Skraćena validacija HPLC metode za određivanje HbA1c

Lučin, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:963607

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Dora Lučin

SKRAĆENA VALIDACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE HbA1c

Završni rad

Split, 2017.godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Dora Lučin

SKRAĆENA VALIDACIJA HPLC METODE ZA ODREĐIVANJE HbA1c

SHORT VALIDATION OF HPLC METHOD FOR DETERMINATION HbA1c

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

dr.sc. Leida Tandara, spec. med. biokemije

Split, 2017.godine

Sadržaj:

1.UVOD 1
1.1. Šećerna bolest 1
1.2. Hemoglobin A1c 3
1.3. Metode za određivanje HbA1c 6
1.4. Skraćena validacija metoda 11
2.CILJEVI 12
3.1.Ispitanici i metode 13
3.1.1. Imunokemijska metoda za određivanje HbA1c (Roche Cobas Integra, Roche) 14
3.1.2. HPLC metoda za određivanje HbA1c (Humanex) 16
3.2. Instrumenti 17
3.2.1. Cobas Integra (Roche) 17
4. REZULTATI 19
4.1. Usporedba metoda 19
4.2. Preciznost 25
5. RASPRAVA 26
6. ZAKLJUČCI 27
7.LITERATURA 28
8. SAŽETAK 30
9. ABSTRACT 31
10.ŽIVOTOPIS 32

1.UVOD

1.1. Šećerna bolest

Šećerna bolest je kronična progresivna bolest koju čini skup metaboličkih poremećaja s predominantnom hiperglikemijom, uzrokovanih poremećajem lučenja i/ili učinaka inzulina. Kronična hiperglikemija šećerne bolesti povezana je s dugoročnim oštećenjem, disfunkcijom različitih organa, posebice očiju, bubrega, živaca, srca i krvnih žila. Šećerna bolest je jedan od 10 vodećih uzroka smrti i važan rizični čimbenik u razvoju bolesti srca i krvnih žila.. Posljedica komplikacija šećerne bolesti je jedan od vodećih uzroka onesposobljenja i invaliditeta. Dijagnoza šećerne bolesti prema kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) postavlja se mjerenjem glukoze u venskoj plazmi u akreditiranom laboratoriju (1).

Kada se količina glukoze u krvi povećava, npr. nakon obroka, dolazi do otpuštanja hormona inzulina iz gušterače. Inzulin stimulira mišićne i masne stanice da uklone glukozu iz krvi i stimulira jetru da metabolizira glukozu, uzrokujući snižavanje koncentracije glukoze u krvi na normalnu razinu (2).

Šećernu bolest dijelimo u četiri osnovna tipa koji se razlikuju prema etiologiji, kliničkoj slici, terapijskom pristupu i prognozi. Manjak inzulina i rezistencija na inzulin su dva temeljna patofiziološka čimbenika. Razaranje beta-stanica koje vodi apsolutnom pomanjkanju inzulina karakterizira šećernu bolest tipa 1, dok šećernu bolest tipa 2 karakterizira progresivno smanjenje lučenja inzulina u čijoj podlozi leži inzulinska rezistencija. Šećerna bolest tipa 2 obično se pojavljuje kod odraslih osoba koje su pretile. Postoje mnogi temeljni čimbenici koji doprinose visokoj razini glukoze u krvi kod ovih osoba. Važan čimbenik je rezistencija na inzulin. Drugi čimbenik je smanjena sinteza inzulina u beta stanicama gušterače. Stoga, pojedinac sa šećernom bolesti tipa 2 može imati kombinaciju smanjene sinteze i manjkavog djelovanja inzulina. Oko 90% osoba sa šećernom bolešću ima šećernu bolest tipa 2. Za razliku od tipa 2, šećerna bolest tipa 1 najčešće se javlja kod djece i rezultat je autoimunog procesa čija je posljedica uništavanje beta stanica. Pokretač ovog autoimunog procesa nije jasan, ali rezultat je nemogućnost sinteze inzulina (2). Brzina oštećenja beta stanica se razlikuje između pojedinaca i manifestacija šećerne bolesti tipa 1 može se pojaviti u neonatalnom razdoblju, razdoblju djetinjstva odnosno adolescencije. Isto tako se može javiti i kasnije, tada govorimo o tzv. LADA (eng. Latent autoimmune diabetes in adults). Skupina drugih specifičnih tipova šećerne bolesti uključuje genetičke poremećaje funkcije beta-stanica te lučenja i učinaka inzulina, bolesti egzokrine gušterače te lijekovima uzrokovanu šećernu

bolest. Metaboličke promjene tijekom kasne trudnoće uzrokuju inzulinsku rezistenciju koja se očituje poremećajem podnošenja glukoze odnosno gestacijskim dijabetesom (1).

Nekoliko patogenih procesa uključeno je u razvoj šećerne bolesti. Oni se kreću od autoimune destrukcije β-stanica gušterače s posljedičnim nedostatkom inzulina do abnormalnosti koje rezultiraju otpornošću na djelovanje inzulina. Temelj abnormalnosti u metabolizmu ugljikohidrata, masnoća i bjelančevina u šećernoj bolesti je manjak djelovanja inzulina na ciljnim tkivima. Nedostatak inzulinskog djelovanja proizlazi iz neodgovarajućeg izlučivanja inzulina i/ili smanjenog odaziva tkiva na inzulin na jednoj ili više točaka u složenim putevima hormonskog djelovanja. Kod istog bolesnika često istovremeno postoji poremećaj izlučivanja inzulina i djelovanja inzulina, a često je nejasno koja je abnormalnost glavni uzrok hiperglikemije (3).

Simptomi hiperglikemije uključuju poliuriju, polidipsiju, gubitak težine, ponekad polifagiju i zamagljen vid. Kroničnu hiperglikemiju također može pratiti poremećaj rasta i osjetljivost na određene infekcije. Akutne, po život opasne posljedice nekontrolirane šećerne bolesti su hiperglikemija s ketoacidozom ili neketonskim hiperosmolarnim sindromom (3).

Dugoročne komplikacije šećerne bolesti uključuju retinopatiju s mogućim gubitkom vida, nefropatiju koja dovodi do zatajenja bubrega, perifernu neuropatiju i autonomnu neuropatiju koja uzrokuje gastrointestinalne, genitourinarne, kardiovaskularne simptome i spolnu disfunkciju. Bolesnici sa šećernom bolesti imaju povećanu učestalost aterosklerotičnih kardiovaskularnih promjena i cerebrovaskularnih bolesti. Kod osoba sa šećernom bolesti često se javljaju hipertenzija i abnormalnosti metabolizma lipoproteina (3).

Temelj za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti desetljećima su bili određivanje razine glukoze u plazmi natašte i test oralnog opterećenja glukozom (OGTT). Uz navedene testove, s ciljem unaprjeđenja i proširenja dijagnostičkih mogućnosti uvedeno je određivanje hemoglobina A1c (HbA1c) kao novog testa u dijagnostici šećerne bolesti (4). Glukoza u plazmi natašte ≥7,0 mmol ili glukoza u plazmi nakon 2 h OGTT ≥11,1 mmol/L ili HbA1c ≥ 6,5% (48 mmol/mol) ili uz simptome hiperglikemije kriteriji su za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti (3).

1.2. Hemoglobin A1c

Hemoglobin A1c je danas "zlatni standard" u kliničkom praćenju pacijenata sa šećernom bolesti. Današnji klinički normativ za procjenu djelotvornosti terapije i rizika pojave komplikacija šećerne bolesti čini dobra kontrola glikemije, izražena kroz koncentraciju HbA1c ≤ 7.0 %. Bunn i suradnici još 1975. Godine otkrili su mehanizam kemijske reakcije kojom se sintetizira molekula HbA1c. Primjenu kao biomarkera za praćenje koncentracije glukoze kod bolesnika s dijagnosticiranom šećernom bolešću prvi je predložio Koenig 1976. godine (5).

Eritrociti sadrže oko 95% do 98% adultnog hemoglobina HbA ($2\alpha2\beta$), a ostalo su produkti alternativne sinteze globina i post-translacijskih modifikacija HbA. Ostali normalni hemoglobini prisutni u odraslih uključuju HbF ($2\alpha2\gamma$) i HbA2 ($2\alpha2\delta$), pri čemu svaki od njih čini približno 2% ukupnog Hb (6).

Proteini se često glikiraju tijekom različitih enzimatskih reakcija kada su uvjeti fiziološki povoljni. Međutim, u slučaju hemoglobina, glikacija se odvija neenzimskom reakcijom između glukoze i N-terminalnog kraja β-lanca, koji tvori Schiffovu bazu. Tijekom pregradnje Schiffova baza se pretvara u Amadorijeve proizvode od kojih je najpoznatiji HbA1c. U primarnom stupnju stvaranja glikiranog hemoglobina, hemoglobin i glukoza u krvi formiraju aldimin u reverzibilnoj reakciji. U drugom koraku, koji je nepovratan, aldimin se postupno pretvara u stabilni ketoaminski oblik. Oko 6% ukupnog HbA naziva se HbA1, koja se pak sastoji od frakcija HbA1a1, HbA1a2, HbA1b i HbA1c, definiranih njihovim elektroforetskim i kromatografskim svojstvima. HbA1c je najbrojnija od tih frakcija i kod zdravih ljudi čini približno 5% ukupne frakcije HbA. Glikacija je neenzimatski proces koji se neprekidno odvija u organizmu i normalan je dio fizioloških procesa. Međutim, kako se povećava prosječna glukoza u plazmi, tako i količina glikiranog hemoglobina u plazmi raste (7).

HbA1c se danas koristi kao standardna mjera prosječne glikemije za rutinsko praćenje i prevenciju dugoročnih komplikacija šećerne bolesti jer odražava prosječnu koncentraciju glukoze u krvi tijekom prethodna 2 do 3 mjeseca (normalni životni vijek eritrocita). Pojava i progresija dijabetičkih komplikacija mogu održavanjem približno normalnih razina HbA1c biti odgođene (8).

Oralni testovi tolerancije glukoze rjeđe se provode u kliničkoj praksi, a koncentracija glukoze u slučajnom uzorku (bez posta) u plazmi iznad 11,0 mmol/l s klasičnim simptomima, izuzetno je neosjetljiva. Za OGTT test potrebno je provesti opsežniju pripremu prije testiranja, uključujući odgovarajuću prehranu 3 dana prije testa (9).

U usporedbi s mjerenjima glukoze, upotreba HbA1c kao dijagnostičkog testa ima prednosti, uključujući praktičnost, manje dnevne varijabilnosti, veću predanalitičku stabilnost i međunarodnu standardizaciju.

Uzorak za određivanje HbA1c je venska ili kapilarna krv, uzorkovana u standardizirane epruvete s antikoagulansom (ovisno o metodi: litij heparin, kalij-EDTA, oksalat). Za određivanje HbA1c nema potrebe da bolesnik bude natašte. Analit je u uzorcima pune krvi stabilan do 7 dana na 4-8 °C, a najmanje jednu godinu na -70°C. Važna činjenica je da na razinu HbA1c ne utječe nekoliko dana niske kalorijske prehrane ili rigorozno vježbanje, kao što utječe na razinu glukoze u plazmi natašte.

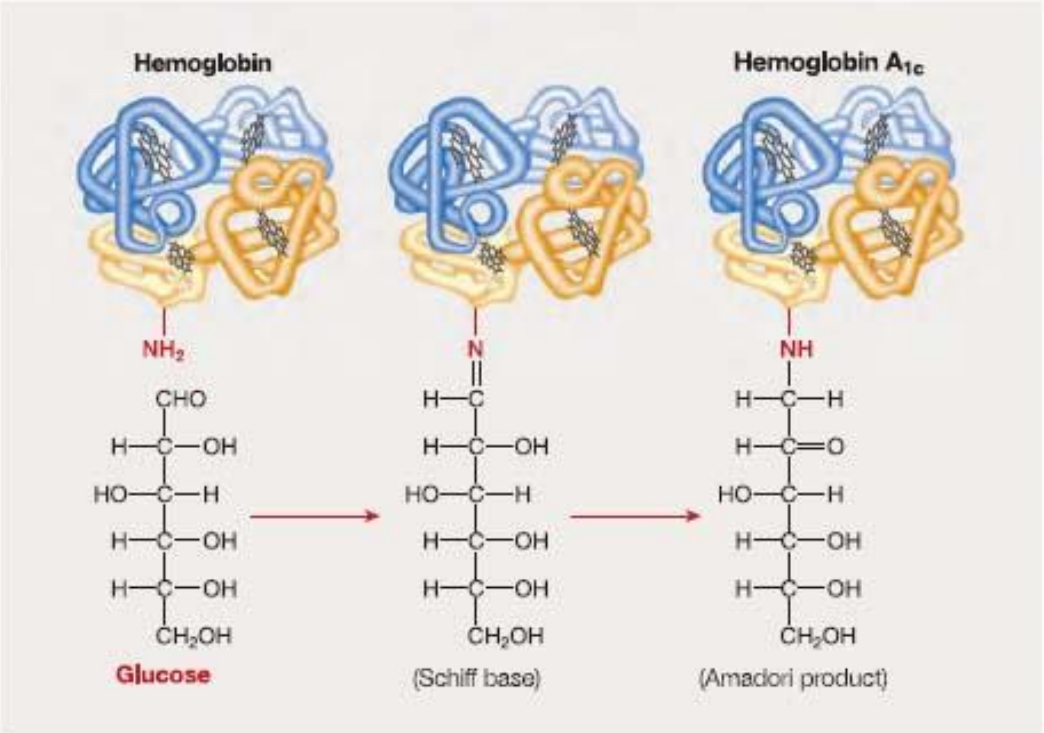
Najpouzdanije metode za određivanje HbA1c su one koji se izvode u akreditiranim kliničkim laboratorijima. Postoji niz metoda za point of care testiranja (POCT), odnosno testiranja na mjestu gdje se bolesniku pruža skrb. Glavne prednosti POCT uključuju brzu dostupnost rezultata te činjenica da su rezultati POCT testova široko dostupni. Ograničenja ovih testiranja uključuju smanjenu razinu svjesnosti kliničkog osoblja o važnosti provođenja kontrole kvalitete i posljedično veću mogućnost pogreške budući da ne-laboratorijsko osoblje vodi analize (9).

S obzirom na poboljšanu standardizaciju testa i podatke koji pokazuju povezanost s retinopatijom, Međunarodni stručni odbor preporučuje uporabu HbA1c za dijagnosticiranje šećerne bolesti. SZO preporučuje da se HbA1c može koristiti kao dijagnostički test za šećernu bolest, pod uvjetom da se poštuju stroga pravila analitičke kvalitete rada i da su testovi standardizirani prema kriterijima usklađenim s međunarodnim referentnim standardima i da ne postoje stanja koja ometaju točno mjerenje HbA1c. Ova stanja uključuju trudnoću, kratko trajanje simptoma šećerne bolesti, akutne bolesti, primanje lijekova koji mogu uzrokovati brzo povećanje razine glukoze, oštećenja gušterače, hemoglobinopatije, anemije, zatajenja bubrega i infekcije HIV-om (10).

Posebna primjena je korištenje mjerenja HbA1c tijekom trudnoće u bolesnika sa šećernom bolešću kako bi se utvrdio minimalni perinatalni rizik za majku i maksimalno zdravlje fetusa. Stroga kontrola prije i tijekom trudnoće smanjuje rizik od kongenitalnih malformacija dojenčadi, kao i komplikacija trudnoće povezanih sa slabo kontroliranim glikemijom.

Rutinska uporaba testa zahtijeva strogu kontrolu kvalitete, uključujući akreditaciju laboratorija, ispravno provođenje unutarnje kontrole, sudjelovanje u programu vanjske procjene kvalitete (ispitivanje sposobnosti) i pažljivo razmatranje pred- i post-analitičkih aspekata testa (10).

Prognostički potencijal HbA1c leži u njegovoj mogućnosti procjene retrospektivne kontrole glikemije, kao i predviđanja lipidnog profila u bolesnika sa šećernom bolešću. Mjerenje HbA1c može se koristiti za postizanje bolje skrbi za bolesnika. Kako epidemija šećerne bolesti raste diljem svijeta, HbA1c može se primjenjivati kao dijagnostički i prognostički alat, što omogućuje bolju skrb za bolesnika i unaprjeđuje klinički ishod (10).



Slika 1. Glikacija hemoglobina (11).

1.3. Metode za određivanje HbA1c

Mjerenje HbA1c je zlatni standard za provjeru dugotrajne glikemije kod bolesnika sa šećernom bolešću. Postoje različite metode za mjerenje HbA1c, a razlika u vrijednostima dobivenim ovim metodama je visoka, zbog čega je vrlo teško usporediti ove vrijednosti. Osim toga, različiti čimbenici kao što su anemije sa skraćenim životnim vijekom eritrocita, trudnoća, splenektomija, transfuzija i unos lijekova (salicilati) različito utječu na rezultate dobivene različitim metodama (12).

Suvremene analitičke metode temelje se na razlikama fizikalno-kemijskih svojstava među molekulama HbA1c i glikohemoglobina (GHb) i nemodificiranog hemoglobina. Metode koje se danas koriste u rutinskom radu prema načelu određivanja mogu se podijeliti u dvije skupine. Prva skupina metoda se temelji na razlikama u naboju glikiranih i neglikiranih molekula, a obuhvaća kromatografiju s ionskom izmjenom, elektroforezu i afinitetnu kromatografiju. Drugoj skupini pripadaju strukturno-specifične metode kao što su boronatna afinitetna kromatografija i imunokemija. Afinitetnim metodama se određuje ukupni GHb(5).

Činjenica da HbA1c i ne-glikirani Hb imaju različita kemijska svojstva omogućuju odvajanje frakcija i kvantitativno određivanje HbA1c. Ovo se načelo primjenjuje u kromatografiji ionske izmjene (IEC), kapilarnoj elektroforezi (CE) i afinitetnoj kromatografiji (AC). Kod IEC-a ta razlika je dovoljna da se omogući odvajanje HbA1c od ne-glikiranog Hb. S IEC-om se također mogu vizualizirati fetalni Hb (HbF), manji brzi Hb (HbA1a / b) i karbamilirani Hb (HbCarb) kao i neke genetske varijante (npr. srpastih stanica Hb). CE koristi razliku naboja između HbA1c i drugih frakcija Hb. Razdvajanje se postiže visokonaponskim električnim poljem i elektroosmotskim protjecanjem. Premda kod metode AC ne-glikirani Hb prolazi slobodno kroz kolonu koja sadrži čestice obložene boronatnom kiselinom, molekule glikiranog Hb-a imaju afinitet prema boronatnoj kiselini pa se HbA1c duže zadržava na koloni. Uz N-terminalni valin β-lanca HbA1c, glukoza se veže za oko 15 drugih lizinskih ostataka u Hb. Sveukupno, ostali glikirani Hb predstavljaju približno polovicu svih otkrivenih molekula HbA1c. Budući da se formiraju proporcionalno HbA1c, kalibracija omogućuje da se rezultati AC testa izražavaju kao HbA1c (5).

U kemijskim testovima, koncentracija HbA1c mjeri se na temelju specifične kemijske reakcije na glikirani N-terminalni valin β-lanca. Paralelno se fotometrijski mjeri ukupna koncentracija Hb. Zbog toga ove metode zahtijevaju dva neovisna testa, HbA1c i ukupni Hb za izračunavanje koncentracije HbA1c. Ovaj koncept se primjenjuje u imunokemijskim i enzimskim metodama. U imunokemijskim metodama (engl. *immuno assay*, IA),

hemoliziranom uzorku dodaje se višak anti-HbA1c antitijela. Nakon vezanja na HbA1c, višak antitijela aglutinira. Zamućenje koje nastaje zbog formiranja imunokompleksa mjeri se fotometrijski, turbidimetrijski ili nefelometrijski. Kod enzimatskih analiza proteaza cijepa β-lanac kako bi se oslobodili peptidi. Peptidi, obično dipeptidi, reagiraju s fruktozil peptid oksidazom, a dobiveni vodikov peroksid se koristi za kvantificiranje HbA1c. (12).

Stabilnost HbA1c u uzorcima pune krvi, neovisnost koncentracije o dobu dana i prandijalnom statusu bolesnika, uz visoku prediktivnu vrijednost u procjeni rizika komplikacija šećerne bolesti i procjeni regulacije glikemije, čini ga markerom izbora za praćenju šećerne bolesti. Na razinu HbA1c osim koncentracije glukoze utječe značajno utječe svako patofiziološko stanje koje skraćuje životni vijek eritrocita. Na primjer akutno krvarenje ili hemolitička anemija, splenomegalija, reumatoidni artritis, neke hemoglobinopatije, snižavaju udio HbA1c, neovisno o metodi. Usporena eritropoeza, anemija zbog nedostatka željeza ili vitamina B12 uzrokovat će povišeni udio HbA1c dok će terapija eritropoetinom, terapija sideropenične anemije željezom, kronična bolest jetre biti uzrok sniženog udjela HbA1c. Promjene u brzini glikacije također utječu na udio HbA1c. Tako će u alkoholizmu i kroničnoj bolesti bubrega udio HbA1c biti povišen, dok će unos aspirina, vitamina C i E sniziti udio HbA1c ometajući glikiranje. Prisustvo hemoglobinskih varijanti (HbS, HbC, HbD, HbE) i kemijske modifikacije molekule (prisustvo karbamiliranog hemoglobina u kroničnoj bubrežnoj bolesti i uremiji) mogu interferirati analitički u nekim metodama određivanja, uzrokujući lažno snižene ili povišene rezultate. Pri izboru metode laboratoriji moraju razmotriti podložnost metode interferencijama ovisno o prisustvu hemoglobinopatija u populaciji za koju se skrbe (13).

Tablica 1. Prednosti i nedostatci različitih metoda ispitivanja za HbA1c (14).

Metoda	Princip	Prednosti	Nedostatci
Kromatografija ionske izmjene	Zbog niže izoelektrične točke HbA1c putuje brže nego druge Hb komponente.	Mogućnost pregledavanja kromograma za Hb varijante. Mjerenje s visokom preciznošću.	Razne interferencije hemoglobinopatija, HbF-a i karbamiliranog Hb-a, no današnje kromatografije ionske izmjene ne interferiraju.
Boronatna afinitetna kromatografija	Glukoza se veže na aminofenilboronsku kiselinu.	Minimalne interferencije hemoglobinopatija, HbF-a i karbamiliranog Hb-a.	Ne mjeri samo glikaciju N terminalnog valina na beta lancu, već i beta lance glikirane na drugim mjestima te glikirane alfa lance.
Imunoanalize	Antitijelo se veže na glukozu te između 4-10 N terminalnog kraja amino kiselina na beta lancu.	Ne utječu HbE, HbD i karbamilirani Hb. Relativno se lako implementira u različitim formatima.	Može biti pod utjecajem hemoglobinopatija s izmijenjenim amino kiselinama na veznim mjestima. Neke interferiraju s HbF-om.

Sve rezultate određivanja HbA1c ispod donje granice mjernog raspona metode treba potvrditi ponovljenim određivanjem, ako je moguće alternativnom metodom s različitim principom. Ukoliko nalaz HbA1c nije u skladu s kliničkom slikom bolesnika, potrebno je dodatno istražiti, odnosno pratiti bolesnika određivanjem alternativnih biljega, na primjer fruktozamina (13).

Određivanje koncentracije HbA1c zahtijeva učinkovitost, visoku propusnost, robusnost i isplativost. Svaka od navedenih metoda ima svoje prednosti i nedostatke te njen odabir ovisi o individualnim potrebama i mogućnostima laboratorija. Važno je da odabrana metoda ispunjava kliničke i analitičke kriterije kvalitete. U kriterije kliničke kvalitete spadaju: mala individualna varijabilnost, preciznost na razini apsolutne razlike u HbA1c od 0,35% do 0,5%. Kriteriji analitičke kvalitete su unutarlaboratorijska preciznost (ukupni koeficijent varijacije <3,0%) i međulaboratorijska preciznost, odnosno stabilne referentne/preporučene vrijednosti koje se mogu ujednačeno interpretirati neovisno o odabranoj metodologiji, vremenu i mjestu određivanja (5).

Većina suvremenih metoda zadovoljava navedene kriterije, međutim postoje značajne razlike među rezultatima iz istog uzorka dobivenim različitim metodama. Razlike nastaju zbog interferencija različitog analita koji se određuje različitim metodama te zbog nedovoljne analitičke specifičnosti metoda temeljenih na razlikama u naboju. Analitičke i biološke interferencije predstavljaju dodatni problem te također mogu značajno utjecati na rezultat.

Slaba usporedivost rezultata nametnula je potrebu za standardizacijom. Prema rezultatima dobivenim studijom Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) gdje je korištena metoda HPLC na kationskom izmjenjivaču, u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD-u) proveden je Nacionalni program za standardizaciju glikohemoglobina (NGSP). Rezultat tog programa je poboljšana međulaboratorijska usporedivost rezultata. Međunarodna federacija za kliničku kemiju (IFCC) utemeljila je radnu grupu za standardizaciju određivanja HbA1c. Definiran je analit i načinjen primarni referentni materijal kao smjesa kromatografski pročišćenog HbA1c i HbA u liofiliziranom obliku. Razvijene su dvije prihvaćene referentne metode, masena spektrometrija i kapilarna elektroforeza. Metode su jednako vrijedne, podjednako specifične za HbA1c i neosjetljive na interferencije abnormalnih hemoglobina (HbS, HbC) i post-translacijski promijenjenih molekula (acetilirani i karbamilirani hemoglobini) (5).

Laboratoriji moraju određivati HbA1c metodama kalibriranim prema IFCC-referentnom materijalu, NGSP- certificiranim, a rezultate izražavati u IFCC i DCCT-jedinicama (13).

Mrežne jednadžbe za pretvaranje IFCC jedinica u NGSP jedinice (NGSP% = 0,0915 × IFCC mmol / mol + 2,15) i obratno (IFCC mmol / mol = 10,93 NGSP% -23,5) uspostavljaju i prate IFCC i NGSP mreže.

Uvođenje referentnih metoda važno je zbog usporedivosti dobivenih rezultata što omogućuje lakše praćenje i rješavanje problema uključenih u dijabetološku skrb (9).

1.4. Skraćena validacija metoda

Validacija metoda i instrumenata važna je u kliničkom laboratorijskom radu. Svaka nova metoda treba biti validirana prilikom uvođenja u rutinski laboratorijski rad. Među različitim analizama koje bi trebale biti izvedene je ispitivanje preciznosti u seriji, preciznosti iz dana u dan i usporedba metoda. Ta analiza uspoređuje rezultate dobivene novom metodom s onima dobivenim drugim analitičkim metodama. Idealno stanje se postiže ako je analitička metoda korištena za usporedbu referentna ili definitivna metoda. Ispravnost referentnih metoda nije upitna, stoga bi se novi referentni rezultati trebali prilagoditi. Međutim, u uobičajenim okolnostima u rutinskom laboratoriju rezultati se mogu usporediti s "komparativnom metodom" - onom koja je dostupna i koristi se u svakodnevnom rutinskom radu.

Cilj usporedbe eksperimentalnih metoda je procijeniti sustavnu (konstantnu i proporcionalnu) razliku između dvije metode, npr. kako bi se utvrdilo postoji li značajna razlika u rezultatima dobivenim dvjema metodama, koristeći prave uzorke bolesnika. Rezultati se trebaju tumačiti vrlo pažljivo. Ako je razlika između dvije metode mala i klinički prihvatljiva, tada se te dvije metode mogu koristiti istodobno. Eksperimentalna strana usporedbe metode je jednostavna. Preporuča se da se barem 40 uzoraka širokog raspona koncentracije ispita s dvije metode. Međutim, analiza i tumačenje podataka složeno je pitanje te još uvijek ne postoji statistički postupak koji se smatra zlatnim standardom za analizu dobivenih podataka.

Passing Bablokova regresijska analiza je statistički postupak koji omogućuje procjenu analitičkih metoda i moguća sustavna odstupanja između njih. Robusna je, neparametrijska, nije osjetljiva na distribuciju pogrešaka i ekstremne vrijednosti. Pretpostavke za pravilnu primjenu Passing Bablokove regresije su kontinuirano distribuirani podaci i linearan odnos između podataka izmjerenih dvjema analitičkim metodama. Rezultati su prikazani dijagramom raspršivanja i regresijskom linijom te regresijskom jednadžbom ($y = a+bx$) gdje odsječak na osi y predstavlja konstantnu, a nagib pravca proporcionalnu pogrešku mjerenja. Primjena Passing Bablokove regresijske analize je osobito preporučena u slučajevima kada postoji proporcionalno odstupanje jedne metode od druge te u slučajevima miješanog odstupanja, za razliku od Demingove regresijske analize koja se preporučuje kod metoda za koje se prilikom vizualnog pregleda ustanovi postojanje konstantne pogreške. Demingova regresijska analiza uzima u obzir nepreciznost obje metode te je zbog toga više prilagođena za analizu podataka dobivenih laboratorijskim mjerenjima. Kao i Passing Bablokova, Demingova regresijska analiza pretpostavlja nezavisan odnos između dviju metoda te da među njima postoji odnos $y= a+ bx$ (15).

2.CILJEVI

- Utvrditi analitičku preciznost u seriji i iz dana u dan za novu metodu koja se uvodi u rutinski rad.
- Procijeniti sustavnu i proporcionalnu razliku između dvije metode kako bi se utvrdilo postoji li značajna razlika u rezultatima dobivenim dvjema metodama.

3.MATERIJALI I METODE

3.1.Ispitanici i metode

U ovom istraživanju provedena je usporedba metoda korištenjem rutinskih uzoraka pacijenata koji su analizirani radi standardne dijagnostičke obrade u bolnici. Ispitano je 40 uzoraka pune krvi pacijenata na Roche Cobas Integra 400 plus aparatu te 40 uzoraka na Humanex A1c aparatu u Zavodu za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split.. Uzorci su potjecali od bolničkih pacijenata s kliničkom sumnjom ili potvrđenom dijagnozom šećerne bolesti.

Za dobivene uzorke izračunata je srednja vrijednost, medijan, minimalna i maksimalna vrijednost, interval pouzdanosti i raspon. Izračunat je Spearmanov koeficijent korelacije. Za usporedbu metoda korištena je Passing Bablok i Demingova regresija, uključujući i Cusumov test linearnosti.

Preciznost u seriji i preciznost iz dana u dan je provedena pomoću dva kontrolna uzorka u kojima je određivana koncentracija HbA1c. Iz dobivenih rezultata je izračunata standardna devijacija, koeficijent varijacije, medijan, srednja vrijednost i raspon.

Statistička analiza provedena je pomoću programske podrške MedCalc 10.1.2.0. (MedCalc, Mariakerke, Belgium).

3.1.1. Imunokemijska metoda za određivanje HbA1c (Roche Cobas Integra, Roche)

U Roche Cobas Integra 400 plus analizatoru postoje dva fotometra: jedan za mjerenje apsorbancije (apsorbancijski fotometar) i jedan za mjerenja polarizacije fluorescencije (FP fotometar).

FP fotometar vrši mjerenja na uzorcima na temelju načela polarizacija fluorescencije. Koristi se za mjerenje TDM-a (eng. Therapeutic Drug Monitoring), odnosno za terapijsko praćenje koncentracije lijekova.

Za svaki utor za kivete, apsorpcijski fotometar mjeri intenzitet svjetla pri 12 različitih valnih duljina. Svjetlosna zraka iz apsorbancijske halogene svjetiljke prolazi kroz kivetu, a zatim u polje fotodioda gdje se vrše mjerenja. Apsorpcijski fotometar radi i apsorpcijska i turbidimetrijska mjerenja (tipično za kliničku kemiju, specifične proteine i direktne antiglobulinske testove (DAT)).

Za mjerenje apsorbancije očitanja apsorpcija su linearna u rasponu od 0,0 do 2,0 apsorbancije s manje od 1% odstupanja na duljini putanje od 0,5 cm. Sustav mjerenja koristi prazne položaje na rotoru za praćenje pozadinskog signala za elektroničko podešavanje strujanja. Mjerenja se poduzimaju bez uklanjanja kivete iz analizatorskog rotora.

Sve valne duljine se mjere u isto vrijeme, ali samo jedna valna duljina (za monokromatska mjerenja) ili dvije valne duljine (za bikromatska mjerenja) su korištene (16).

Uzorak pune krvi s antikoagulansom se automatski hemolizira s Cobas Integra hemolizirajućim reagensom Gen 2. Metoda koristi TTAB kao deterdžent u hemolizirajućem reagensu kako bi se uklonile interferencije leukocita (TTAB ne lizira leukocite). Prethodno uzimanje uzorka za uklanjanje labilnog HbA1c nije potrebno.

Sve varijante hemoglobina glikirane na N terminalnom beta lancu i koje imaju prepoznatljive dijelove protutijela identična onima na HbA1c su određene ovim testom. Posljedično, testom se može odrediti metaboličko stanje pacijenata s uremijom ili najčešće hemoglobinopatije (HbAS, HbAE, HbA).

Određivanje HbA1c temelji se na turbidimetrijskoj inhibiciji imunoanalize (TINIA) na uzorku hemolizirane pune krvi.

HbA1c u uzorku reagira s anti-HbA1c protutijelima za stvaranje topljivih antigen-protutijelo kompleksa. Budući da se specifično HbA1c protutijelo nalazi samo na jednom mjestu na molekuli HbA1c, kod vezanja ne nastaje kompleksna formacija.

Nakon vezanja u uzorak se dodaje SR (pufer/polihapten) čime započinje reakcija. Polihapteni reagiraju s viškom anti-HbA1c protutijela kako bi se formirao netopljivi kompleks protutijela-polihaptena koji se može odrediti turbidimetrijski (17).

3.1.2. HPLC metoda za određivanje HbA1c (Humanex)

Humanex A1c za razdvajanje HbA1c i ne glikiranog hemoglobina koristi tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti pri čemu se HbA1c razdvaja na temelju različitog naboja. Ne glikirani hemoglobin ima pozitivan naboj, dok glikirani hemoglobin gotovo nema naboja. Na temelju ovih razlika u naboju ove molekule mogu u slabo kiselom mediju biti razdvojene metodom kationske izmjene. Stacionarna faza ima slabo kiseli kationski naboj koji se može vezati s pozitivno nabijenim ne glikiranim hemoglobinom. Glikirani hemoglobin se zbog nedostatka naboja slabo veže za stacionarnu fazu te se zato prvi eluira. Eluat prolazi kroz izvor UV svjetlosti (415 nm) te se mjeri apsorbancija eluata, a rezultati se prikazuju numerički i grafički (kromatogramom).

HbA1c je izražen kao postotak površine HbA1c pika prema površini pika ukupnog hemoglobina u kromatogramu. Rezultat je prikazan na zaslonu analizatora Humanex A1c i može biti ispisan pomoću integriranog termalnog pisača. Rezultat za HbA1c je izražen kao IFCC jedinica (mmol/mol) te je izvedena NGSP jedinica (%). Humanex A1c ima linearni radni raspon od 4 do 17% NGSP/DCCT (20 do 162 mmol/mol IFCC) (18).

3.2. Instrumenti

3.2.1. Cobas Integra (Roche)

COBAS INTEGRA 400 plus sustav je selektivni biokemijski i imunokemijski analizator koji se koristi za određivanje niza biokemijskih parametara (elektroliti, specifični proteini, lijekovi, hormoni). Randomizirani pristup uzorku, inovativna robotika i napredno korisničko sučelje, korištenje Windows NT ili XP, pojednostavljuju i optimiraju tijek radnog procesa. Modul ion selektivnih elektroda (ISE) omogućuje određivanje natrija, kalija, klora i litija paralelno s fotometrijskim mjerenjima. Analizator automatski identificira uzorke, kalibratore i kontrole pomoću čitača crtičnog koda. U instrumentu su integrirana tri odvojena mjerna sustava koja podržavaju četiri različita načela mjerenja: fluorescentni polarizacijski fotometar spektrofotometar koji omogućava spektrofotometrijska i turbidimetrijska mjerenja i ion selektivne elektrode (ISE) s principom mjerenja ion selektivne potenciometrije (16).



Slika 2. Roche Cobas Integra 400 plus (19).

3.2.2. Humanex

Humanex A1c analizator se koristi za detekciju omjera glikiranog hemoglobina (HbA1c) u odnosu na ukupni hemoglobin u uzorku pune krvi.

Glavne komponente Humanex A1c su mikro-upravljački modul, termalni pisač, visokotlačna mikro-infuzijska pumpa, zaslon na dodir, modul za automatsko uzorkovanje, detektor i termostatirana HPLC kolona.

Čitač crtičnog koda može očitati do 5 stalaka za uzorke, a na svaki stalak se može postaviti 10 epruveta s uzorcima. Stalci za uzorke se automatski transportiraju u analizator koji automatski identificira, pipetira i razrjeđuje uzorke pune krvi. Glavni unutrašnji kontrolni modul je mikro-infuzijska pumpa, koja kontrolira rad cijelog instrumenta prema definiranim procedurama. Visokotlačna mikro-infuzijska pumpa služi za uzimanje reagensa i pražnjenje otpada. Modul detektora koji se nalazi unutar instrumenta generira signal i analizira dobivene podatke. Upravljanje Humanex A1c instrumenta je kontrolirano putem LCD zaslona koji također prikazuje i sve bitne informacije o sustavu. Tijekom mjerenja HPLC kolonska peć održava stalnu temperaturu HPLC kolone (35.0± 2.0°C) (18).



Slika 3. Prikaz aparata Humanex A1c (20).

4. REZULTATI

4.1. Usporedba metoda

Tablica 2. Prikaz dobivenih rezultata za HbA1c na dva različita analizatora

ID	Roche Cobas	HumanexA1c
1	8.300	8.60
2	6.6	6.40
3	7.15	7.10
4	4.7	4.90
5	6.3	6.20
6	10.15	10.15
7	6.15	6.10
8	5.1	5.35
9	10.55	10.45
10	15.85	15.05
11	7.25	7.45
12	9.15	9.25
13	6.6	6.75
14	6.25	5.85
15	8.25	8.15
16	5.55	5.50
17	8.9	9.05
18	6.15	6.15
19	11.2	11.00
20	7.55	6.60
21	5.05	5.20
22	7.85	7.85
23	6.75	6.70
24	8.2	8.10
25	6.4	6.50
26	6.9	6.95
27	6	5.90
28	7.05	7.15
29	6.35	6.25
30	10.8	10.80
31	9.2	9.25
32	18.4	18.40
33	5.95	5.70
34	7.3	6.95
35	5	5.05
36	6.7	6.70
37	7.2	7.40
38	9.8	9.95
39	7.15	7.25
40	9.15	8.70

n=40	Roche Cobas	Humanex A1c
Minimum	4.70	4.90
Prvi interkvartil (Q1)	6.26	6.16
medijan	7.15	7.03
Treći interkvartil (Q3)	9.09	8.96
max	18.40	18.40
raspon	13.70	13.50

Tablica 3. Osnovni statistički parametri dobivenih rezultata na Roche Cobas i Humanex A1c aparatu.

Raspon izmjerenih koncentracija HbA1c imunokemijskom metodom na instrumentu Cobas Integra iznosi 13,7%. Podatci se u 50% slučajeva nalaze između 6,26 i 9,09%. 25% podataka u donjem rasponu nalazi se između 4,70 i 6,26%. 25% podataka u gornjem rasponu nalazi se između 9,09 i 18,40%..

Raspon izmjerenih koncentracija HbA1c HPLC metodom na Humanex A1c analizatoru iznosi 13,5%. Podatci se u 50% slučajeva nalaze između 6,16 i 8,96%. 25% podataka u donjem rasponu nalazi se između 4,90 i 6,16%. 25% podataka u gornjem rasponu nalazi se između 8,96 i 18,40%.

Passing Bablokova regresija

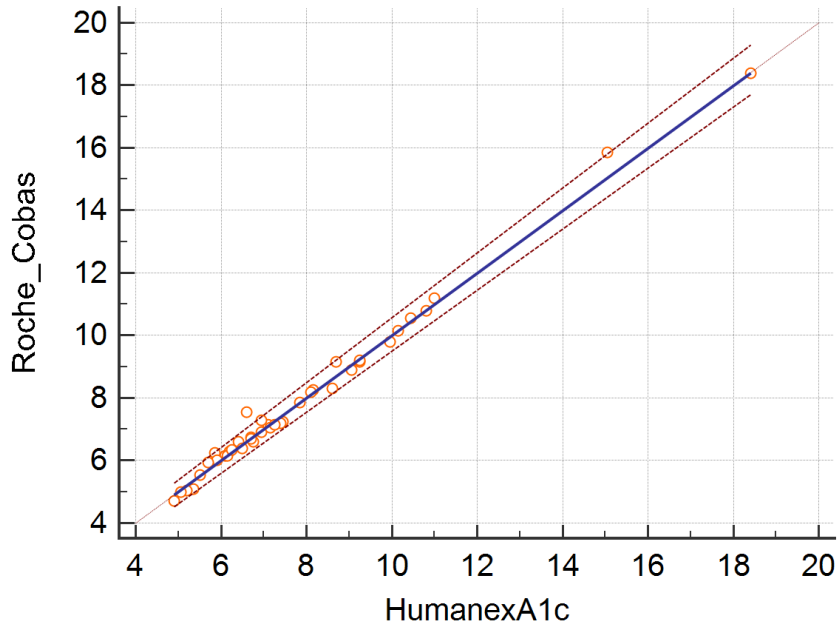
Varijabla X	Humanex_A1c
Varijabla Y	Roche_Cobas
Veličina uzorka	40

Regresijska jednadžba

y = 0,000000 + 1,000000 x	
Sustavne razlike	
Odsječak A	0,0000
95% CI	-0,2767 to 0,1835
Proporcionalne razlike	
Nagib B	1,0000
95% CI	0,9773 to 1,0381
Nasumične razlike	
Residualna Standardna Devijacija (RSD)	0,1867
± 1.96 RSD Interval	-0,3660 to 0,3660
Valjanost linearnog modela	
Cusumov test za linearnost	Nema značajnog odstupanja od linearnosti (P=0,64)

Spearmanov koeficijent korelacije

Koeficijent korelacije	0,983
Razina značajnosti	P<0,0001
95% CI	0,968 do 0,991



Slika 4. Grafički prikaz Passing Bablok regresije.

Passing Bablokovom regresijskom analizom ispitujemo dvije hipoteze:

1. A=0

   Hipotezu prihvaćamo ako interval pouzadnosti za odsječak na osi y (A) obuhvaća nulu. U protivnom zaključujemo da je A različito od nule, tj. da postoji konstantno odstupanje između metoda.

2. B=1

   Hipotezu prihvaćamo ako interval pouzdanosti za nagib pravca (B) obuhvaća jedinicu. U protivnom zaključujemo da je B različito od 1, tj. da postoji proporcionalno odstupanje između metoda.

   Prema dobivenim rezultatima navedene varijable x i y, odnosno aparati Humanex A1c i Roche Cobas nemaju ni konstantnog ni proporcionalnog odstupanja između metoda. Spearmanov test pokazuje dobru korelaciju metoda s koeficijentom korelacije 0,98 ($P<0,0001$), a 95%-tni interval pouzdanosti koeficijenta korelacije 0,97 do 0,99.

Podaci dobiveni korištenjem Passing-Bablokove regresijske analize pokazali su da ne postoji konstantno odstupanje između metoda jer 95%-tni interval pouzdanosti odsječka uključuje 0 (-0,2767 to 0,1835). Rezultati pokazuju da ne postoji ni proporcionalno odstupanje jer interval pouzdanosti nagiba uključuje 1 (0,9773 to 1,0381).

Demingova regresija

Metoda X	Humanex_A1c
Metoda Y	Roche_Cobas

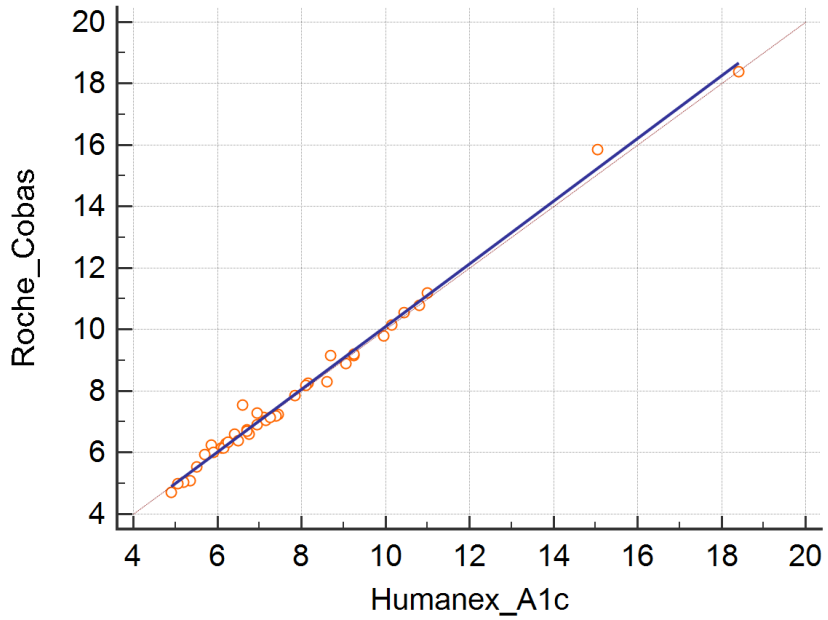
Metoda	Mean	Koeficijent varijacije (%)
X	7,8200	0,34
Y	7,8725	0,35

Veličina uzorka	40
Omjer varijacije	0,9583

Regresijska jednadžba

y = -0,1135 + 1,0212 x

Parametar	Koeficijent	Standardna greška	95% CI
Odsječak	-0,1135	0,2067	-0,5315 to 0,3045
Nagib	1,0212	0,02821	0,9642 to 1,0783



Slika 5. Grafički prikaz Demingove regresijske analize.

Demingova regresijska analiza pretpostavlja nezavisan odnos između dviju metoda, da su metode usporedive te da među njima postoji sljedeći odnos y=A + Bx. Kao i kod Passing Bablokove regresijske analize, Demingovom regresijskom analizom ispitujemo dvije hipoteze: A=0 i B=1.

Dobiveni rezultati ukazuju na dobru usporedivost ispitivanih metoda. Obje hipoteze su prihvaćene i možemo zaključiti da ne postoji ni proporcionalna ni konstantna pogreška.

4.2. Preciznost

Preciznost je određena mjerenjem koncentracije HbA1c u kontrolnim uzorcima pune krvi ljudskog porijekla. Analizirana su dva kontrolna uzorka, jedan u normalnom području i jedan u patološkom području. Za preciznost u seriji HbA1c određen je ponavljanim određivanjem HbA1c u (n=20). Dobiveni rezultati (podaci na temelju vrijednosti DCCT / NGSP) prikazani su u tablici 3.

	Razina 1		Razina 2	
	Srednja vrijednost % HbA1c	CV %	Srednja vrijednost % HbA1c	CV %
Ponovljivost	5.4	0.8	10.2	0.9
Preciznost u iz dana u dan	5.3	1.3	10.3	1.0

Tablica 4. Prikaz rezultata preciznosti dobivenih na Humanex HbA1c analizatoru (17).

5. RASPRAVA

Mjerenje HbA1c je zlatni standard za provjeru dugotrajne glikemije kod pacijenata sa šećernom bolešću. Dostupnost HbA1c testa je omogućila poboljšanje skrbi te stoga zauzima važno mjesto u praćenju pacijenata sa šećernom bolesti. Razina HbA1c u uzorcima se može pouzdano mjeriti različitim metodama kao što su HPLC tekućinska kromatografija, imunokemijske analize, boronatna afinitetna kromatografija i enzimske analize.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je referentna metoda za standardizaciju ostalih rutinskih metoda koju karakterizira preciznost, točnost i stabilnost.

U ovom istraživanju uspoređivani su rezultati dobiveni na uzorcima pune krvi pacijenata s dvije rutinske metode za određivanje HbA1c: HPLC tekućinska kromatografija na Humanex A1c aparatu te imunokemijska metoda na Roche Cobas Integra 400 plus aparatu.

Usporedba metoda je postupak kojim utvrđujemo odstupanje između dva mjerna postupka koja mjere istu mjerenu veličinu, odnosno koncentraciju istog analita. Istraživanjem se pokušalo utvrditi postoji li dobra povezanost između ove dvije metode te da li postoje značajna odstupanja u rezultatima dobivenim navedenim metodama. Statističkom analizom dobiveni su rezultati usporedbe. Rezultati pokazuju da dvije korištene metode imaju dobru usporedivost te da ne postoji ni konstantno ni proporcionalno odstupanje rezultata dobivenih usporednim određivanjem. Ni Passing Bablokova regresijska analiza ni Demingova regresijska analiza nisu pokazale odstupanja između metoda. HPLC metoda se pokazala kao jednakovrijedna zamjena za imunokemijsku metodu, što se i očekivalo budući da su obje metode, prema preporukama, kalibrirane prema IFCC-referentnom materijalu. Usporedivost rezultata dobivenih različitim metodama od iznimne je važnosti zbog potrebe longitudinalnog praćenja HbA1c kod bolesnika sa šećernom bolesti.

6. ZAKLJUČCI

1. HPLC metoda je pokazala prihvatljivu preciznost kako u seriji tako i iz dana u dan
2. Nisu utvrđene niti sustavne niti proporcionalne razlike između dvije uspoređivane metode.
3. Nisu pronađena značajna odstupanja u rezultatima što je iznimno značajno zbog potrebe longitudinalnog praćenja bolesnika sa šećernom bolesti.
4. Rezultati dobiveni i HPLC i imunokemijskom metodom su jednakovrijedni i usporedivi.

7.LITERATURA

1. Dr.sc. Marijana Vučić Lovrenčić /Uloga laboratorija u dijagnostici i praćenju šećerne bolesti
2. Dean L, McEntyre J. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004.; Chapter 1 Introduction to diabetes (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1671/); pristupljeno 10.6.2017.
3. ; Akram T Kharroubi i Hisham M Darwish Diabetes mellitus: The epidemic of the century World J Diabetes. 2015 Jun 25; 6(6): 850–86 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478580/);pristupljeno 12.6.2017.
4. Shariq I. Sherwani, Haseeb A. Khan, Aishah Ekhzaimy, Afshan Masood, and Meena K. Sakharkar Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients Biomark Insights. 2016; 11: 95–104 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4933534/); pristupljeno 13.6.2017.
5. Marijana Vučić Lovrenčić, Elizabeta Topić/ Hemoglobin A1c: Standardizacija „zaltnog standarda“; Biochemia Medica 2006;16(1);25-36
6. . Jeanne M. Rhea, PhD Ross Molinaro, PhD;Pathology Consultation on HbA1c Methods and Interferences Am J Clin Pathol (2014) 141 (1): 5-16 (https://academic.oup.com/ajcp/article/141/1/5/1766020/Pathology-Consultation-on-HbA1c-Methods-and) ;pristupljeno 15.6.2017.
7. Robert M. Cohen, Shannon Haggerty i William H. Herman HbA1c for the Diagnosis of Diabetes and Prediabetes: Is It Time for a Mid-Course Correction? J Clin Endocrinol Metab. 2010 Dec; 95(12): 5203–5206. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2999978/); pristupljeno 15.6.2017.
8. Christopher D. Saudek, M.D. i Jessica C. Brick, B.A. The Clinical Use of Hemoglobin A1c J Diabetes Sci Technol. 2009 Jul; 3(4): 629–634. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769940/); pristupljeno 14.6.2017.
9. Cas Weykamp, Ph.D. HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects; Ann Lab Med. 2013 Nov; 33(6) 393-400 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819436/); pristupljeno 14.6.2017.
10. Shariq I. Sherwani, Haseeb A. Khan, Aishah Ekhzaimy, Afshan Masood i Meena K. Sakharkar Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients Biomark Insights. 2016; 11: 95–104

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4933534/); pristupljeno 20.6.2017.

11. Slika 1.(http://www.medicographia.com/2010/01/advanced-glycation-end-products-ages-and-their-receptors-rages-in-diabetic-vascular-disease/); pristupljeno 20.6.2017.
12. Azadeh Karami i Azar Baradaran Comparative evaluation of three different methods for HbA1c measurement with High-performance liquid chromatography in diabetic patients Adv Biomed Res. 2014; 3: 94. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4007341/; pristupljeno 22.6.2017.
13. ADA. Standards of medical care in diabetes-2016. Diabetes Care 2016;39 Suppl 1:1-112
14. WHO,Use of Glycated hemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus: Abbreviated Report of a WHO Consultation
15. Lidija Bilić-Zulle Comparison of methods:Passing and Bablok regression. Biochemia Medica 2011;21 (1):49-52
16. Cobas Integra 400 plus User Manual Software Version 3.4 (Windows XP);2006, Roche Diagnostics GmbH
17. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, et al. Tests of glycemia in diabetes. Diabetes Care 1995;18:896-909.
18. Humanex A1c User Manual, 2015
19. Slika2.;http://www.toliopoulos.gr/index.php?SCREEN=products_detail&ProductID=7060
20. Slika 3. http://medi-lab.hu/Ujdonsagok

8. SAŽETAK

UVOD: Eritrociti sadrže 95% do 98% adultnog hemoglobina (HbA), a ostalo su produkti alternativne sinteze globina i post-translacijskih modifikacija HbA. Hemoglobin A1c (HbA1c) najbrojnija je frakcija HbA. HbA1c danas se koristi kao standardna mjera prosječne glikemije te služi za rutinsko praćenje i prevenciju dugoročnih komplikacija šećerne bolesti jer odražava prosječnu koncentraciju glukoze u krvi tijekom prethodna 2 do 3 mjeseca. Današnji klinički normativ za procjenu učinkovitosti terapije i rizika pojave komplikacija šećerne bolesti čini dobra kontrola glikemije, izražena kroz vrijednost HbA1c $\leq$ 7%.

MATERIJALI I METODE: Usporedba metoda: imunokemijske i HPLC metode provedena je korištenjem rutinskih uzoraka pacijenata koji su upućeni u laboratorij radi standardne dijagnostičke obrade. Ispitano je 40 uzoraka pune krvi pacijenata na analizatorima Roche Cobas Integra 400 plus te Humanex A1c.

CILJEVI: Cilj ovog istraživanja bio je provesti analitičku evaluaciju usporedivosti rezultata za HbA1c dobivenih različitim metodama.

REZULTATI: Rezultati dobiveni Passing Bablokovom i Demingovom regresijskom analizom pokazuju da su metode u potpunosti usporedive jer nema ni konstantnog ni proporcionalnog odstupanja između rezultata dobivenih navedenim metodama. HPLC metoda koja se uvodila u rutinski rad pokazala je zadovoljavajuću preciznost.

ZAKLJUČAK: Usporednim određivanjem pokazalo se da ne postoje značajna odstupanja u rezultatima dobivenim ispitivanim metodama što je iznimno značajno zbog potrebe longitudinalnog praćenja bolesnika sa šećernom bolešću.

KLJUČNE RIJEČI: HbA1c, šećerna bolest, usporedba metoda

9. ABSTRACT

INTRODUCTION: Erythrocytes contain about 95% to 98% of adult hemoglobin (HbA), and small amount of other products of alternative globin synthesis and post-translational modification of HbA. Hemoglobin A1c (HbA1c) is the largest fraction of HbA. HbA1c is now used for routine monitoring and prevention of long-term diabetes complications because it reflects the average blood glucose concentration over the previous 2 to 3 months. Today's clinical standard for assessing the efficacy of the therapy and the risk of complications of diabetes is good glycemic control, expressed through HbA1c $\leq$ 7%.

MATERIALS AND METHODS: 40 full-blood samples were analyzed on Roche Cobas Integra 400 plus and Humanex A1c analyzers using routine patient samples taken during standard diagnostic treatment at a hospital. Comparison of methods, immunoassay method and HPLC was performed.

OBJECTIVES: The aim of this study was to evaluae comparability of rezults for HbA1c obtained by two different methods.

RESULTS: The results obtained by Passing Bablok and Deming's regression analysis show that methods are completely comparable because there is no constant or proportional deviation between the results obtained by the mentioned methods. HPLC method that was introduced into routine work proved the satisfactory precision.

CONCLUSION: It was shown that there were no significant differences in the results of the investigated methods, which is extremely important because of the longitudinal monitoring of patients with diabetes mellitus.

KEY WORDS: HbA1c, diabetes, comparison of the methods

10.ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime	Dora Lučin
Adresa	Križine 10, 21 000 Split
Država	Hrvatska
Kontakt broj	0994560690
E-mail	dora.lucin@yahoo.com
Mjesto i datum rođenja	13.6.1995., Split

OBRAZOVANJE

Vrijeme (od - do)	2010-2014
Institucija	**V. gimnazija „Vladimir Nazor“ Split** Zagrebačka 2, 21 000 Split
Vrijeme (od - do)	2014-2017
Institucija	Sveučilišni odjel zdravstvenih studija Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika Ruđera Boškovića 35, 21 000 Split

RADNO ISKUSTVO

Vrijeme (od - do)	lipanj- rujan 2014-e godine
Poslodavac	**Galerija „In“, Split**
Radno mjesto	Prodavač suvenira i umjetničkih slika

Vrijeme (od - do)	rujan 2016-e – srpanj 2017-e godine
Poslodavac	Proteus trgovina Transporter footwear
Radno mjesto	Prodavač u dućanu obuće

DODATNA ZNANJA

STRANI JEZICI	Engleski jezik (aktivno)
	Talijanski jezik (pasivno)
OSTALE SPOSOBNOSTI	Odgovornost
	Spremnost za rad u timu
	Samopouzdanje u prilagodbi novim sredinama
VOZAČKA DOZVOLA	B kategorija