza = 0,90) nel confronto Menarini HA 8140/Bio Rad Variant II).

Delle due emoglobine "minori" utilizzate nella diagnostica delle sindromi talassemiche, la HbF, che presenta requisiti analitici di minore criticità, è risultata essere quella misurata con maggiore precisione, e con minori differenze tra i due sistemi. La misura delle HbA₂ è maggiormente critica. La imprecisione (CV = 3,94 %) registrata in prossimità del valore critico di HbA₂ = 3,5 %Hb, deve indurre a considerare con attenzioni i valori misurati a tale livello. L'accordo medio tra i due strumenti è accettabile, ma anche graficamente (figura 3) risalta la carente associazione dei singoli valori alla retta di regressione, verosimilmente dipendente da difetto di precisione. Comparato al

sistema di confronto il sistema in valutazione ha evidenziato qualche difficoltà nell'evidenziare la presenza di Hb varianti, verosimilmente correlato con la maggiore brevità del ciclo di eluizione. Non sono risultati palesi i motivi della variazione di eluizione della HbS in occasione del cambio della colonna.

Sempre in relazione al sistema di confronto, il sistema in valutazione è risultato alquanto meno sensibile alla carbamilazione indotta *in vitro* mediante incubazione con cianato, ed ugualmente sensibile alla possibile carbamilazione presente in campioni uremici. Entrambi i sistemi misurano valori costanti di glicohb-stabile in presenza di concentrazioni crescenti di glicohb-labile: il sistema valutato misura più agevolmente valori elevati di questa ultima, a livelli peraltro riscontrabili solo mediante incubazione *in vitro* in presenza di elevate concentrazioni di glucosio.

In conclusione, lo strumento valutato risulta adeguato

per le determinazioni di glicohb (18,21,22); per la misurazione/ricerca delle Hb minori e varianti necessita di una attenta valutazione dei valori borderline di HbA₂, accompagnata da una attenta ispezione visiva del tracciato.

Il sistema valutato presenta una elevata praticabilità, legata alla possibilità di effettuare le due misure (glicohb ed Hb minori e varianti) con il medesimo programma. E' comunque da sottolineare la importante possibilità, offerta dalla massima parte degli strumenti oggi disponibili, di poter effettuare le analisi con il medesimo strumento, eventualmente con piccoli e veloci interventi di condizionamento del sistema. Il numero di determinazioni di Hb minori e varianti nel laboratorio ospedaliero medio è pari a circa un decimo del numero di misurazioni di glicohb. Ciò implica che se è facile dotarsi di uno strumento adeguato per la misura delle (numerose) glicohb, potrebbe essere difficile dotarsi di un secondo sistema per la determinazione delle (poche) Hb minori e varianti. La determinazione di queste ultime con sistemi alternativi è laboriosa e fornisce spesso risultati di minore affidabilità.

RINGRAZIAMENTI

Anna Ghezzi e Fatima Calderaro hanno offerto eccellente collaborazione tecnica. Menarini ha reso disponibile il sistema ed i materiali necessari per la valutazione

BIBLIOGRAFIA

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications of insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-9.
2. UK Prospective Diabets Study (UKPDS) Group. Intensive blood glucose control with sulphanylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-53.
3. John WG. Glycated haemoglobin analysis. *Ann Clin Biochem* 1997;34:17-31.
4. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem* 2000;46:1284-90.
5. John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Arkray HA 8140 Haemoglobin A1c analyzer. *Clin Chem* 1997;43:968-75.
6. Chevenne D, Marie N, Chauffert M, Noel M, Ducrocq R, Trivin F. Evaluation of the Tosoh HLC-723GHb A A1c 2.2 hemoglobin A1c analyzer. *Clin Biochem* 1999;32:487-90.
7. Khuu HM, Robinson CA, Goolsby K, Hardy RW, Konrad RJ. Evaluation of a fully automated high performance liquid chromatography assay for hemoglobin A1c. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:763-7.
8. Higgins TN, Blankey GB, Dayton J. Analytical evaluation of the Bio-Rad Variant II automated HbA1c analyzer. *Clin Biochem* 2001;34:361-5.
9. Engbaek F, Christensen SE, Jespersen B. Enzyme immunoassay of hemoglobin A1c: analytical characteristics and clinical performance for patients with diabetes mellitus, with and without uremia. *Clin Chem* 1989;35:93-7.
10. Franzini C, Luraschi P, Morelli AM. La separazione e misura della emoglobina glicata labile ne eliminano efficacemente l'interferenza nella determinazione del derivato stabile con tecnica HPLC. *Biochim Clin* 1997;21:25-7.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Quantitative measurement of fetal hemoglobin using the alkali denaturation method: approved guideline. NCCLS Publication H12-A. Villanova, PA: NCCLS, 1989.
12. Wild BJ, Green BN, Cooper EK, Lalloz RA, Erten S, Stephensen AD, et al. Rapid identification of hemoglobin variants by electrospray ionization mass spectrometry. *Blood Cells Mol Dis* 2001; 27:691-704.
13. Caruso D, Da Riva L, Giavarini F, Galli G, Brambilla S, Luraschi P, et al. A haemoglobin variant found during glycohemoglobin measurement, identified as Hb Toulon [77(EF6)Pro^{OH}His] by tandem mass spectrometry. *Hemoglobin* 2002; 26:197-9.
14. Franzini C. Confronto di metodi: accordo e associazione tra i valori ottenuti con due metodi differenti. *Biochim Clin* 2003;27:200-4.
15. Hollis S. Analysis of method comparison studies. *Ann Clin Biochem* 1996;33:1-4.
16. Passing H, Balbolk W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983;21:709-20.
17. Little RR, Rohlfing CL, Wiedemeyer H-M, Myers GL, Sacks DB, Goldstein DE, for the NGSP Steering Committee. The National Glycohemoglobin Standardization Program: a five-years progress report. *Clin Chem* 2001;47:1985-92.
18. Luraschi P, Brambilla S, Mozzi R, Cattozzo G, Franzini C. Monitoring analytical quality in routine glycohemoglobin measurements. *Clin Chem* 2002;48:1594-7.
19. Cattozzo G, Franzini C. Quality control monitoring in HPLC measurement of glycohemoglobin. *LabMedica Int* 2003;March-April:20-23.
20. Standardizzazione IFCC
21. Young RJ. The clinical need for HbA1c standardization. *Ann Clin Biochem* 2000;37:47-8.
22. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK McDonald JM, Parrot M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.