



Glykovaný hemoglobin (HbA_{1c}) je rutinně využívaný parametr pro sledování kompenzace glykemie u pacientů s diagnózou diabetes mellitus.¹ V řadě zemí je také využíván jako diagnostický marker pro toto onemocnění.² Efektivní využití HbA_{1c} je ovšem limitováno jeho analytickou nejistotou³ a omezeními vyplývajícími z přítomnosti abnormální formy hemoglobinu, intravaskulární hemolýzy, ztráty krve a dalších stavů. Na přesnost vyšetření HbA_{1c} jsou tudíž kladeny poměrně vysoké nároky.⁴ Proto je velmi žádoucí vývoj metodiky stanovení a snižování analytické nejistoty tohoto markeru.

Porovnání výsledků metod HbA_{1c} na analyzátorech D-10 (Bio-Rad) a cobas® 8000 c 502 (Roche)

Mgr. ONDŘEJ WIEWIORKA

Oddělení klinické biochemie FN Brno, Brno

HbA_{1c} je měřen celou škálou analytických principů. V ČR je dominantní především iontoměničová HPLC, ale objevují se i afinitní chromatografie, imunoanalytické metody, enzymatické metody, kapilární elektroforéza a suchá chemie.⁵

V této studii jsme se zabývali porovnáním rutinní iontoměničové HPLC metody na analyzátoru D-10 (Bio-Rad) s inhibiční imunoanalytickou metodou na analyzátoru cobas® 8000 modulu c 502 (Roche).

Materiály a metody

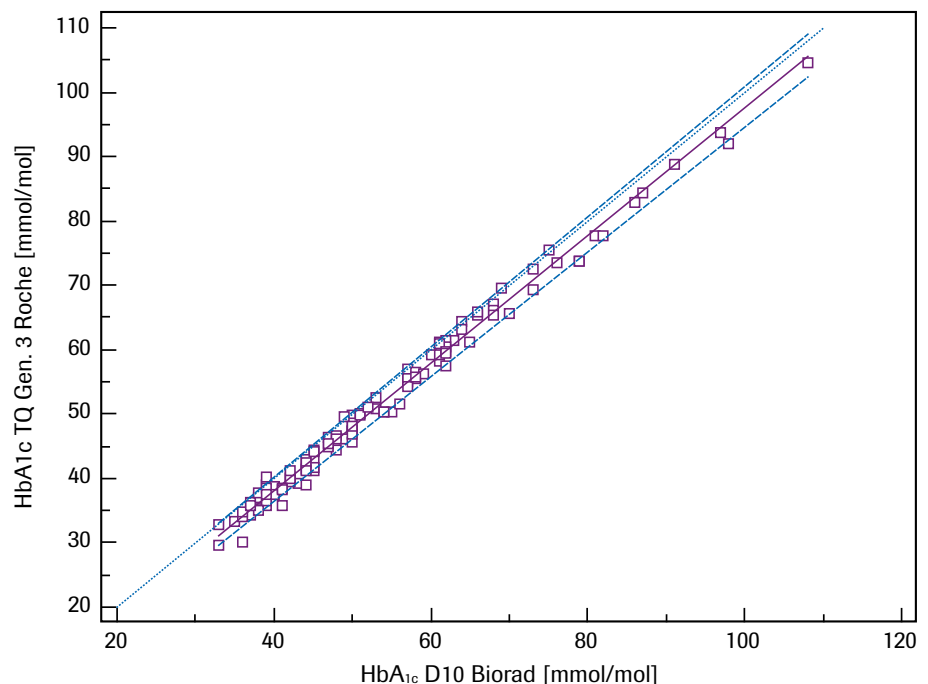
Sběr vzorků pacientů pro studii probíhal na pracovišti Fakultní nemocnice Brno od 14. 5. 2020 do 5. 6. 2020. Do porovnání bylo zahrnuto 112 vzorků pacientů, které byly v uvedeném období rutinním způsobem vyšetřeny pro hodnotu HbA_{1c} na analyzátoru D-10 (Bio-Rad) pomocí reagenčního setu D-10 Dual Program Reorder Pack. Další faktory jako věk, diagnóza, pohlaví a podobně nebyly zohledněny. Materiály byly po rutinním vyšetření uloženy v lednici při 4–8 °C (stabilita parametru HbA_{1c} je alespoň 7 dní při této teplotě).⁶ Po ukončení rutinního

a analyzovány na cobas® 8000 c 502 metodou HbA_{1c} TQ Gen. 3 (Roche).

S každou sérií vzorků proběhlo měření dedikované kontroly kvality na každém z analyzátorů (viz tabulka 1).

Ke spolehlivému určení hodnoty bias a posouzení stability reagencí metody HbA_{1c} TQ Gen. 3 na palubě přístroje byly použity referenční lyofilizované materiály vzorků A i B cyklu KD2/20 fy SEKK. Cílové hodnoty a jejich rozšířené nejistoty byly 38,2 (U_{AV} = 0,6) a 70,1 (U_{AV} = 1,1) mmol/mol. Každý z materiálů byl měřen v pěti opakováních na analyzátoru cobas® 8000 modulu c 502 v den 1 a poté ve čtyřech opakováních v den 11 (viz tabulka 2). Stabilita resuspendovaných materiálů byla zajištěna jejich zamrazením v den 1 na -20 °C.

provozu byly vzorky v odpoledních hodinách roztřepáním homogenizovány



▲ Obr. 1: Porovnání obou metod pomocí sériové analýzy patientských vzorků

$y = -1,5189 + 0,9906 x$	
Úsek	-1,5189
95% interval spolehlivosti	-2,5125 to -0,3150
Směrnice	0,9906
95% interval spolehlivosti	0,9700 to 1,0125
Cusumův test linearity	Bez statisticky významné odchylky linearity (P>0,10)

▲ Tab. 1: Rovnice regrese a její intervaly spolehlivosti



Ke statistickému vyhodnocení byl využit program MedCalc verze 9.3.2.0. Korelace byla vyhodnocena dle Passinga a Babloka (1983)⁷ a korelační koeficient vypočten dle Pearsona. K hodnocení byly vždy použity hodnoty HbA_{1c} definované dle IFCC [mmol/mol]. Přepočet jednotek IFCC a DCCT (NGSP) je možné provést dle následující rovnice:

$$DCCT(\%) = 0,0915 * IFCC(\text{mmol/mol}) + 2,15$$

Výsledky

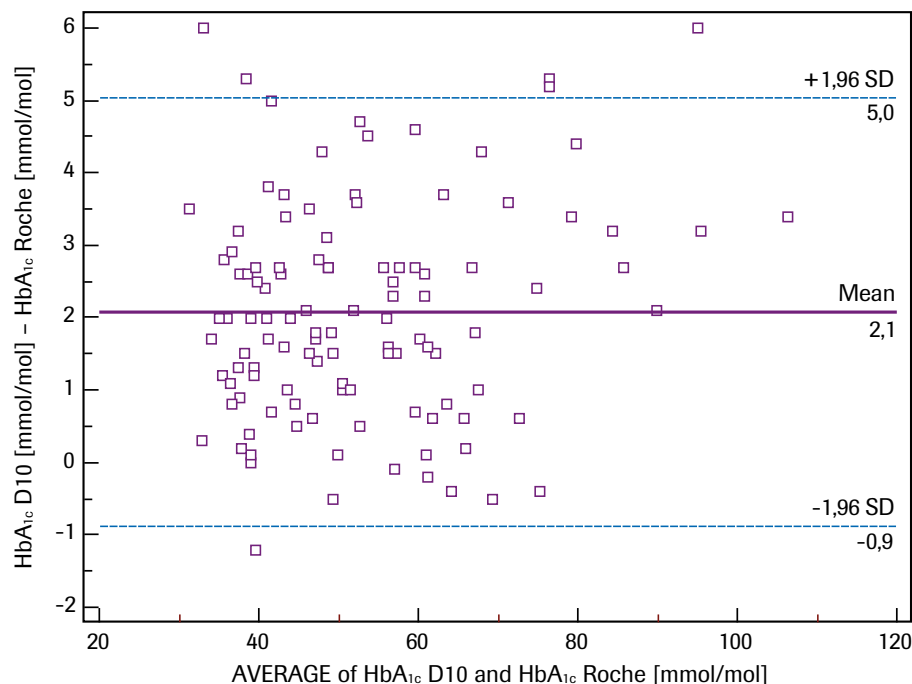
Porovnání vzorků pacientů proběhlo celkem v 7 sériích po dobu 19 dní a zahrnuje 112 měření na každém z přístrojů,

viz obrázek 1. Rovnice lineární regrese včetně 95% intervalů spolehlivosti jsou zaznačeny v tabulce 1.

Hodnoty HbA_{1c} vzorků pacientů se pohybují v rozmezí 33–108 mmol/mol pomocí iontoměničové HPLC metody na analyzátoru D-10 (Bio-Rad) a v rozmezí 29,5–104 mmol/mol pomocí metody HbA_{1c} TQ Gen. 3 (Roche).

Výsledky, které analyzátor poskytoval po dobu studie, byly vždy v povoleném rozmezí definovaném každým z výrobců kontrolních materiálů, viz tabulka 2.

Cílové hodnoty referenčního materiálu, jednotlivé naměřené hodnoty i statistické vyhodnocení druhé části studie, shrnující bias a stabilitu reagenčního setu HbA_{1c} TQ Gen. 3, jsou uvedeny v tabulce 3. Materiály KD2/20 (SEKK) byly rozpuštěny dle instrukcí pro uživatele Roche, tedy v 0,25 ml deionizované vody. Cílové hodnoty obou materiálů byly získány referenční laboratoří (European Reference



▲ Obr. 2: Bland-Altmanův rozdílový graf s výsledky porovnání vzorků pacientů

Systém	cobas® 8000 c 502 (Roche)		D-10 (Bio-Rad)	
Kontrola	PreciControl HBA _{1c} Norm/Path		Diabetes Control (Bio-Rad)	
Lot	412160	412161	33991	33992
Exspirace	28. 2. 2021		30. 6. 2021	
Cílová hodnota	40,6	98,2	35	84
14. 5. 2020	41,8	90,4	36	86
20. 5. 2020	41,7	92,2	36	87
21. 5. 2020	40,8	93,3	36	90
25. 5. 2020	38,1	90,7	36	84
3. 6. 2020	39,0	89,1	35	83
4. 6. 2020	38,7	89,8	37	86
5. 6. 2020	39,1	90,5	37	88
Průměr	39,9	90,9	36,1	86,3
Bias	-0,7	-7,3	1,1	2,3
Bias%	-1,8	-7,5	3,3	2,7
SD	1,52	1,43	0,69	2,36
CV%	3,73	1,46	1,97	2,81

▲ Tab. 2: Výsledky měření interní kontroly kvality na každém z analyzátorů

Referenční materiál	KD2/20 A	KD2/20 B
	[mmol/mol]	
UAV	38,2	70,1
Den	HbA_{1c} TQ Gen. 3	
1	39,3	73,2
1	39,8	72,1
1	41,6	73,2
1	41,5	72,4
1	40,7	73,4
Průměr den 1	40,6	72,9
CV% den 1	2,51	0,79
Bias% den 1	6,23	3,94
11	39,9	71,9
11	40,4	72,3
11	40,1	72,5
11	38,9	74,2
Průměr den 11	39,8	72,7
CV% den 11	1,63	1,39
Bias% den 11	4,25	3,74

▲ Tab. 3: Výsledky hodnocení bias a stability reagenčního setu HbA_{1c} TQ Gen. 3 (Roche) pomocí referenčních materiálů z fy SEKK



Laboratory for Glycohemoglobin), s metrologickou návazností na referenční metodu IFCC (Winterswijk, Nizozemsko).⁸ Párový t-test ukázal shodu dat pro dny 1 a 11 u vzorků A i B.

Diskuse

Porovnání výsledků HbA_{1c} u patientských vzorků ukazuje velmi dobrou shodu obou metod – statisticky nevýznamný rozdíl směrnice a mírný negativní bias reagenční soupravy Roche v průměru o 2,1 mmol/mol HbA_{1c}. Pokud přihledneme k průběžně měřeným interním kontrolám kvality, kdy analyzátor D-10 vykazuje mírný pozitivní bias oproti referenční hodnotě a analyzátor c 501 negativní, můžeme usoudit, že je tento bias tvořen parciálně oběma metodami.

Analýza referenčních materiálů naopak ukazuje mírný pozitivní bias reagenční soupravy Roche v den instalace setu do přístroje a jeho kalibrace i po desíti dnech. Tato nekonzistence s předchozí částí studie může být vysvětlena jinou povahou matrice obou materiálů. Zatímco soubor patientských vzorků tvoří nativní krev, referenční materiály dodávané

firmou SEKK jsou lyofilizáty. Problematika efektu matrice je v případě glykovaného hemoglobinu dosud hojně diskutovaná. V ČR se tento problém projevoval především u některých POCT analyzátorů HbA_{1c}, což bylo od roku 2017 kompenzováno použitím materiálů nativní krve. Přesto, mírné odchylky u laboratorních přístrojů se u nás dosud neprojevily nejspíše i díky dostatečně široké maximální povolené odchylce při hodnocení EHK fy SEKK. Během několika posledních let ovšem došlo k zúžení tohoto intervalu z ± 20 % na současných ± 12 %. Další zužování povoleného intervalu naráží na současné technické možnosti analýzy. Evropská srovnávací studie EURAAA1c, jíž se zúčastnila právě i ČR v roce 2019, ukazuje vyšší průměrný bias i CV% u lyofilizátů (bias = +1,1 mmol/mol HbA_{1c}, CV = 6,2 % oproti analýze plné krve %) (bias = +0,4 mmol/mol HbA_{1c}, CV = 4,6 %).⁹

Pro laboratoře s menším objemem vzorků k vyšetření HbA_{1c} může být důležitá stabilita reagencií na palubě. Tabulka 3 ukazuje shodné výsledky měření v den vložení reagenzie do přístroje a poté po 10 dnech. Výsledky ukazují statisticky nevýznamný rozdíl cílových hodnot (párový t-test) i variačních koeficientů

(párový F-test). Kvůli malému množství referenčního materiálu nebylo možné provést větší počet opakování, aniž bychom se vyhnuli míchání jednotlivých lahvíček, ovšem sloučením obou skupin bychom získali bias +2,0 mmol/mol a CV 2,3 % pro vzorek A a bias +2,7 mmol/mol a CV 1,0 % pro vzorek B.

K nesporným výhodám řešení fy Roche patří využití stávajícího automatického fotometrického analyzátoru, takže není třeba zakupovat/pronajímat další přístroj a řešit související agendu – prostorové nároky, údržbu, zaškolení personálu, dokumentaci. Současná třetí generace reagenčních setů je dostupná pro přístroje **cobas b 101, c 501/502, c 513, c 311/111, Integra, c 503**.

Závěr

V této práci jsme demonstrovali, že i tak rozdílné metody pro stanovení HbA_{1c}, jakými jsou iontoměničová HPLC a inhibiční imunoanalýza, mohou poskytovat dobrou korelaci. Požadavky na analytickou kvalitu metody HbA_{1c} TQ Gen. 3 (Roche) vyhovují současným českým i mezinárodním požadavkům.



Mgr. Ondřej Wiewiorka

Oddělení klinické biochemie FN Brno, Jihlavská 20, Brno, Katedra laboratorních metod, LF, Masarykova univerzita, Kamenice 735/5, Brno, supervizor EHK SEKK pro cykly KD (glykovaný hemoglobin) a GHP (glykovaný hemoglobin POCT), Za Pasází 1609, Pardubice

Kontakt: wiewiorka.ondrej@fnbrno.cz

V roce 2012, ihned po ukončení studia na PřF MU v oboru biochemie, nastoupil na úsek rutinních metod OKB FN Brno.

V rámci své práce se dále věnoval POCT, analýze močového sedimentu a lékovým interferencím. Od roku 2017 pracuje na úseku speciálních metod, kde se mimo jiné zabývá atomovou spektrometrií a chromatografickými metodami.

LITERATURA

1. Friedecký, B., Kratochvíla, J., Springer, D., Prázný, M. & Zima, T. Toto doporučení vydávají společně Česká společnost klinické biochemie ČLS JEP a Česká diabetologická společnost ČLS JEP. 12.
2. Use of glycated haemoglobin (HbA_{1c}) in the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, 299–309 (2011).
3. Weykamp, C. & Siebelder, C. Evaluation of Performance of Laboratories and Manufacturers Within the Framework of the IFCC model for Quality Targets of HbA_{1c}. *J. Diabetes Sci. Technol.* 12, 747–752 (2018).
4. Weykamp, C. et al. Investigation of 2 Models to Set and Evaluate Quality Targets for HbA_{1c}: Biological Variation and Sigma-Metrics. *Clin. Chem.* 61, 752–759 (2015).
5. Weykamp, C. HbA_{1c}: A Review of Analytical and Clinical Aspects. *Ann. Lab. Med.* 33, 393 (2013).
6. Rohlfing, C. L., Hanson, S., Tennill, A. L. & Little, R. R. Effects of Whole Blood Storage on Hemoglobin A1c Measurements with Five Current Assay Methods. *Diabetes Technol. Ther.* 14, 271–275 (2012).
7. Passing, H. & Bablok, 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. *Clin. Chem. Lab. Med.* 21, (1983).
8. Jeppsson, J.-O. et al. Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA_{1c} in Human Blood. *Clin. Chem. Lab. Med.* 40, (2002).
9. Siebelder, C. & Weykamp, C. Report EurAAA1c 2019. 18.