



Examensarbete, 15 hp
Kandidatexamen i Biomedicinsk laboratorievetenskap
Höstterminen 2017

HbA1c – En jämförelse mellan två nya analysmetoder gentemot en befintlig

Gabi Marrouki

Sektionen för lärande och miljö

Populärvetenskaplig sammanfattning

Flera miljoner personer har drabbats av diabetes och fler kommer att drabbas i framtiden. En uppskattning är att över 300 miljoner kommer att ha någon form av diabetes vid år 2025. Välkända diabetes typer som typ 1 och typ 2 har ett gemensamt samlingsnamn, Diabetes Mellitus (DM). Den gemensamma faktorn är hyperglykemi (högt blodsocker). Hyperglykemi uppstår då insulin som är regleringsmekanismen för glukos i blodet, är defekt (typ 1) eller inte produceras tillräckligt (typ 2). Inga konkreta svar finns till varför regleringsmekanismen för glukoskoncentrationen påverkas men studier har kunnat påvisa att de cellerna i bukspottskörteln (betacellerna) som utsöndrar insulin drabbas. Typ 1 beror på autoimmunitet, det vill säga att kroppens immunförsvar attackerar betacellerna. Andra studier har påvisat att betacellerna minskar, vilket medför en förminskad produktion av insulin, såsom vid typ 2 diabetes.

Att kunna diagnostisera och kunna följa upp diabetiker har stor betydelse för patienten. Med hjälp av uppföljning kan patienten få rätt behandling och rätt medicin. En metod för uppföljning och diagnostisering av diabetiker är med hjälp av en så kallad HbA1c analys. HbA1c är en slutprodukt av en så kallad glykemisk hemoglobin, glukos som naturligt används i kroppens röda blodkroppar. HbA1c visar den genomsnittliga glukoskoncentrationen under 120 dagar som är livslängden för röda blodkroppar.

Denna studie fokuserar på tre HbA1c analysmetoder: enzymatisk (Direct enzymatic HbA1c), immunologisk (Hemoglobin A1c) och en High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). HPLC används idag och analysen görs på instrumentet, TOSOH G7, som används i rutin på Västerås sjukhus medan de två andra metoderna kördes i ett annat instrument (AU 680) för att jämföras med varandra och med HPLC. Vid analys med HPLC har det visat sig svårt att detektera HbA1c om patienten har stora mängder av en hemoglobin-variant, HbF. Hemoglobin-varianter är normala i kroppen och kan medföra hinder vid analys av HbA1c.

Förberedelse och behandling såsom hemolysering av patientprov utfördes utanför instrumentet AU 680. Detta eftersom patientprov och en buffert för hemolysering måste inkuberas i minst 10 minuter, vilket inte sker i AU 680.

Resultaten (från 134 patientprover) jämfördes mot HPLC analysmetoden och jag fann att metoden Hemoglobin A1c förhåller sig bättre till HPLC än vad Direct enzymatic HbA1c analysmetoden gjorde. En observation kan göras vid analys där endast hemoglobin-varianter ingick (10 patientprover), Hemoglobin A1c och Direct enzymatic HbA1c förhåller sig väl till varandra, däremot är Direct enzymatic HbA1c förskjuten till höger jämfört med HPLC och Hemoglobin A1c, det vill säga att Direct enzymatic HbA1c ger ett lägre resultat för samma patientanalys jämfört med de andra analysmetoderna.

Resultatet för Direct enzymatic HbA1c kan bero på att leverantören för reagensen gav fel reagens och fel parametrar för programmeringen av instrumentet AU 680. Reagens var gjorda för ett annat instrument och inte för AU 680. Vidare studier bör göras på Direct enzymatic och med rätt reagens innan man utesluter analysmetoden.

Författare: Gabi Marrouki

Titel

HbA1c – En jämförelse mellan två analys principer gentemot en befintlig

Title

HbA1c - A comparison between two analysis principles against a current.

Handledare

Skriv handledare: Bodil Hernroth, professor, Högskolan Kristianstad

Laboratoriehandledare: Johan Skogö, ST-läkare, Västerås Sjukhus

Examinator

Ann-Sofi Rehnstam-Holm, professor, Högskolan Kristianstad

Svensk Sammanfattning

Glykerat hemoglobin, HbA1c, är en indikation på genomsnittligt glukosvärde. HbA1c används vid diagnostisering av diabetes men också uppföljning av diagnostiserade diabetiker. Uppföljningen visar hur väl diabetiker förhåller sig till kost men också medicinering. Informationen av patientens HbA1c värde spelar en stor roll i vidare behandlingar. Analysmetoden HbA1c är inte helt standardiserad vilket har medfört att flera analysmetoder utvecklats för HbA1c.

Syftet med denna studie var att undersöka om en enzymatisk, Direct enzymatic HbA1c eller immunologisk analysmetod, Hemoglobin A1c kan lösa problemet med hemoglobin-varianter vid analys av HbA1c som idag analyseras med HPLC som rutin på klinisk kemi-laboratorium i Västerås.

Genomförandet gjordes på två instrument, TOSOH G7 och AU 680. TOSOH:s värden (HPLC) användes vid jämförelse av de två analysmetoderna på AU680. Förberedelse och behandling, såsom hemolysering, skedde innan proven sattes i instrumentet AU680.

Resultatet (n=134) visade att analysmetoden Hemoglobin A1c förhöll sig väl till HPLC analysmetod ($R^2=0,98$) jämfört med vad analysmetoden Direct enzymatic HbA1c gjorde ($R^2=0,86$). Likartade resultat kunde observeras för Hemoglobin A1c ($R^2=0,98$) och Direct enzymatic Hba1c ($R^2=0,95$) då bara patientprov med hemoglobin-varianter analyserades (n=10). Mann-Whitney's U-test vid analys av hemoglobin varianter med Hemoglobin A1c visade en tendens till signifikant skillnad gentemot HPLC analysen ($p=0,051$; $n=34$).

Fel reagens erhöles från reagenstillverkaren gällande Direct enzymatic, Detta kan förklara det erhållna resultatet och kräver fler analyser med korrekta reagens. Hemoglobin A1c bör även undersökas vidare med mer omfattande provmaterial för möjlig standardisering i rutin hos KKTm i Västerås.

Ämnesord: HbA1c, Enzymatisk analysmetod, Immunologisk analysmetod, Diabetes Mellitus, HPLC analysmetod

Abstract

Glycated hemoglobin, HbA1c, is an indication of average long-term glucose. HbA1c is used as a diagnostic method for diabetes but also as a follow-up for diagnosed diabetics. Follow-ups shows how well a diabetic relates to diet but also medication. The information of the patient's HbA1c value plays an important factor in further treatments. The analysis method for HbA1c is not standardized, which has resulted in several analysis methods developed for HbA1c.

The purposes of this study were to investigate whether an enzymatic, Direct enzymatic HbA1c or immunological assay method, Hemoglobin A1c, can solve the problem of hemoglobin variations in the analysis of HbA1c, which is currently analyzed by HPLC as a routine at the clinical chemistry laboratory in Västerås

The implementation was performed on two instruments, TOSOH G7 and AU 680. The values from TOSOH (HPLC) were used for comparison of the two analysis methods applied on the AU680. Preparation and treatment, such as hemolysis, occurred before putting the samples into the AU680 instrument.

The result showed that the Hemoglobin A1c assay method was well-matched with HPLC assay ($R^2 = 0.98$) in comparison to that of the Direct enzymatic HbA1c assay method ($R^2 = 0.86$). Similar results could be observed for Hemoglobin A1c ($R^2 = 0.98$) and Direct Enzyme HbA1c ($R^2 = 0.95$) when only samples from patients with hemoglobin variants were analyzed ($n=10$). Solely analysis of hemoglobin variants with Hemoglobin A1c showed a boundary case for a significant difference compared to HPLC analysis ($P = 0.051$; $n=134$).

Incorrect reagents were obtained from the reagent manufacturer in the case of Direct enzymatic. This can explain the results obtained. Hemoglobin A1c should also be investigated with more extensive test materials for possible standardization in the routine of KKTU in Västerås.

Keywords: HbA1c, Enzymatic assay method, Immunological assay method, Diabetes Mellitus, HPLC assay method

Innehåll

1	Introduktion.....	1
1.1.	Epidemisk effekt.....	1
1.2	Bakgrund.....	2
1.2.1	Glykerat hemoglobin.....	2
1.3	HbA1c	2
1.3.1	HbA1c – Direct enzymatic HbA1c och Hemoglobin A1c	2
2	Material och metod	3
2.1	Urval	3
2.2	Programmering	4
2.2.1	Analysmetod.....	4
2.2.2	Förbehandling av Direct enzymatic HbA1c	4
2.2.3	Förbehandling av Hemoglobin A1c	4
2.2.4	Beredning av reagens.....	5
2.2.5	Bestämning av HbA1c med Direct enzymatic HbA1c	5
2.2.6.	Bestämning av HbA1c med Hemoglobin A1c (immunologisk metod)	5
2.3	Utvärdering	6
2.3.1.	Precisionstest	6
2.4	Etiska överväganden	6
2.4.1	miljö- och säkerhetsaspekter	6
3	Resultat	7
3.1	Hemoglobin-Varianter	10
4	Diskussion.....	10
5	Slutsats	12
	Tackord	12
	Referenser	13
	Bilaga 1	15
	Bilaga 2.....	18

1 Introduktion

Diabetes Mellitus (DM) är ett samlingsnamn för flera sjukdomar med ett gemensamt tillstånd, hyperglykemi (Berne & Fritz 2015). Hyperglykemi, mer känt som högt blodsocker, är en hög ansamlingsgrad av glukos i plasma (Inzucchi et al. 2011). Antalet fall med välkända DM sjukdomar, såsom typ 1 och typ 2 diabetes, uppskattas idag till 423 594 diagnostiserade patienter i Sverige (NDR, 2016).

Diabetes typ 1 är ett sjukdomstillstånd där betaceller i bukspottskörteln förlorar funktionen att producera insulin. T-cellmedierad förstörelse av betaceller, även känt som en autoimmunsjukdom, är orsaken till förlorad produktion av insulin (Wen et al. 2008). Uppkomsten av typ 1 diabetes patologiska mekanism är inte helt känt men studier har kunnat påvisa att förlusten av självigenkänning hos T-celler är associerat till uppkomsten av sjukdomsförloppet. T-celler genomgår flera toleranstester i thymus där förmåga för tolerans mot igenkänning av betacellers autoantigen testas. Vid misslyckad eller för stark igenkänningen av autoantigen induceras apoptos av defekta T-celler. Studier i djur har kunnat påvisa att mekanismen för tolerans av autoimmunitet för betaceller har genetiska orsaker men kan även påverkas av miljön (Lindley et al. 2005).

Diabetes typ 2 är ett sjukdomstillstånd där produktionen av insulin är onormalt lågt eller så kan kroppens celler ha blivit mer resistent mot insulin. Bukspottskörteln betaceller underpresterar vilket medför en lägre insulinsekretion. Den patologiska mekanismen är under utredning men studier har kunnat påvisa förminskade betaceller i patienter med typ 2 diabetes (Butler et al. 2003). Ett antal studier har genomförts på patienter med typ 2 diabetes och man har kunnat dra slutsatsen att väl kontrollerad glykemisk kontroll har medfört färre fall av hjärt-kärl-sjukdomar. Livsstilsförändring med minskning av kolhydratkonsumtion har lett till bättre glukosnivåer (Inzucchi et al. 2012).

DM sjukdomar har tendens att underdiagnostiseras på grund av sjukdomsförloppet. DM sjukdomen, typ 2 diabetes, bryter ut i ett smygande förlopp och det har uppskattats att 5.2 miljoner patienter i USA är odiagnostiserade (Jönsson 2002) och i Sverige är det ca. 150 000 (Diabetesförbundet 2016).

1.1. Epidemisk effekt

Diabetes Mellitus återfinns världen runt och visar korrelation med ländernas utveckling och ekonomi. Kina, ett utvecklingsland på snabb frammarsch inom teknologi och agrikultur, står för 60 procent av världens diabetiska population (Hu 2011). DM sjukdomar är konstant växande och år 1995 uppskattades 135 miljoner människor vara påverkade av någon typ av DM och vid år 2025 uppskattar man att siffran kan stiga till 300 miljoner (King et al. 1998).

En utökad förståelse om DM sjukdomar, i synnerhet typ 2 diabetes, medför utökad patientförbättring och livskvalité. Däremot är utvecklingsländerns kunskap inom diabetes ofta låg vilket medför att det där i högre grad kvarstår svårigheter för patienten (Hu. 2011).

1.2 Bakgrund

1.2.1 Glykerat hemoglobin

Kolhydrater tillförs kroppen genom konsumtion av föda. Det mesta av kolhydraterna bryts ner till glukos. Glukos används primärt som energikälla. Hög ansamling av glukos medför att insulin frisätts ut i blodbanan från pankreas betaceller. Insulin stimulerar glukosupptag i fettvävnader där det lagras i form av glykogen (Khan & Pessin 2002).

De röda blodkropparna (erythrocyterna) kräver glukos för sin energiförbrukning. I erythrocyterna blir hemoglobinet glykerat genom en biokemisk process som sker icke-enzymatiskt. Reaktionen sker mellan glukos och N-terminalen i slutet av β -kedjan i hemoglobinet, vilket formar aldimin (Sherwani et al. 2016). Aldimin, en reversibel produkt, bildas under en första primär glykering. Ett gemensamt namn för olika sub-klasser av iminer är Schiff bas. Ett sekundärt irreversibelt steg tar plats där Schiff basen långsamt konvertereras till en stabil ketoamin. Konvertering av Schiff basen till ketoamin sker genom en så kallad Amadori omlagring (Acharya et al. 1991).

Slutprodukten, HbA1c, från Amadori omlagringen används som biomarkör vid analys och uppföljning av diabetes. HbA1c ger en indikation av genomsnittlig glykerat hemoglobin under hemoglobinet livslängd, motsvarande 120 dagar, och speglar på så vis blodets integrerade glukosvärde (Florkowski 2013)

1.3 HbA1c

Eftersom analysresultatet av HbA1c indikerar ett genomsnittligt glykerat hemoglobinvärde, används det för uppföljning av diagnostiserade diabetiker. HbA1c analysen har inga krav på fasta eller dygnspecifika analystillfällen vilket underlättar för patienten (Taira et al. 2014). Andra glukosrelaterade analyser såsom fastande glukos (FPG) eller oral glucose tolerance test (OGTT) orsakar oftast mer problem för patienterna. OGTT kräver att patienten fastar under åtta timmar innan analys. Patienten får sedan konsumera 75 g glukos under en tidsintervall på fem minuter. Detta har medfört att patienter uppvisar yrsel och kräkningar efter intaget av sockerlösningen (Florkowski 2013).

Analysresultat från OGTT har tendens att ge förändrat resultat vid upprepad belastning och kan variera upp till 66 %. Detta kan medföra fel diagnostisering och att fel behandling implementeras (Ko et al. 1998).

1.3.1 HbA1c – Direct enzymatic HbA1c och Hemoglobin A1c

Hemoglobin-varianter är ett normalt förekommande fenomen som beror på många olika genetiska variationer. Hos foster finns Hemoglobin F (HbF) som det dominanta hemoglobinet men det kan även återfinnas hos vuxna (Nitta et al. 2014). En hög andel HbF har uppvisat falska diagnostiseringar av DM (Cayci et al. 2011). Reagenstillverkaren för enzymatiska metoden, Direct enzymatic HbA1c, hävdar att hemoglobinvarianter, bland annat HbF, inte medför

analysfel. HbF orsakar däremot svårigheter vid analys av HbA1c med High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), som är den analysmetod man idag använder vid klinisk kemi och transfusionsmedicin (KKTm) i Västerås.

Vid den immunologiska analysmetoden, Hemoglobin A1c, avläses antikropp-antigen-komplex som identifierar målantigen. Det har visats att Sick cell (HbS), en hemoglobin-variant, ger ostabila resultat. Däremot har HPLC metoden kunnat identifiera HbS då immunologiska metoder inte kunnat. Detta kan bero på en substitution i position 6 hos beta-globinkedjan vilket medför att antikroppen inte kan binda till detta målantigenet (Nasir et al. 2010).

Syftet med denna studie var att undersöka om en enzymatisk, Direct enzymatic HbA1c eller immunologisk analysmetod kan lösa problemet med hemoglobin-varianter vid analys av HbA1c som idag analyseras med HPLC som rutin vid klinisk kemi-laboratorium i Västerås.

2 Material och metod

2.1 Urval

Urvalet av patientprov baserades på patienters HbA1c-värden, vilket erhöles med laboratoriets HPLC-instrument, TOSOH G7. 134 patientprov som inkluderade 10 kända hemoglobin (Hb)-varianter, kunde användas utifrån HbA1c-värden. Nyligen analyserade patientprov på TOSOH G7, undantag för patienter som uppvisade hemoglobin-varianter, prioriterades vid urvalet av patientprov. Konsultering med ansvarige läkare och ingenjör hjälpte också för att bestämma urvalet av patientprov.

Respektive prov gjordes anonyma genom borttagning av patientinformation från provrör och ett nytt ersättningsnummer beställdes.

Nödvändiga material, bland annat, justerbara pipetter, förkläder, handskar, instruktion av avfallshantering och instrument tillhandahölls av klinisk kemi och transfusionsmedicin (KKTm).

Enzymatiska metoden, Direct enzymatic HbA1c, (Diazyme Laboratories, Inc, USA) inkluderade bland annat enzymatiska reagens, vilket insattes i instrumentet AU 680 (Diazyme HbA1c), reagenskontroll, en låg och en hög kontroll av rätt uppvisat värde från kalibratoren, (Bi-level HbA1c controls), lyseringsbuffert vid lysering av helblod (Lysis Buffer) och kalibratorer, en låg och en hög vid kalibrering av reagenset, (HbA1c calibrator set).

Material för immunologiska metoden, Hemoglobin A1c, som Beckman Coulter tillhandahöll bestod av bland annat HbA1c reagens, total Hb reagens, kalibratorer, en låg och en hög vid kalibrering av reagenset, (Systems HbA1c- Calibrators), reagenskontroll, en låg och en hög kontroll av rätt uppvisat värde från kalibratoren och lyseringsbuffert vid lysering av helblod, (AU® Systems Hemolyzing Reagent).

Respektive reagens sattes in i instrumentet AU 680 (Beckman Coulter, Kalifornien, USA).

Metoderna fordrade helblod varför endast EDTA-rör (Vacutainer®) användes vid analys av patientprov.

2.2 Programmering

Ett programmeringssteg var väsentligt då Direct enzymatic HbA1c, tidigare aldrig använts på Beckman Coulter AU 680 instrumentet vid klinisk kemi, Västerås. Initialt programmerades instrumentet enligt tillverkarens instruktioner men en ny programmering tillhandahölls av reagenstillverkaren vilket blev den preliminära programmeringen av instrumentet.

Beckmans egna reagens, Hemoglobin A1c, för den immunologiska metoden, medförde en enklare programmering eftersom reagenset är specifikt framtaget för Beckmans AU instrument. Programmering utfördes av leverantörens ingenjörer.

Instrumentet programmerades att dispensera 25 µl av patientprov vid analys av Direct enzymatic HbA1c, respektive 18 µl vid analys av Hemoglobin A1c, till en kyvett med hjälp av instrumentets provnål. Provnålen tvättas med avjonat vatten och en tvättlösning mellan varje dispensering. Efter dispensering sker en blandning av reagensen i instrumentet. Speciella inklädda teflonstavar blandar reagenset, därefter sker dispensering av reagensen till en kyvett i instrumentet med en reagensnål. Härmed sker en tvätt av nålen och teflonstavarna.

2.2.1 Analysmetod

Analys av proverna (enzymatiska och immunologiska metoden) utfördes på en Beckman Coulter AU 680. Notera att instrumentet är inkopplat i en helautomatiserad bana. Denna bana används idag av personalen vid klinisk kemi för att underlätta provhantering och distribuering till rätt instrument.

I dagsläget utförs HbA1c analyser på TOSOH G7. TOSOH G7 använder sig av high-performance liquid chromatography (HPLC) -metod för analys av HbA1c. Instrumentet är inte påkopplat på den helautomatiserade banan vilket medför att personalen vid klinisk kemi påbörjar analysen manuellt.

2.2.2 Förbehandling av Direct enzymatic HbA1c

Beckman Coulter AU 680 har ingen förprogrammering för dispensering av buffert och provmaterial och inkubering under en angiven tid. Reagenset från leverantören kräver en inkubationstid på minimalt 10 minuter med leverantörens egna lyseringsbuffert (Diazyme Laboratories, Inc, USA) för att säkerställa en komplett hemolysering. Därför förbehandlades respektive patientprov utanför instrumentet i minst 10 minuter.

Till ett Eppendorfrör pipetterades 250 µl av lyseringsbuffert, sedan tillsattes 20 µl helblod från patientprov. Eftersom blod har hög viskositet tillämpades reversibel pipettering. Eppendorfröret utsattes för 5 sekunder vortex (VORTEX-GENIE® 2 MIXER-Rugged), därefter inkubation i rumstemperatur i cirka 10 minuter.

2.2.3 Förbehandling av Hemoglobin A1c

Då Hemoglobin A1c metoden från Beckman är anpassad till AU-instrument krävdes ingen inkubationstid på 10 minuter. Däremot för en underlättat jämförelse av analysmetoderna, inkuberades även Hemoglobin A1c i 10 minuter såsom för Direct enzymatic HbA1.

Pipettering av Hemoglobin A1c reagenset utfördes på ett liknande vis som Direct enzymatic HbA1 med undantag för volym och material. Istället för Eppendorfrör användes 6 ml vial, 20 µl helblod och 2 ml av lyseringsbuffert från Beckman (AU® Systems Hemolyzing Reagent)

2.2.4 Beredning av reagens

Beckmans AU 680 instrument har en kapacitet att hantera två olika reagens till samma analys. Det vill säga att instrumentet kan använda reagens i två upplagor (R1, R2) och inte i tre upplagor (R1, R2 och R3). Diazymes reagens är ett tre reagens uppsättning och krävde en modifiering. Enligt Diazymes instruktion kunde tre reagenset modifieras till ett två reagens upplaga genom att R1 och R2 blandades.

Kontroller och kalibratorer behandlades som patientprov enligt leverantörernas instruktioner. Det vill säga att pipetteringsvolym av bland annat hemolysbuffert till kontroller och kalibratorer ska återspegla patientproven. Kontrollernas erhållna värden från instrumentet jämfördes med kontroll-värden från leverantörerna.

2.2.5 Bestämning av HbA1c med Direct enzymatic HbA1c

Helblod utsätts för en extensiv lysering med *Bacillus sp proteas* (Diazyme Laboratories, Inc, USA). Detta medför frisättning av glykerat valin från betakedjan i hemoglobinet och aminosyror. Glykerat valin utnyttjas som substrat för ett specifikt rekombinant enzym, fructosyl-valine-oxidase (FVO). FVO klipper specifikt N-terminalen hos valin som ger slutprodukten peroxid. Slutprodukten mäts sedan med hjälp av en fotometrisk (700 nm) metod efter horseradish peroxidase (HRP) katalyserad reaktion.

2.2.6. Bestämning av HbA1c med Hemoglobin A1c (immunologisk metod)

Analysprincipen bygger på två metoder, total Hb och A1c. Hemoglobin-reagens används för att mäta koncentrationen av total Hb med hjälp av instrumentets spektrofotometer. Instrumentet dispenserar automatisk rätt mängd genom att ta en del patientprov och 8,6 delar reagens till en kyvett. Instrumentet övervakar förändringar i absorbans vid 410 nanometer. Absorbansförändringarna är direkt proportionella till koncentrationen av totalt hemoglobin. Med denna information kan instrumentets mjukvara räkna ut total-hemoglobin.

A1c-reagens används för att mäta koncentrationen A1c i hemoglobin. Metoden bygger på en turbidimetri, det vill säga uppmätning av förlorad intensitet av överfört ljus på grund av spridningseffekten. Instrumentet dispenserar en del patientprov och 26 delar reagens till en kyvett. A1c antikroppar och Hemoglobin A1c binder till varandra och bildar ett antigen-antikropp komplex. A1c-reagenset innehåller poly-hapten, som binder till överblivna antikroppar. Detta medför en agglutination som mäts turbidimetrisk. Instrumentet mäter sedan förändringar i absorbans vid 340 nanometer. Förändringarna i absorbans är omvänt proportionell mot koncentrationen av hemoglobin A1c i provet.

Det är viktigt att notera att resultaten från Hb och A1c måste kombineras och inte tolkas individuellt. Instrumentet anger total Hb, A1c och HbA1c.

2.3 Utvärdering

En jämförelse av resultaten som erhöles med TOSOH G7 och Beckman Coulter AU 680 gjordes med hjälp av korrelationsanalys för att uppskatta hur väl instrumenten förhåller sig gentemot varandra. Avvikelse mellan de erhållna värdena testades med Mann-Whitney's U-test för att få fram p-värdet. Viktigt att notera att TOSOH G7 HbA1c-värden anges i mmol/mol enligt The International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) medan AU 680 anger värden i procent enligt National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP).

En konvertering av 134 patientprov från procent till mmol gjordes med hjälp av leverantörens instruktioner för Direct enzymatic HbA1c. Eftersom instrumentet AU 680 uppvisade ett direkt NGSP värde, krävdes inga vidare åtgärder än leverantörernas instruktion angående konvertering från % (NGSP) till mmol/mol (IFCC).

Endast resultaten från patientprov som analyserades med Direct enzymatic HbA1c-metoden konverterades mellan NGSP och IFCC. Resultaten från Hemoglobin A1c-metoden (IFCC) uppvisades i mmol/mol.

Bland-Altman diagram kunde plottas för en jämförelse mellan Direct enzymatic HbA1c respektive Hemoglobin A1c gentemot HPLC (n=134).

2.3.1. Precisionstest

För metoderna Direct enzymatic HbA1c och Hemoglobin A1c gjordes precisionstester. Tre patientprover med tre olika nivå-värden, ett lågt värde (37 mmol/mol), ett medel värde (72 mmol/mol) och ett högt värde (100 mmol/mol) analyserades i respektive analysmetod. Ett medelvärde, SD (standarddeviation) och ett CV (variationskoefficient) beräknades. Dessa värden kunde indikera hur väl analysmetodernas precision förhåller sig till ett känt värde, TOSOH.

2.4 Etiska överväganden

Inga etiska tillstånd behövdes eftersom denna studie ingår i Laboratoriemedicin Västmanlands kvalitetssäkringsprojekt. Diskussion med ansvarig läkare kunde bekräfta att vidare åtgärder inte behövdes utöver anonymisering av patienters blodprov. Patienter genomgick inga vidare provtagningar i samband med denna studie. Erhållet analysvärde presenterades inte för patienter eftersom analysmetoderna inte är verifierade.

2.4.1 miljö- och säkerhetsaspekter

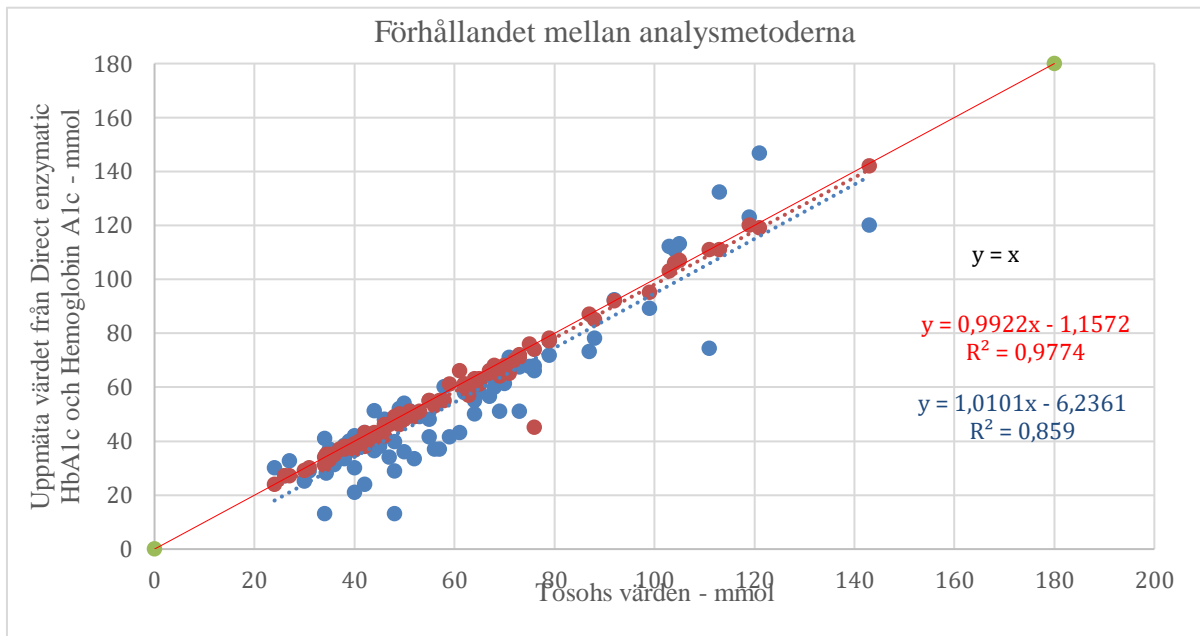
De tillhandhållna reagensen från respektive reagenstillverkarna innehöll humant serum. Tillverkarna hävdar att respektive serum har behandlat mot hepatitvirus och andra smittfarliga sjukdomar som kan överföras genom humant serum. Vid hantering av reagens användes latexhandskar och skyddsrock, inga skyddsglasögon var nödvändiga under laborationen.

Sjukhuset har tydliga regler av hur tömda reagens ska hanteras. Avfall märkt med bioavfall för bland annat reagens med serum användes vid kassering av tömda flaskor, resterande flaskor källsorterades.

3 Resultat

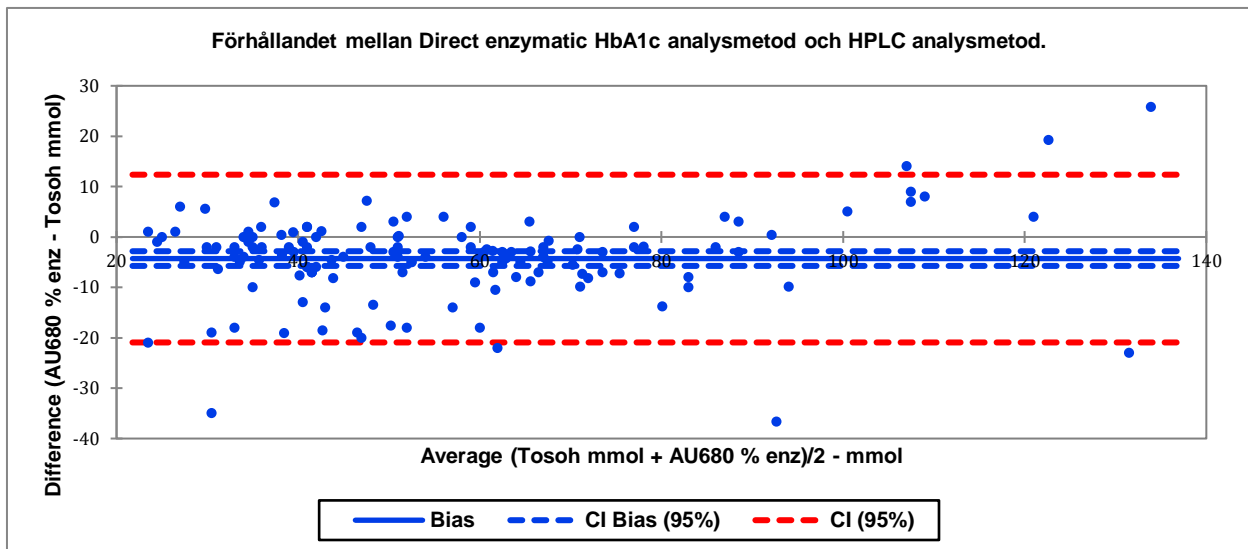
Det erhållna resultatet från instrumentet TOSOH och AU680 konverterades mellan NGSP och IFCC (Bilaga 1). Resultat från Hemoglobin A1c krävde ingen konvertering eftersom resultatet från Hemoglobin A1c är i mmol/mol

Korrelationsanalysen (Figur 1) visar att Direct enzymatic HbA1c analysmetoden (blåa punkter i grafen) avviker mer ($R^2=0,859$) än Hemoglobin A1c analysmetoden (röda punkter i grafen) ($R^2=0,992$) då de jämförs med TOSOH (HPLC).



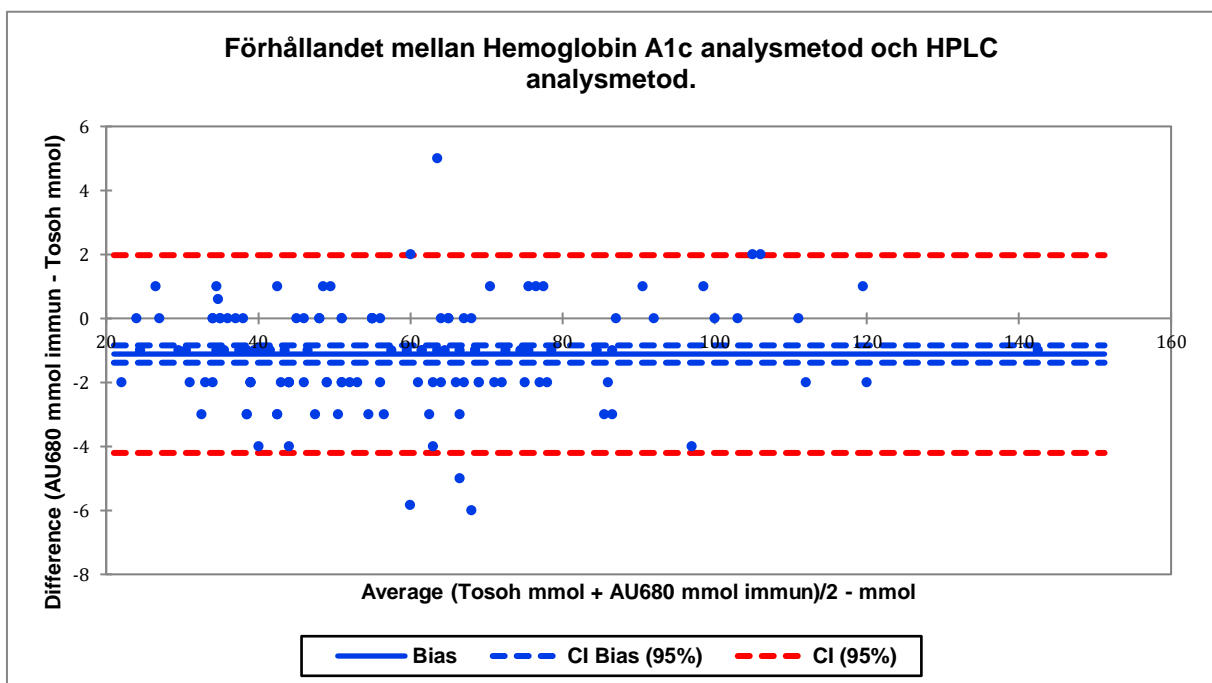
Figur 1: Korrelationskurva mellan Hemoglobin A1c, Direct enzymatic HbA1c och HPLC analysmetod. Hemoglobin A1c (röda punkter) förhåller sig bättre till TOSOH än Direct enzymatic HbA1c (blåa punkter) (n=134)

Bland-Altman diagram (Figuren 2) visar spridningen av resultaten från Direct enzymatic HbA1c metoden i förhållande till TOSOH-resultaten (HPLC). Tydliga spridningar kan observeras, sju punkter i Figur 2 befinner sig utanför limit of agreement (95%), resterande punkter ligger utspritt runt Bias eller utanför limit of agreement av Bias. Limit of agreement (95%) (röd linje) visar hur väl mätningarna av respektive analysmetod förhåller sig gentemot varandra. Bias (blå heldragen linje) är medelvärdet av respektive analysmetod (Direct enzymatic HbA1c, Hemoglobin A1c).



Figur 2: Bland-Altman-diagram som visar hur Direct enzymatic HbA1c förhåller sig till TOSOH. Spridningen kan observeras eftersom respektive analysresultat inte förhåller sig gentemot Bias linjen. en konvertering behövdes från NGSP till IFCC för att erhålla mmol/mol (n=134)

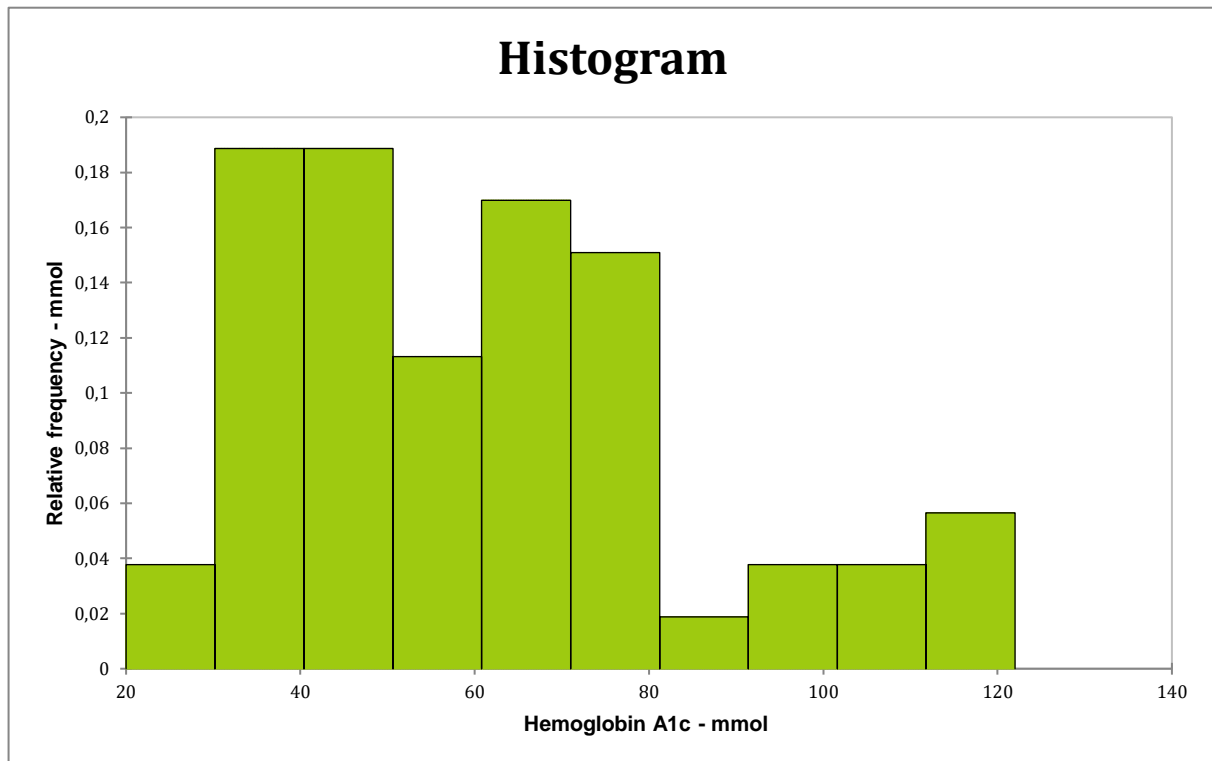
Bland-Altman diagrammet (Figur 3) visar spridning av resultat från Hemoglobin A1c metoden i förhållande till TOSOH (HPLC). Sju punkter i Figur 3 befinner sig utanför limit of agreement (95%) Resterande punkter ligger utspritt runt Bias eller utanför limit of agreement av Bias



Figur 3: Bland-Altman-diagram som visar hur resultaten från Hemoglobin A1c förhåller sig till de från TOSOH-metoden. Spridningen kan observeras eftersom respektive analysresultat inte förhåller sig gentemot Bias linjen. Ingen konvertering behövdes eftersom resultatet erhöles i mmol/mol (n=134)

Från resultaten i Bilaga 1 kan man se stor avvikelse av resultaten från Direct enzymatic HbA1c metoden jämfört med HPLC och därför påbörjades felsökning. Ingen undersökning av normalfördelning eller signifikanstest utfördes för Direct enzymatic analysmetoden eftersom det visade sig att fel reagens tillhandahållits.

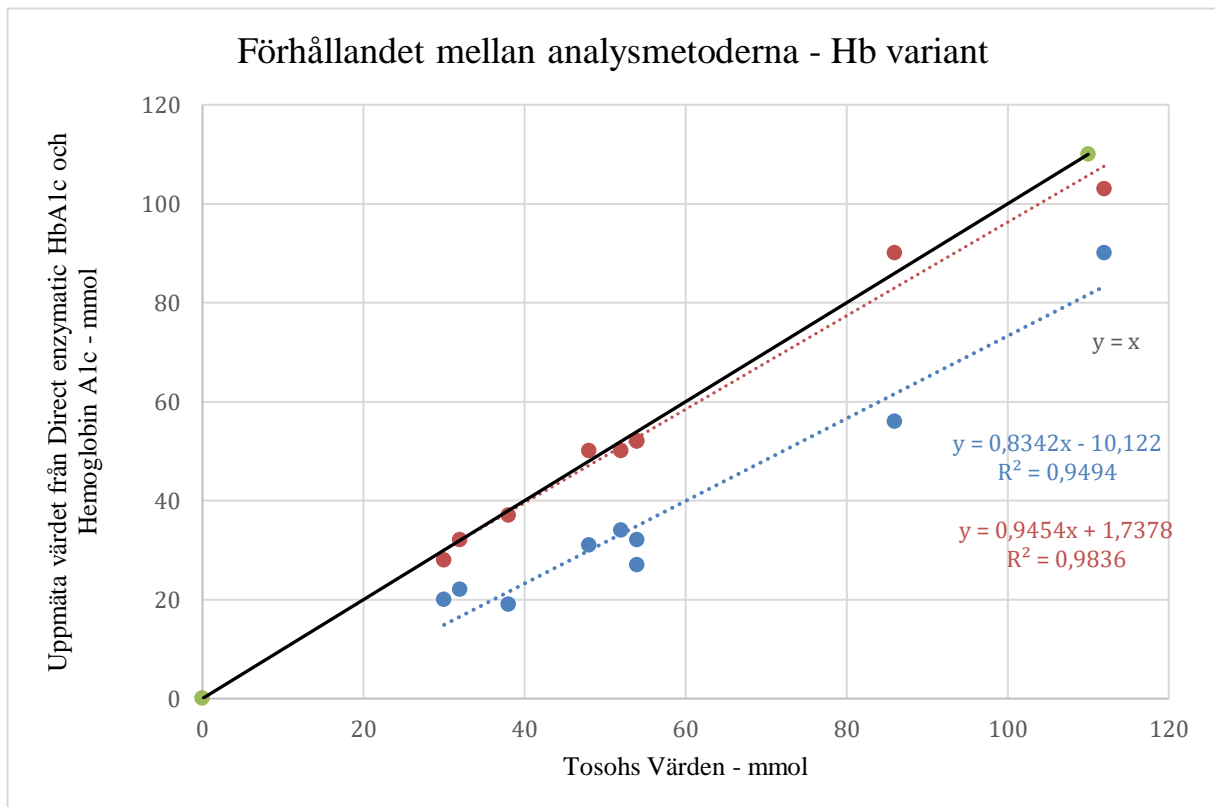
Ett histogram (Figur 4) användes för att undersöka fördelningen av resultaten från Hemoglobin A1c. Då dessa inte var normalfördelade valdes en icke-parametrisk Mann-Whitney's U-test för att undersöka om denna metod skilde sig från HPLC-metoden. P-värdet blev 0,051 vilket är inom gränsfall ($P < 0,05$) och antyder att en signifikant skillnad kan finnas mellan dessa metoder.



Figur 4: Saknar fortfarande en rubrik här. Staplarna i figuren har inte en Gaussisk form, vilket tyder att uppmätta Hemoglobin A1c inte är normalfördelat (n=134)

3.1 Hemoglobin-Varianter

Då bara de resultat som erhöles från patienter med Hb-varianter jämfördes (n=10) visar korrelationsanalysen (Figur 5) att Hemoglobin A1c förhåller sig något bättre till TOSOH ($R^2=0,983$) (röda punkter) i jämförelsevis med Direct enzymatic HbA1c ($R^2=0,949$) (blåa punkter).



Figur 5: Korrelationskurva mellan respektive analysmetod med resultat erhållna från patienter med hemoglobinvarianter. Hemoglobin A1c (Blåa punkter) förhåller sig bättre till TOSOH än Direct enzymatic (röda punkter) HbA1c (n=10).

4 Diskussion

Ett av de väsentliga stegen i denna studie var programmering av instrumentet AU 680. Fel programmering kan medföra att fel mängd reagens eller patientprov dispenseras och analyseras. Detta kan medföra falskt låga eller falskt höga värden i analysresultatet.

Innan större uppsättning av patientprov kunde analyseras på respektive analysmetod utfördes en testanalys. Fyra patientprover med olika HbA1c värden analyserades med Direct enzymatic HbA1c och jämfördes mot TOSOH:s analysresultat. Analysresultatet uppvisade lovande värden gentemot TOSOH:s (Bilaga 2). De analysresultat som erhöles från 134 patientprov (Bilaga 1) med Direct enzymatic HbA1c analysmetod visade mer inkonsekventa värden. Inga tydliga mönster kunde noteras vilket medförde svårigheter i felsökningstegen. Däremot kunde man iakttaga att ett resultatvärde som översteg 100 mmol/mol HbA1c var kraftigt förhöjt i

jämförelse med TOSOH:s värde. Det skulle kunnat bero på kontamination av instrumentnålen från tidigare patientprov. En diskussion med ansvarig läkare och ingenjör kunde dock utesluta denna teori eftersom resterande patientprov inte visade samma avvikelser.

Två Bland Altman-diagram plottades för att jämföra hur väl Direct enzymatic HbA1c och Hemoglobin A1c förhöll sig gentemot TOSOH. Klara spridningar kunde noteras, sju punkter faller utanför limit of agreement för båda diagrammen. Flera punkter faller utanför bias limit of agreement och resterandepunkter är utspridda gentemot Bias linjen (Figur 2 och 3). Viktigt att notera att kontroll-värden för Diazyme metoden har högre toleransvärden (mellan ± 1.3 för den höga kontrollen och ± 1.6 för den låga kontrollen) än vad som normalt krävs för HbA1c (Landin-Olsson et al. 2010).

Tidigare studier har kunnat påvisa att Direct enzymatic HbA1c förhåller sig noggrant och precist gentemot HPLC-analysmetod (Liu et al. 2008), vilket medförde att en precisionstest utfördes för konfirmation av påståendet. Precisions-testet kunde bekräfta att analysmetoden hade en bra noggrannhet, ett CV värde på 0,2 % (Bilaga 3). Vidare repetitiva analyser på patientprov utfördes och ett likande mönster kunde detekteras, en liten spridning av resultat.

Innan alla analyser med Direct enzymatic slutfördes på AU680, kontaktades reagenstillverkaren för vidare utredning. Misstanke fanns att fel reagens och fel instruktionsparameter hade tillhandahållits från reagenstillverkaren, vilket reagenstillverkaren kunde konfirmera. Detta kan förklara spridningen av resultaten då patientproverna analyserades.

Hemoglobin A1c analysmetoden precisionstestades omgående innan analys av 134 patientprov. Denna visade ett CV värde på 0,3 % och ett SD värde på 0,9 mmol/mol (Bilaga 3). En tydlig korrelation kunde observeras mellan Hemoglobin A1c och TOSOH:s (Figur 1). Fenomenet kunde även observeras vid analys av patientprov med hemoglobin-varianter. Direct enzymatic HbA1c har en noterbar spridning men också en förskjutning neråt i y-axeln och åt höger på x-axeln i korrelationskurvan gentemot Hemoglobin A1c (Figur 5), det vill säga att lägre HbA1c värde erhöles från Direct enzymatic HbA1c för samma patientanalys jämfört med Hemoglobin A1c och TOSOH. Återigen, detta fenomen kan ha berott på att fel reagens tillhandahölls av reagenstillverkaren, vilket leverantören bekräftade att det kvarstod även vid den andra upplaga av reagens som tillhandahölls. Även programmeringsparametrarna var inkorrekta. Direct enzymatic HbA1c uteslöts därför från vidare tester gällande normalfördelning och t-test.

Trots den goda korrelationen mellan Hemoglobin A1c och TOSOH visade det erhållna p-värdet ($p=0,051$) vid jämförelse av 134 patientprov att det fanns en tendens till signifikant skillnad mellan metoderna, med lägre värden för Hemoglobin A1c. Fler analyser bör göras eftersom p-värdet är inom gränsen för alpha-värdet 0,05.

Studier har visat att patienter med DM löper större risk för utveckling av vaskulära sjukdomar. Sjukdomar likt disseminated intravascular coagulation (DIC) är ett exempel på sjukdomsförlopp på grund av diabetes typ 2 (Nogami et al 2017). I studier som The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) har man kunnat påvisa relation mellan metabol kontroll och utveckling av mikrovaskulära komplikationer (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993). Detta har medfört att HbA1c legat i fokus och lett till försök att globalisera denna mätning eftersom den visar hur väl patienten svarar på

behandling och hur väl patienten sköter sin medicinering. HbA1c analysresultat har tidigare i Sverige angetts NGSP, procent. Detta har ändrats till IFCC, mmol/mol, enligt instruktioner och rekommendationer från bland annat American Diabetes Association (ADA) och European Association for the Study of Diabetes (EASD) (Jeppsson et al 2002). Detta tyder på ett steg närmare mot ett globaliserat analysvärde av HbA1c.

5 Slutsats

Direct enzymatic-metoden kan inte tillämpas i rutin på grund av inkonstanta analysvärden och en alltför omfattande förberedelse innan analys på instrumentet AU 680. Uteslutning av denna metod bör dock inte göras. Mer omfattande studier med rätt reagens och rätt programmeringsparametrar bör göras innan uteslutning av analysmetoden.

Hemoglobin A1c bör även undersökas vidare med mer omfattande provmaterial för möjlig standardisering i rutin hos KKTMM i Västerås.

Tackord

Tack till min handledare Johan Skogö för hjälp med att inskaffa information och hjälp vid insamling av patientprov. Tack till Bodil Hernroth för stöd och information med uppsatsens utformande. Tack till Karin Hammar Klacksell för hjälp vid programmering av instrument. Tack till kemi Susanne Lundqvist, processhandledaren för allmän, för hjälp vid insättning av prov och för bland annat information gällande pipetteringsteknik.

Referenser

- Acharya, A. S., Roy, R. P., Dorai, B. (1991). Aldimine to ketoamine isomerization (Amadori rearrangement) potential at the individual nonenzymic glycation sites of hemoglobin A: preferential inhibition of glycation by nucleophiles at sites of low isomerization potential. *J Protein Chem*, 10(3), ss. 345-58 PMID: 1910466
- Butler, A. E., Jansom, J., Booner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R. A., Butler, P. C. (2003). β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 52(1), ss. 102-110. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.102>
- Cayci, T., Kurt, Y. G., Aydin, I., Yaman, H., Cakir, E. (2011). Interference of HbF in HbA1c measurement by high performance liquid chromatography method: a case report. *Gulhane Med J*, 53(3), ss. 211–213. DOI:10.5455/aim.2013.21.216-218
- Berne, C., Fritz, T. (2015). *Diabetes mellitus*. https://lakemedelsboken.se/kapitel/endokrinologi/diabetes_mellitus.html [2017-12-10]
- Diabetesförbundet (2016) *Diabetes i media*. https://www.diabetes.se/globalassets/forbundet/diabetes/journalistguide-visuell-identitet/journalistguide_20160215.pdf [2017-12-10]
- Florkowski, C. (2013). HbA1c as a Diagnostic Test for Diabetes Mellitus - Reviewing the Evidence. *Clin Biochem Rev*, 34(2), ss. 75–83. PMID: PMC3799221
- Hu, F. B. (2011). Globalization of Diabetes The role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*, 34(6), ss. 1249-1257. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc11-0442>
- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., Peters, A. L., Tsapas, A., Wender, R., Matthews, D. R. (2012). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach. Position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD) *Diabetologia*, 55(6), ss. 1577-1596. DOI: 10.1007/s00125-012-2534-0
- Jeppsson, J.-O., Kobold, U., Barr, J., Finke, A., Hoelzel, W., Hoshino T., Midema, K., Mosca, A., Mauri, P., Paroni, R., Thienpont, L., Umemoto, M., Weykamp, C. (2002). Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood *Clin Chem Lab Med*, 40(1), ss. 78-89. DOI: 10.1515/CCLM.2002.016
- Jönsson, B. (2002). Revealing the cost of Type II diabetes in Europe. *Diabetologia*, 45, ss. 5-12. DOI 10.1007/s00125-002-0858-x
- Khan, A., Pessin, J. (2002). Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia*, 45(11), ss. 1475-1483. DOI: 10.1007/s00125-002-0974-7
- King, H., Aubert, R. E., Herman, W. H. (1998). Global Burden of Diabetes, 1995–2025: Prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care*, 21(9), ss. 1414-1431. DOI: <https://doi.org/10.2337/diacare.21.9.1414>
- Ko, G. T., Chan, J. C., Woo, J., Lau, E., Yeung, V. T., Chow, C. C., Cockram, C. S. (1998). The reproducibility and usefulness of the oral glucose tolerance test in screening for diabetes

and other cardiovascular risk factors. *Ann Clin Biochem*, 35(1), ss. 62-7. DOI: 10.1177/000456329803500107

Lindley, S., Dayan, C. M., Bishop, A., Roep, B. O., Peakman, M., Tree, T. I. M. (2005). Defective Suppressor Function in CD4+CD25+ T-Cells From Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 54(1), ss. 92-99. DOI: <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.1.92>

Little, R. R., Rohlfing, C. L., Hanson, S., Connolly, S., Higgins, T., Weykam, C. W., D'Costa, M., Luzzi V., Owen, W. E., Roberts, W. L. (2008). Effects of Hemoglobin (Hb) E and HbD Traits on Measurements of Glycated Hb (HbA1c) by 23 Methods. *Clinical Chemistry*, 54(8), ss. 1277–1282. DOI: 10.1373/clinchem.2008.103580

Liu, L., Hood, S., Wang, Y., Bezverkov, R., Dou, C., Datta, A., Yuan, C. (2008). Direct enzymatic assay for %HbA1c in human whole blood samples. *Clinical Biochemistry*, 41(8), ss. 576–583. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.01.013>

Landin-Olsson, M., Jeppsson, J-O., Nordin, G. (2010). HbA1c – ny standardisering införs i Sverige. *Läkartidningen*, 107, ss. 3282-3285. <http://www.lakartidningen.se/Functions/OldArticleView.aspx?articleId=15737> [2017-12-12]

Nasir, N. M., Thevarajah, M., Yean, C. Y. (2010). Hemoglobin variants detected by hemoglobin A1c (HbA1c) analysis and the effects on HbA1c measurements. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 30(2), ss. 86-90. DOI:10.4103/0973-3930.62598

Nationella Diabetesregistret (NDR) (2016) Årsrapport. https://www.ndr.nu/pdfs/Arsrapport_NDR_2016.pdf [2017-12-10]

Nitta, T., Yamashiro, Y., Hattori, Y., Ezumi, T., Nishioka, M., Nakamura, J. (2015). The interference by HbF on HbA1c (BM Test HbA1c) measurement in enzymatic method. *Annals of Clinical Biochemistry*, 52(5), ss. 569-575. DOI: 10.1177/0004563214568872

Nogami, K., Muraki, I., Imano, H., Iso, H. (2017). Risk of disseminated intravascular coagulation in patients with type 2 diabetes mellitus: retrospective cohort study. *BMJ Open*, 7(1), ss. DOI:10.1136/bmjopen-2016-013894

Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Massod, A., Sakharkar, M. K. (2016). Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomark Insights*, 11, ss. 95–104. DOI: 10.4137/BMI.S38440

Taira, J. D., Demaris, K., Goo, R., Mnatzaganian, C., Wong, S. H. (2014). Significance of HbA1c and its measurement in the diagnosis of diabetes mellitus: US experience. *Dovepress*, 7, ss. 487-494. DOI: <https://doi.org/10.2147/DMSO.S39092>

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1993). The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*, 329, ss. 977-986. DOI: 10.1056/NEJM199309303291401

Wen L., Ley, R. E., Volchkov, P. Y., Stranges, P. B., Avanesyan, L., Stonebraker, A. C., Hu, C., Wong, F. S., Szot, G. L., Bluestone, J. A., Gordon, J. I., Chervonsky, A. V. (2008). Innate

immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 455, ss. 1109-1113. DOI: doi:10.1038/nature07336

Bilaga 1

Tosoh mmol	Direct enzymatic HbA1c	Hemoglobin A1c
23	24	21
24	30	24
25	24	24
25	25	24
26	27	27
27	33	27
30	25	29
31	29	30
32	30	30
34	41	34
34	13	31
34	35	34
34	34	32
34	32	35
34	28	35
35	37	35
35	31	33
35	35	34
35	34	35
36	31	35
36	34	35
36	32	36
37	35	37
38	38	37
38	33	38
39	40	38
40	36	38
40	30	37
40	38	38
40	42	39
40	21	37
40	42	38
41	40	40
41	38	40
42	43	43
42	42	38
42	24	41
42	40	41

44	51	42
44	36	43
44	38	41
44	38	41
45	38	43
45	38	43
45	38	43
45	39	45
46	41	46
46	48	42
47	34	46
47	43	45
48	29	48
48	40	48
48	13	49
49	52	50
49	47	46
50	54	48
50	36	48
51	51	51
51	51	51
52	33	50
52	49	49
52	50	50
53	49	51
54	58	52
55	42	55
55	48	55
55	50	55
55	50	55
56	37	53
56	52	56
57	37	55
58	60	55
58	58	57
59	41	61
60	58	59
61	43	66
62	60	61
62	59	61
62	58	60
63	60	57
64	50	63
64	55	61

64	67	62
64	61	64
65	61	63
65	58	61
65	62	64
65	60	65
65	61	65
67	64	66
67	56	65
67	62	67
68	67	68
68	60	66
68	66	65
69	51	64
69	65	68
69	65	68
70	61	68
70	65	68
70	63	71
71	71	65
72	70	70
73	51	72
73	67	71
75	68	76
75	72	74
76	68	74
76	66	45
76	78	77
77	70	78
78	76	76
79	77	78
79	72	77
85	89	84
87	73	87
87	90	85
87	85	86
87	79	84
88	78	85
90	87	91
92	92	92
98	103	99
99	89	95
100	114	100
103	112	103

104	111	106
105	113	107
111	74	111
113	132	111
119	123	120
121	147	119
143	120	142

Bilaga 2

Tosoh mmol	Direct enzymatic HbA1c
44	43
52	50
65	66
27	27

Bilaga 3

	Direct enzymatic HbA1c			
	Låga värden	Medel värden	Höga värden	
	5,5		8,4	11,5
	5,2		8,7	11,4
	5,4		8,8	11,4
	5,5		8,7	11,3
	5,5		8,8	11,3
Medelvärde	5,4		8,7	11,4
total prover	5		5	5
SD	0,1		0,2	0,1
CV %	2,4		1,9	0,7

	Hemoglobin A1c			
	Låga värden	Medel Värden	Höga värden	
	36,6		68,3	102,2
	33,3		71,6	101,1
	35,5		72,7	101,1
	36,6		71,6	100,0
	36,6		72,7	100,0
Medelvärde	35,7		71,4	100,9
total prover	5		5	5
SD	1,4		1,8	0,9
CV %	4,0		2,5	0,9