Verifikacija metode za određivanje hemoglobina A1c kapilarnom elektroforezom na uređaju Sebia Minicap Flex-Piercing u postupku uvođenja u rutinski rad

Buljubašić, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:883503

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Lidija Buljubašić

VERIFIKACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE HEMOGLOBINA A_1c KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

Lidija Buljubašić

VERIFIKACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE HEMOGLOBINA A_1c KAPILARNOM ELEKTROFOREZOM

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu Osijek,

Sveučilišnom diplomskom studiju medicinsko laboratorijske dijagnostike

Mentor rada: Doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, mag. med. biochem, spec. med. biokemije

Rad ima 53 lista, 10 tablica i 13 slika.

Zahvaljujem svome mentoru doc. dr. sc. Vatroslavu Šerić, mag. med. biochem. spec. med. biokemije što je omogućio ostvarenje ovoga rada.

Iskazujem zahvalnost mr. sc. biochem Mirjani Fijačko mag. med. biochem. spec. med. biokemije na pristupačnosti, pozitivnosti i optimizmu koje je iskazivala tijekom cijeloga vremena.

Velika zahvalnost Ines Šahinović, mag. med. biochem. spec. med. biokemije na svim praktičnim svjetima, strpljenju i trudu prilikom oblikovanja ovoga rada.

Zahvaljujem i svojim kolegicama, djelatnicima Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, na suradnji i strpljenju tijekom trajanja studija.

Na kraju se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima što su vjerovali u mene i podržavali me od prvoga dana studija.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. EVALUACIJA I VERIFIKACIJA METODE 2
1.1.1. Nepreciznost 3
1.1.2. Netočnost 3
1.1.3. Linearnost 4
1.1.4. Usporedba s postojećom metodom 4
1.1.5. Primjenjivost referentnoga raspona i graničnih vrijednosti 5
1.2. ŠEĆERNA BOLEST 5
1.2.1. Šećerna bolest tip 1 6
1.2.2. Šećerna bolest tip 2 7
1.2.3. Šećerna bolest u trudnoći 7
1.2.4. Preddijabetes 7
1.2.5. Komplikacije šećerne bolesti 8
1.2.6. Smjernice za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti 8
1.2.7. Uloga određivanja hemoglobina A_1c u šećernoj bolesti 10
1.2.8. Standardizacija metoda za određivanje hemoglobina A_1c 13
2. CILJ 16
3. MATERIJALI I METODE 17
3.1. METODE 17
3.1.1. Kapilarna elektroforeza 17
3.1.2. TINIA 18
3.2. ISPITANICI/UZORCI 18
3.3. POSTUPAK ISTRAŽIVANJA 19
3.3.1. Provjera nepreciznosti i netočnosti metode 19
3.3.2. Provjera usporedivosti metoda 19
3.3.3. Utjecaj hemoglobinopatija na određivanje hemoglobina A_1c 20
3.4. STATISTIKA 20

4. REZULTATI 23
5. RASPRAVA 30
6. ZAKLJUČAK 36
7. SAŽETAK 37
8. SUMMARY 38
9. LITERATURA 39
10. ŽIVOTOPIS 43

POPIS KRATICA

ADA	American Diabetic Association (engl.) Američko udruženje za šećernu bolest
CDA	Canadian Diabetes Association (engl.) Kanadsko udruženje za šećernu bolest
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute (engl.) Institut za kliničke i laboratorijske standarde
DCCT	Diabetes Complications and Control Trial (engl.) Studija o kontroli i komplikacijama šećerne bolesti
FDA	Food and Drug Administration (engl.) Uprava za hranu i lijekove
FPG	fasting plasma glucose glukoza natašte
GADA	Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies (engl.) antitijela na glutamat dekarboksilazu
HbA	adultni hemoglobin
HKMB	Hrvatska komora medicinskih biokemičara
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (engl.) visokotlačna tekućinska kromatografija
IA-2 i IA-2β	Islet Antigen Antibody, IA-2 i IA-2β (engl.) antitijela na tirozin fosfatazu
IAA	Insulin Autoantibody (engl.) inzulinska antitijela
ICA	Insulin Cell Antibody (engl.) antitijela na stanice
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (engl.) Međunarodno udruženje za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu
IFG	impaired fasting glucose (engl.) poremećaj glukoze natašte
IGT	impaired glucose tolerance (engl.) poremećaj tolerancije glukoze

JDS	Japanese Diabetes Society (engl.) Japansko društvo za dijabetes
K-EDTA	kalij-etilendiamintetraoctena kiselina
NACB	National Academy of Clinical Biochemistry (engl.) Nacionalna akademija kliničke biokemije
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program (engl.) Nacionalni program za standardizaciju glikiranoga hemoglobina
NICE	National institute for health and care excellence (engl.)
OGTT	Oral glucose tolerance test (engl.) test oralnoga opterećenja glukozom
TINIA	Turbidimetric Inhibition Immunoassy (engl.) turbidimetrijska inhibicijska imunokemijska metoda
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study (engl.) Britanska prospektivna studija o šećernoj bolesti
WHO	World Health Organization (engl.) Svjetska zdravstvena organizacija
WIV-ISP	Scientific Intitute of Public Health (engl.) Znanstveni institut za javno zdravstvo

POPIS TABLICA

Tablica 1: Razine evaluacije i performanse analitičke metode koje se određuju procesom evaluacije i verifikacije 3
Tablica 2: Podjela šećerne bolesti prema uzroku 6
Tablica 3: Kriteriji za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti 9
Tablica 4: Prednosti i nedostatci testova za dijagnozu šećerne bolesti 11
Tablica 5: Analitički i klinički izazovi u određivanju i interpretaciji hemoglobina A_1c 13
Tablica 6: Kriterij za apsolutni bias (netočnost) i nepreciznost 19
Tablica 7: Kriteriji za procjenu jačine povezanosti 21
Tablica 8: Passing-Bablok regresijska analiza uz interval pouzdanosti od 95% 21
Tablica 9: Ponovljivost i reproducibilnost na Minicap Flex Piercing, Sebia 23
Tablica 10: Procjena netočnosti analize kontrolnih uzoraka na Minicap Flex Piercing, Sebia i Dimension® ExL, Siemens 24

POPIS SLIKA

Slika 1: Sinteza hemoglobina A_1c 9
Slika 2: Metode određivanja hemoglobina A_1c (osobna slika) 13
Slika 3: Princip kapilarne elektroforeze (osobna slika) 17
Slika 4: Kapilarna elektroforeza (HbA_1c-hemoglobin A_1c, HbA_0-adultni hemoglobin A_0, HbA_2-adultni hemoglobin A_2) 23
Slika 5: Grafikon Passing-Bablok regresijske analize 25
Slika 6: Bland-Altman grafikon 25
Slika 7: Grafički prikaz Wilcoxonovog testa važnosti razlike rezultata dobivenih prije i nakon zamrzavanja (-20°C) 26
Slika 8: Frakcija hemoglobina F (HbF) na elferogramu 27
Slika 9: HbF ili varijantni hemoglobin na elferogramu 27
Slika 10: Hemoglobin lepore i HbF na elferogramu 28
Slika 11: Hb lepore i HbF na elferogramu 28
Slika 12: Hb lepore i HbF na elferogramu 29
Slika 13: Hb lepore i HbF na elferogramu 29

1. UVOD

Šećerna je bolest najzastupljeniji metabolički poremećaj današnjice, čija je prevalencija u stalnome porastu. Predviđa se kako će do 2040. godine 642 milijuna ljudi bolovati od šećerne bolesti. Posebice je izražen porast prevalencije šećerne bolesti u trudnoći, te šećerne bolesti tip 1 kod djece, za koji epidemiološka istraživanja pokazuju godišnji porast prevalencije od 3% (1). Isto tako, epidemiološke studije pokazuju kako je zbog brojnih mikrovaskularnih i makrovaskularnih oštećenja šećerna bolest četvrti najčešći uzrok smrtnosti u razvijenim zemljama (1). Ovi statistički pokazatelji karakteriziraju šećernu bolest kao jednu od vodećih prijetnji ljudskome zdravlju u 21. stoljeću. Učinkovita, valjana i rana dijagnostika i terapija neophodne su za kontrolu bolesti i smanjenje njezine pojavnosti.

Dugogodišnje kontrolirane prospektivne studije dokazuju kako su komplikacije uzrokovane šećernom bolešću izravno povezane s prosječnom koncentracijom glukoze u krvi i stupnjem glikacije (2). Hemoglobin A_1c danas se smatra vodećim biljegom glikemijske kontrole i rizika od razvoja kroničnih komplikacija šećerne bolesti. Važnost hemoglobina A_1c u posljednjih sedam godina značajno je porasla, jer ga je Američko udruženje za dijabetes (engl. American Diabetes Association, ADA) uvrstilo, uz koncentraciju glukoze u serumu, među biljege za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti (2). Ova značajna uloga rezultirala je oštrijim dijagnostičkim i analitičkim kriterijima, te potrebom za standardizacijom i harmonizacijom metoda za određivanje hemoglobina A_1c. Godine 2012. Uprava za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) odobrila je upotrebu metode kapilarne elektroforeze na uređaju Minicap Flex Piercing, Sebia, za određivanje hemoglobina A_1c u punoj krvi u svrhu postavljanja dijagnoze, te praćenja terapije i razvoja rizika od komplikacija šećerne bolesti (3).

Laboratorijski rezultati postupaka ispitivanja imaju izravan utjecaj na zdravlje i kvalitetu, terapije bolesnika. Jedan od osnovnih preduvjeta za uspješno upravljanje kvalitetom u medicinskom laboratoriju je verifikacija postupaka ispitivanja prije njihove primjene u rutinskome radu.

Ovim istraživanjem ispitane su i verificirane performanse analizatora Minicap Flex Piercing, Sebia i uspoređene su s trenutno korištenom metodom za određivanje hemoglobina A_1c (Dimension ExL, Siemens) koja se u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek koristi u svrhu praćenja kontrole i rizika od razvoja dugoročnih komplikacija šećerne bolesti.

1. UVOD

1.1. EVALUACIJA I VERIFIKACIJA METODE

Provođenjem dobre laboratorijske prakse, te postupaka standardizacije laboratorijskih metoda, omogućeno je izdavanje kvalitetnih rezultata laboratorijskih pretraga koji omogućuju donošenje medicinskih odluka prilikom postavljanja dijagnoze, praćenja učinkovitosti terapije i tijeka bolesti. Stoga je prilikom uvođenja novih metoda u rutinski rad laboratorija potrebno procijeniti jesu li pogodne i prihvatljive za rad i jesu li u suglasnosti s prethodno korištenim metodama. Sukladno preporukama Međunarodnog udruženja za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (engl. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC) - smo se rezultati dobiveni validiranim metodama i instrumentima mogu koristiti u dijagnostičke svrhe.

Evaluacija analitičke metode je složeni proces, kojeg čine validacija i verifikacija. Evaluacija je postupak ispitivanja karakteristika izvedbe analitičke metode s ciljem kako bi se osigurali točni, precizni i reproducibilni rezultati. Cilj validacije analitičke metode je dokazati kako određena metoda služi svrsi kojoj je primarno namijenjena. Verifikacija je provjera istinitosti tehničkih specifikacija metode koje je validacijom postavio proizvođač (4).

Treća razina evaluacije je verifikacija metode koju mora provesti svaki laboratorij prilikom uvođenja metode u rutinski rad. Zadaća laboratorija je (5) procesom kratke evaluacije provjeriti može li nova metoda zadovoljiti potrebe laboratorija i funkcionira li onako kako je naznačio proizvođač u uvjetima smoga laboratorija, s uzorcima koje analizira laboratorij, te u radnoj sredini i s osobljem laboratorija.

U tablici 1 prikazane su performanse koje mora odrediti proizvođač procesom proširene evaluacije, te performanse koje mora provjeriti laboratorij procesom verifikacije nove metode ili uređaja.

Tablica 1: Razine evaluacije i performanse analitičke metode koje se određuju procesom evaluacije i verifikacije (5)

1. PROŠIRENA EVALUACIJA	2. MULTICENTRIČNA EVALUACIJA	3. VERIFIKACIJA
Utvrđivanje, tehničko-analitičkih kriterija	Potvrda o tome ispunjava li uređaj, tehničko-analitičke kriterije proizvođača	Potvrda o tome ispunjava li uređaj potrebe i, tehničko-analitičke kriterije u specifičnim uvjetima pojedinoga laboratorija
PROIZVOĐAČ	NEKI KORISNICI	SVI KORISNICI
Nepreciznost		Nepreciznost
Netočnost		Netočnost
Usporedba s postojećim metodama		Usporedba s postojećim metodama
Linearnost		Linearnost
Referentni rasponi/granične vrijednosti		Ocjena referentnog raspona
Granice detekcije		
Granice kvantifikacije		
Utjecaj interferencija		

Verifikaciju metode nužno je provesti prije rutinske uporabe odabrane metode ili analizatora, prilikom prijenosa metode u drugi laboratorij, prilikom promjene uvjeta ili određenog parametra koji je prethodno bio verificiran. Ukoliko laboratorij sam razvija metodu, dužan je provesti proširenu evaluaciju.

1.1.1. Nepreciznost

Nepreciznost (engl. imprecision) je slaganje između ponovljenih mjerenja istoga uzorka i predstavlja raspršenost oko srednje vrijednosti mjerenja (6). Što je raspršenost mjerenja manja, manja je i nepreciznost. Mjerenjem nepreciznosti možemo utvrditi u kojoj mjeri slučajna pogreška utječe na rezultat mjerenja. Nepreciznost se određuje mjerenjem nepreciznosti u seriji (ponovljivost, engl. repeatability) i nepreciznosti između serija (reproducibilnost, međupreciznost, engl. reproducibility). Ponovljivost predstavlja neslaganje u skupu ponovljenih mjerenja kada su sva mjerenja izvedena pod jednakim uvjetima. Reproducibilnost je pokazatelj neslaganja između ponovljenih mjerenja tijekom dužega vremena, što omogućuje obuhvaćanje svih poznatih, glavnih izvora mjerne pogreške (osim mogućih pogrešaka zbog velikih održavanja, kalibriranja i promjene proizvodne serije reagensa). Ispitivanje ponovljivosti i reproducibilnosti provodi se tijekom pet dana i izražava se kao standardna devijacija ili koeficijent varijacije (7).

1.1.2. Netočnost

Netočnost (engl. inaccuracy) je bliskost slaganja izmjerene vrijednosti i istinite vrijednosti mjerene veličine (7). Prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (engl.

The Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI EP15-A2) netočnost je moguće odrediti na dva načina:

a) Usporedba s referentnom metodom:

Referentna metoda je ona koja omogućuje najmanju netočnost mjerenja s malom mjernom nesigurnošću i s najmanje inteferencija. Kao referentna metoda danas se najčešće koristi tekućinska ili plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom (LC-MS/MS). Tijekom proširene validacije proizvođač je dužan svoju metodu usporediti i procijeniti netočnost korištenjem referentne metode. Samom korisniku rijetko je dostupna referentna metoda pa je ovaj način procjene netočnosti rijetko primjenjiv.

b) Usporedba s očekivanim vrijednostima certificiranih referentnih materijala:

Certificirani referentni materijali su uzorci s točno poznatim koncentracijama analita. Kao kontrolni materijali s poznatom koncentracijom mogu se koristiti i uzorci vanjske kontrole kvalitete.

Oba načina osiguravaju kontrolni materijal s točno poznatom koncentracijom analita što omogućuje procjenu netočnosti metode. Netočnost se procjenjuje analizom referentnog materijala tijekom pet dana. Potrebno je koristiti materijal u dvije koncentracijske razine. Netočnost se izražava mjernim odstupanjem (engl. bias) u mjernim jedinicama i procjenjuje utjecaj sustavne pogreške (7).

1.1.3. Linearnost

Kvantitativna analitička metoda je linearna kada postoji matematički potvrđeni pravocrtni odnos između mjernoga signala i prave koncentracije analita. Linearnost se ispituje za sve metode kojima se linearni odnos ovisnosti mjernoga signala i koncentracije određuje u najmanje tri koncentracijske točke. Procjena linearnosti ispituje se u pet do sedam koncentracijskih točaka, unutar propisnoga područja linearnosti metode. Metoda je linearna ako je odnos između srednje vrijednosti mjerenih koncentracija i stvarnih koncentracija analita u uzorku linearan (8).

1.1.4. Usporedba s postojećom metodom

Usporedba s postojećom metodom je postupak kojim ispitujemo podudarnost rezultata mjerenja dobivenih ispitivanom metodom, u odnosu na metodu koja se do tada koristila u

rutinskome radu laboratorija. Usporedbu je potrebno provesti analizom uzoraka pacijenata iz cijeloga koncentracijskog područja pomoću obje metode. Dvije ili više metoda koje su istovremeno dostupne i funkcionalne, a rezultati su im međusobno usporedivi, omogućuju:

- Veću učinkovitost laboratorija (analizu većega broja uzoraka)
- Postizanje potrebnog TAT-a (engl. turn around time, vrijeme obrade) i brže izdavanje nalaza
- Brzi i pouzdani prelazak s jednoga mjernoga sustava na drugi, ukoliko se pojavi pogreška
- Točne rezultate, neovisno o korištenoj metodi
- Longitudinalno praćenje bolesnika (8)

1.1.5. Primjenjivost referentnoga raspona i graničnih vrijednosti

Hrvatska komora medicinskih biokemičara (HKMB) kontinuirano izdaje preporuke za metode i postupke ispitivanja, te pripadajuće referentne intervale koji se trebaju primjenjivati. Oni su određeni na populaciji zdravih ispitanika iz Hrvatske. Ako za neki analit HKMB nije preporučila referentni raspon, moguće je koristiti referentni raspon i granične vrijednosti koje propisuje proizvođač ili se isti mogu preuzeti iz stručne literature ako se utvrdi kako su prikladni za populaciju kod koje će se primjenjivati. Ukoliko postoje klinički definirani referentni rasponi ili granične vrijednosti, kao u slučaju hemoglobina A_1c, neovisno o metodi, laboratorij ih je obvezan primjenjivati - što nalaže i HKMB.

1.2. ŠEĆERNA BOLEST

Šećerna bolest je stanje poremećenoga metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina, karakterizirano hiperglikemijom različitog uzroka. Mogući uzroci su nedostatak inzulina, nedostatna aktivnost inzulina ili oboje. Trenutno važeća podjela šećerne bolesti prema uzroku (9) prikazana je u tablici 2.

Tablica 2: Podjela šećerne bolesti prema uzroku

Tip šećerne bolesti		Stanje	Uzrok
I.	Tip 1	Destrukcija beta stanica najčešće dovodi do potpunog nedostatka inzulina	• Imunološki posredovana • Idiopatski
II.	Tip 2	Inzulinska rezistencija i nedostatak inzulina	• Pretilost • Metabolički sindrom
III.	Ostali tipovi		• Genetski defekti funkcije beta stanica i djelovanja inzulina • Bolesti egzokrine funkcije pankreas • Endokrinopatije • Toksični učinci lijekova i kemikalija • Infekcije • Ostali genetski sindromi povezani s šećernom bolešću
IV.	Šećerna bolest u trudnoći		

1.2.1. Šećerna bolest tip 1

Šećerna bolest tip 1 čini 5-10% svih slučajeva šećerne bolesti i može se podijeliti na podtip 1A i 1B. Razvoj podtipa 1A šećerne bolesti, rezultat je progresivnog, autoimunog razaranja beta stanica Langerhansovih otočića nakon aktivacije T limfocita. Autoimuni proces započinje mjesecima, čak i godinama, prije pojave kliničke slike šećerne bolesti. Simptomi bolesti javljaju se tek kada se broj funkcionalnih beta stanica smanji za 80-90%. Brzina i intenzitet autoimunog razaranja beta stanica brži je kod djece nego kod odraslih bolesnika. Autoimuno razaranje beta stanica praćeno je pojavom specifičnih humoralnih biljega: antitijela na stanice (engl. Insulin Cell Antibody, ICA), inzulinskih antitijela (engl. Insulin Autoantibody, IAA), antitijela na glutamat dekarboksilazu (engl. Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies, GADA) i antitijela na tirozin fosfatazu (engl. Islet Antigen 2 Antibody, IA-2 i IA-2β).

Podtip 1B šećerne bolesti javlja se zbog kromosomskih abnormalnosti ili kao idiopatski oblik šećerne bolesti. Također dolazi do uništenja beta stanica Langerhansovih otočića, ali taj proces nije uzrokovan reakcijom stanične imunosti. Bolesnici koji boluju od šećerne bolesti tip 1 ovisni su o inzulinu (10).

1.2.2. Šećerna bolest tip 2

Šećerna bolest tip 2 nastaje kao kombinacija poremećaja osjetljivosti ciljnih tkiva na inzulin i poremećaja u sintezi i lučenju inzulina. Ovaj tip šećerne bolesti obuhvaća 90% svih oboljelih (10). Smanjena osjetljivost perifernih tkiva na djelovanje inzulina dovodi do hiperinzulinemije kako bi se održala fiziološka koncentracija glukoze u krvi. Najčešći je uzrok visceralna pretilost, iako se tip bolesti javlja i kod osoba s normalnom tjelesnom masom. Zbog relativnoga manjka inzulina spriječen je nastanak akutnih komplikacija bolesti, te bolest često dugo ostaje neprepoznata. Faktori rizika za nastanak šećerne bolesti tipa 2 su dislipidimija i hipertenzija (tzv. metabolički sindrom, poznat i kao sindrom X i sindrom inzulinske rezistencije), manjak fizičke aktivnosti, godine starosti. Naglašena je genetska predispozicija za obolijevanje (11).

1.2.3. Šećerna bolest u trudnoći

Šećerna bolest u trudnoći oblik je koji se prvi puta pojavljuje tijekom trudnoće i najčešće nestaje nakon poroda. Pojavljuje se u 1–2 % trudnica. Pojačano lučenje posteljičnih hormona, posebno potkraj drugoga i u trećem tromjesečju, uzrokuje inzulinsku rezistenciju, a time i povećanu potrebu za inzulinom, te se povećava njegovo lučenje. Posljedica ove bolesti je rađanje djece s porođajnom masom većom od 4 kilograma, jer stalna hiperglikemija majke potiče gušteraču ploda na pojačano lučenje inzulina, što uzrokuje njegov pojačan rast – makrosomiju. Trudnice sa šećernom bolešću u trudnoći imaju povećan rizik od kasnijeg razvoja šećerne bolesti tip 2 (11).

1.2.4. Preddijabetes

Preddijabetes je stanje koje se može, ali ne mora razviti u šećernu bolest. Ovoj skupini pripadaju osobe koje imaju povišenu koncentraciju glukoze u krvi, ali nedovoljnu za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti. Literaturno razlikujemo poremećaj glukoze natašte (engl. impaired fasting glucose, IFG) i poremećaj tolerancije glukoze (engl. impaired glucose tolerance, IGT). IFG i IGT su rizični faktori za razvoj šećerne bolesti u budućnosti, kao i za nastanak kardiovaskularnih bolesti, posebno ukoliko su udruženi s ostalim rizičnim faktorima (pretilost, osobito visceralna, dislipidemija, hipertenzija, manjak tjelesne aktivnosti). Promjena načina života u smjeru povećanja tjelesne aktivnosti i smanjenja tjelesne mase uvelike smanjuje mogućnost nastanka šećerne bolesti (9,10,11).

1.2.5. Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije šećerne bolesti mogu biti akutne i kronične (11). Akutne komplikacije nastaju naglo i mogu ozbiljno narušiti zdravlje. U pravilu zahtijevaju hospitalizaciju i po izlječenju najčešće ne ostavljaju posljedice. U akutne komplikacije šećerne bolesti ubrajamo ketoacidozu, hiperosmolarno stanje, laktoacidozu i hipoglikemiju. U kronične komplikacije šećerne bolesti ubrajaju se mikrovaskularne komplikacije (dijabetička retinopatija, nefropatija, neuropatija), te makrovaskularne komplikacije (aterosklerotska bolest krvnih žila). Poseban je entitet dijabetičko stopalo koje je posljedica i neuropatije i promjena na krvnim žilama. Važno je naglasiti kako se kronične komplikacije mogu spriječiti ili značajno odgoditi strogim nadzorom glikemije i krvnoga tlaka (11).

1.2.6. Smjernice za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti

Rastuća prevalencija i veliki rizik za razvoj mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija podigli su svijest o potrebi prepoznavanja faktora rizika i prevencije, ranoga otkrivanja i probira na šećernu bolest, te praćenje uspješnosti terapije.

Smjernice za optimalnu prevenciju, probir i praćenje terapije propisale su brojna velika nacionalna udruženja poput ADA-e i Kanadskog udruženja za dijabetes (engl. Canadian Diabetes Association, CDA), te Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Helth Organization, WHO).

Sva tri udruženja usuglasila su se za probir i postavljanje dijagnoze šećerne bolesti koristiti koncentraciju glukoze natašte, te test oralnog opterećenja glukozom (OGTT) (13, 14, 15).

OGTT test se danas još preporuča jer su istraživanja potvrdila kako se samo određivanjem glukoze natašte ne dijagnosticira oko 30% slučajeva šećerne bolesti. Osim toga, ovaj test je „zlatni standard“ za prepoznavanje šećerne bolesti u trudnoći, te poremećaja tolerancije glukoze i poremećaja glukoze natašte (10).

Od 2010. godine ADA i CDA, te od 2011. godine i WHO, uvrštavaju hemoglobin A_1c među biljege za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti. Međutim, sva tri udruženja naglašavaju kako se hemoglobin A_1c koristi isključivo u postavljanju dijagnoze šećerne bolesti tip 2. Neophodno je koristiti standardizirane metode koje su umjerene prema referentnoj metodi i međunarodnom referentnom standardu (12).

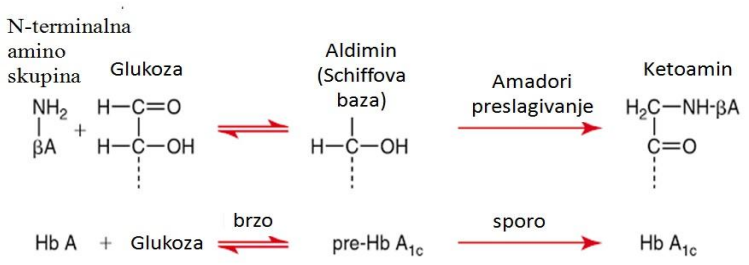
U slučaju da je pozitivan jedan od tri testa za dijagnozu šećerne bolesti, preporuka je ponoviti test s povišenom vrijednošću i dijagnozu temeljiti na ponovljenome testu.

Tablica 3: Kriteriji za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti (12, 13, 14, 15)

Glukoza natašte		≥ 7,0 mmol/L
Hemoglobin A_1c		≥ 6,5%
Glukoza nakon 2 sata u OGTT		≥ 11,1 mmol/L
Glukoza u bilo koje doba dana		≥ 11,1 mmol/L
Šećerna bolest u trudnoći	Glukoza natašte/FPG	5,1–6,9 mmol/L
	Glukoza nakon 1 sat u OGTT	≥ 10,0 mmol/L i/ili
	Glukoza nakon 2 sata u OGTT	8,5–11,0 mmol/L

1.3. HEMOGLOBIN A_1c

Hemoglobin je metaloprotein koji se nalazi u citoplazmi eritrocita. Sintetizira se u eritroblastima u koštanoj srži iz četiri pirolova prstena koji vežući željezo čine hem. Hem se nekovalentnim vezama veže na alfa i beta globinske lance. Po dva alfa i dva beta lanca čine kvarternu strukturu adultnog hemoglobina, proteina neophodnoga za opskrbu stanica kisikom (13). Eritrociti zdravoga čovjeka sadrže 90% adultnog hemoglobina (HbA), a ostatak čine produkti alternativne sinteze globinskih lanaca (hemoglobin A_2, hemoglobin F, druge varijante hemoglobina), te produkti posttranslacijskih modifikacija hemoglobina. Jedna od posttranslacijskih modifikacija je glikacija – proces neenzimskoga vezanja šećernih ostataka na amino skupine proteina (14). Vezanjem glukoze na N-terminalni valin beta lanca hemoglobina nastaje nestabilna Schiffova baza (aldimin ili prehemoglobin A_1c). Schiffova baza je reverzibilni oblik glikacije, međutim u prisutnosti visoke koncentracije glukoze Schiffova baza prelazi Amadori preslagivanjem u stabilni ireverzibilni ketoamin - hemoglobin A_1c. Prema IFCC hemoglobin A_1c se definira kao hemoglobin koji je ireverzibilno glikiran na jednom ili oba N-terminalna valina beta globinskog lanca (15). Hemoglobin A_1c se izražava u odnosu na količinu adultnog hemoglobina A.



Slika 1: Sinteza hemoglobina A_1c (16)

Glikacija je moguća i na drugim mjestima unutar beta globinskoga lanca, primjerice na lizinskim ostatcima, te na alfa globinskom lancu. Hemoglobin A_1c i druge vrste glikiranih

hemoglobina otkrivene su još 1958. godine. Zahvaljujući promijenjenom površinskom naboju u odnosu na hemoglobin A, kromatografijom s kationskim izmjenjivačem odvojene su tri manje hemoglobinske komponente koje putuju na koloni brže od hemoglobina A. Nazvane su frakcijom „brzih hemoglobina“, a čine je hemoglobin A_1a, hemoglobin A_1b i hemoglobin A_1c.

Koncentracija hemoglobina A_1c u krvi ovisi o vremenu života eritrocita (prosječno 120 dana), te koncentraciji glukoze. S obzirom na to koliko je brzina nastanka hemoglobina A_1c izravno proporcionalna koncentraciji glukoze u krvi, koncentracija hemoglobina A_1c koristi se kao pokazatelj koncentracije glukoze kroz razdoblje od 8 do 12 tjedana.

1.2.7. Uloga određivanja hemoglobina A_1c u šećernoj bolesti

Hemoglobin A_1c se danas smatra „zlatnim standardom“ za dugoročnu kontrolu koncentracije glukoze, te optimizaciju i praćenje uspješnosti terapije šećerne bolesti. Određivanje koncentracije glukoze u plazmi nije dobar dugoročni pokazatelj kontrole glikemije zbog mnogih predanalitičkih varijacija. Koncentracija glukoze mijenja se iz sata u sat i pod značajnim je utjecajem tjelesne aktivnosti i unosa hrane prije uzorkovanja krvi. Značajan je problem u određivanju glukoze u plazmi velika nestabilnost, zbog čega je nužno uzorkovanje izvršiti na antikoagulans, koji blokira početne enzime puta glikolize, poput heksokinaze. Plazmu je potrebno što ranije odvojiti od stanica (17).

Na određivanje hemoglobina A_1c ne utječe prehrana niti tjelesna aktivnost, a sam analit je stabilan u uzorku pune krvi uzorkovane na antikoagulans K-EDTA (kalij-etilendiamintetraoctena kiselina) i do 14-21 dan na 2-8°C (18). Za određivanje hemoglobina A_1c dovoljan je jedan uzorak krvi uzorkovan u bilo koje doba dana i nije potrebna posebna priprema pacijenta prije uzorkovanja. Intraindividualna biološka varijabilnost hemoglobina A_1c iznosi tek 1,9% što odražava njegovu pouzdanost u dugoročnoj kontroli glikemije (19).

Tablica 4: Prednosti i nedostatci testova za dijagnozu šećerne bolesti (12)

PARAMETAR	PREDNOSTI	NEDOSTATCI
GUK natašte (FPG)	Standardizirana metoda	Nestabilan uzorak
	Brzo i jednostavno izvođenje	Visoka varijabilnost iz dana u dan
	Jednokratni uzorak	Nepraktična izvedba (natašte)
	Predikcija mikrovaskularnih komplikacija	Odražava trenutno stanje glikemije
GUK nakon 2h u OGTT s 75g glukoze	Standardizirana metoda	Nestabilan uzorak
	Predikcija mikrovaskularnih komplikacija	Visoka varijabilnost iz dana u dan
		Nepraktičan
		Potrebna suradnja pacijenta
Hemoglobin A_1c	Praktičan (uzorkovanje u bilo koje doba dana)	Cijena
	Jednokratni uzorak	Nepouzdan u različitim stanjima (npr. hemoglobinopatije, deficit željeza, hemolitična anemija, ozbiljna jetrena ili bubrežna bolest)
	Bolji prediktor mikrovaskularnih komplikacija od GUK-a natašte ili nakon 2h u OGTT testu	Promijenjen zbog dobi, etničke pripadnosti
	Niska varijabilnost iz dana u dan	Potrebna standardizirana i validirana metoda
	Odražava dugoročnu koncentraciju GUK-a	Nije za dijagnostiku šećerne bolesti kod djece, adolescenata, trudnica ili kod osoba sa sumnjom na šećernu bolest tip 1

Prema ADA smjernicama osobama oboljelima od šećerne bolesti preporuča se hemoglobin A_1c održavati <7% kako bi se smanjile mikrovaskularne komplikacije. Bolesnicima bez kardiovaskulanrih bolesti i novodijagnosticiranim bolesnicima hemoglobin A_1c održava se <6,5%. Ukoliko se kod bolesnika u anamnezi javljaju hipoglikemije, ciljne vrijednosti hemoglobina A_1c za praćenje terapije su <8,0%. Ciljna vrijednost hemoglobina A_1c kod djece i adolescenata je <7,0% jer je održavanje glikemije kod ove skupine puno veći izazov zbog većeg rizika hipoglikemije (20, 21, 22).

Kod dobro kontrolirane i regulirane terapije preporuča se dva puta godišnje odrediti hemoglobin A_1c, uz svakodnevnu kontrolu glukoze glukometrom. U slučaju promjene ili neregulirane terapije preporuka je odrediti hemoglobin A_1c i do tri puta godišnje. Velike kliničke studije poput Studije o kontroli i komplikacijama šećerne bolesti (engl. Diabetes Complications and Control Trial, DCCT) koja je uključivala ispitanike oboljele od šećerne bolesti tip 1 i Britanske prospektivne studije o šećernoj bolesti (engl. United Kingdom Prospective Diabetes Study, UKPDS) koja je uključivala ispitanike oboljele od šećerne bolesti tip 2 pokazale su kako normalne vrijednosti hemoglobina A_1c smanjuju rizik od razvoja

komplikacija šećerne bolesti poput moždanog i srčanog udara, neuropatije, retinopatije i nefropatije (20, 21).

Značajna prekretnica u dijagnostici šećerne bolesti dogodila se 2014. godine kada su ADA i CDA uvrstile hemoglobin $A_1c \geq 6,5\%$ u kriterije za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti tip 2. Od 2016. godine i WHO preporuča hemoglobin $A_1c \geq 6,5\%$ kao kriterij za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti tip 2. Za otkrivanje asimptomatskih bolesnika WHO preporuča testiranje i praćenje svih osoba s hemoglobinom $A_1c \geq 5,7\%$, posebice ukoliko su pretili ili im je dijagnosticiran preddijabetes (23). Za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti tipa 1 i šećerne bolesti u trudnoći još se uvijek preporučaju OGTT test i određivanje glukoze natašte (24).

Nedostatak hemoglobina A_1c je značajan utjecaj poluvijeka života eritrocita. Ukoliko se ertitrociti smanjeno stvaraju (poremećaj eritropoeze) ili je ubrzano njihovo uklanjanje iz cirkulacije (hemolitične anemije) hemoglobin A_1c će biti lažno snižen. Prisutnost hemoglobinskih varijanti (hemoglobin F, hemoglobin S, hemoglobin C, hemoglobin D, hemoglobin E i sl.), te poremećaja u sintezi hemoglobina (talasemije) utječu na nastanak hemoglobina A_1c u hiperglikemiji i mogu rezultirati nižim vrijednostima hemoglobina A_1c. Pacijenti s kroničnim zatajenjem bubrega i visokim koncentracijama ureje imaju značajan udio tzv. karbamiliranog hemoglobina koji nastaje vezanjem ureje na hemoglobin. Pojedine metode, posebice imunokemijske, mogu pokazati lažno veće vrijednosti hemoglobina A_1c. Vrijednosti hemoglobina A_1c variraju ovisno o etničkoj pripadnosti i dobi, primanju transfuzija krvi, splenektomiji i drugim kroničnim bolestima bubrega i jetre. Hemoglobin A_1c može se koristiti za praćenje kontrole glikacije kod ovih pacijenata, ali vrijednosti hemoglobina A_1c moraju se pratiti i interpretirati isključivo usporedbom s prethodnom vrijednošću, pošto su granične vrijednosti preporučene smjernicama teško primjenjive.

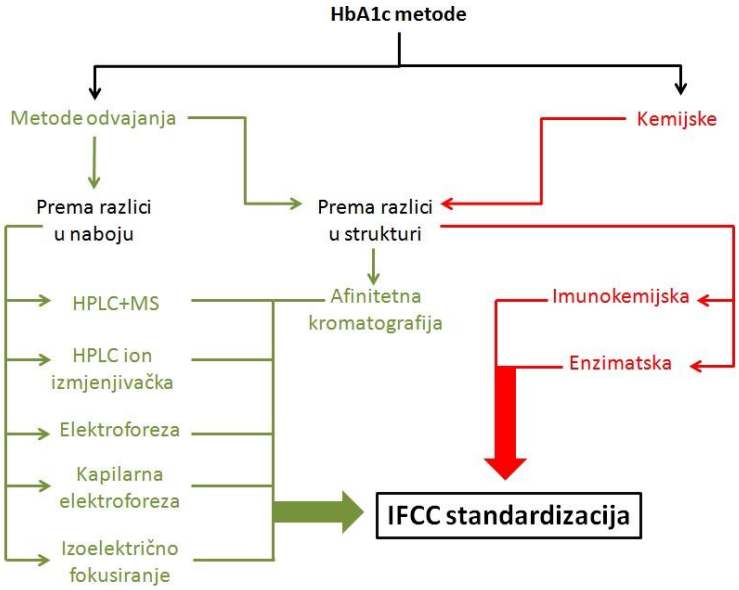
U tablici 5 prikazani su analitički i klinički izazovi u određivanju i interpretaciji hemoglobina A_1c.

Tablica 5: Analitički i klinički izazovi u određivanju i interpretaciji hemoglobina A_1c (25)
(HbA_1c=hemoglobin A_1c, ↑= povišene vrijednosti, ↓=snižene vrijednosti)

1. ERITROPOEZA	
↑HbA_1c	željezo, deficit vitamina B12, ↓eritropoeza
↓ HbA_1c	eritropoetin, željezo, vitamin B12, ↑retikulociti, kronične bolesti jetre
2. PROMIJENJEN HEMOGLOBIN	
↑ i ↓ HbA_1c	genetske i kemijske promjene hemoglobina, hemoglobinopatije, methemoglobin
3. GLIKACIJA HEMOGLOBIN	
↑HbA_1c	alkoholizam, kronična bubrežna zatajenja, ↓pH u eritrocitima
↓ HbA_1c	aspirin, vitamin C, vitamin E, hemoglobinopatije, ↑pH u eritrocitima
Varijabilni HbA_1c	genetske promjene
4. DESTRUKCIJA ERITROCITA	
↑HbA_1c	↑ poluživot eritrocita, splenektomija
↓ HbA_1c	↓ poluživot eritrocita, hemoglobinopatije, splenomegalija, lijekovi za reumatoidni artritis ili drugi lijekovi poput antiretrovirusnih lijekova (ribavirin, dapson)
5. METODE	
↑HbA_1c	↑bilirubin, karbamilirani Hb, alkohol, ↑ doze aspirina, kronično uzimanje opijata
↓HbA_1c	hemoglobinopatije

1.2.8. Standardizacija metoda za određivanje hemoglobina A_1c

Razlikujemo dva analitička pristupa određivanju koncentracije hemoglobina A_1c: jedan se temelji na odvajanju hemoglobinskih frakcija, a drugi na specifičnim kemijskim reakcijama s glikiranim N-terminalnim valinom na beta lancu hemoglobina (26). Metode određivanja hemoglobina A_1c prikazane su na slici 2.



Slika 2: Metode određivanja hemoglobina A_1c,

HPLC=visokotlačna tekućinska kromatrografija, MS=masena spektrometrija (osobna slika)

1. UVOD

Uvođenjem određivanja hemoglobina A_1c u rutinski rad uočene su značajne razlike u rezultatima dobivenim u različitim laboratorijima, zbog korištenja različitih metoda i naziva samoga analita. Izjednačavanje naziva i jedinica u kojima se analit izražava postao je globalni zadatak. Studije su pokazale kako se harmonizacija rezultata dobivenih određivanjem hemoglobina A_1c različitim metodama može postići korištenjem istih kalibratora (27). U Sjedinjenim Američkim Državama osnovan je Nacionalni program za standardizaciju glikiranog hemoglobina (engl. National Glycohemoglobin Standardization Program, NGSP), u Japanu je Japansko društvo za dijabetes (engl. Japanese Diabetes Society, JDS) razvilo jedinstvene kalibratore za sve metode u upotrebi. U Švedskoj je mono S metoda, ion-izmjenjivačka visokotlačna tekućinska kromatografija odabrana za referentnu metodu za hemoglobin A_1c.

Nacionalna je harmonizacija tek korak prema globalnoj harmonizaciji i s tim ciljem pristupilo se međunarodnoj standardizaciji koja uključuje jasnu definiciju analita temeljenu na molekularnoj strukturi, primarni referentni materijal koji sadrži čisti analit, validiranu referentnu metodu koja je specifična za analit u humanim uzorcima i globalnu mrežu laboratorija, koji garantiraju izvođenje referentne metode s odgovarajućom analitičkom kvalitetom i ostvaruju pouzdana mjerenja sekundarnim referentnim materijalima i kalibratorima.

Prema radnoj skupini IFCC dogovoren je jedinstven naziv analita hemoglobin A_1c - hemoglobin sa stabilno vezanom glukozom na aminokiselini valin na N-terminalnom kraju beta lanca. Primarni referentni materijal je smjesa čistoga hemoglobina A_1c i hemoglobina A_0. Referentna metoda za određivanje hemoglobina A_1c je visokotlačna kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom. Sva nacionalna društva uključena u IFCC prihvatila su referentnu metodu i uspostavljena je globalna mreža referentnih laboratorija. Treba naglasiti kako su rezultati mjerenja koncentracije hemoglobina A_1c dobivenih pomoću IFCC referentnih kalibratora niži od rezultata koji su dobiveni drugim kalibratorima koji nisu sljedivi prema IFCC jer su manje specifični (28).

IFCC certificirane primarne referentne kalibratore čini smjesa čistoga hemoglobina A_1c i hemoglobina A_0 dobivenih iz humanih uzoraka pomoću kation izmjenjivačke i afinitetne kromatografije i definirane pomoću kapilarnog izofokusiranja i elektrosprej ionizacijske masene spektrometrije. Referentnom metodom pomoću primarnih kalibratora određuje se hemoglobin A_1c u drugom humanom uzorku i vrijednosti dodjeljuju sekundarnim

kalibratorima. Sekundarni kalibratori služe proizvođačima analizatora za kalibraciju. IFCC referentni sustav danas je globalno prihvaćen (19).

Međunarodnim je koncenzusom dogovoreno kako se hemoglobin A_1c izražava u mmol molu ukupnoga hemoglobina. Međutim, pošto su sve smjernice temeljene na velikim kliničkim ispitivanjima temeljene na rezultatima hemoglobina A_1c izraženim u NGSP jedinicama (%), ustanovljena je korelacija između IFCC (mmol/mol) i NGSP (%) rezultata pomoću formule: NGSP = [0,09148 · IFCC] +2,152. Većina laboratorija i studija izražava vrijednosti hemoglobina A_1c i u IFCC i u NGSP jedinicama.

2. CILJ

Ciljevi ovoga rada su:

1. Procijeniti performanse uređaja Minicap Flex Piercing, Sebia, evaluacijom nepreciznosti, reproducibilnosti i netočnosti.
2. Utvrditi usporedivost određivanja hemoglobina A_1c kapilarnom elektroforezom na uređaju Minicap Flex Piercing, Sebia s metodom u upotrebi, turbidimetrijskom inhibicijskom imunokemijskom metodom (engl. Turbidimetric Inhibition Immunoassy, TINIA) na uređaju Dimension ExL, Siemens.
3. Provjeriti stabilnost hemoglobina A_1c nakon zamrzavanja uzoraka na -20°C.
4. Prikazati utjecaj hemoglobinopatija na određivanje hemoglobina A_1c kapilarnom elektroforezom i TINIA metodom

3. MATERIJALI I METODE

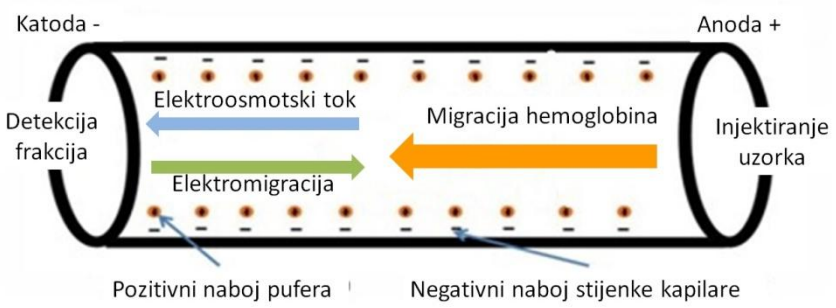
3.1. METODE

U ovome je radu koncentracija hemoglobina A_1c uspoređena na dva analizatora, Dimension ExL, Siemens i Minicap Flex Piercing, Sebia, koji koriste različite metode za kvantifikaciju hemoglobina A_1c (TINIA imunokemijsku metodu i metodu kapilarne elektroforeze).

Svi reagensi i potrošni materijal korišteni su prema uputama proizvođača. Tijekom postupka evaluacije korištena je ista kalibracijska krivulja i kontrolni materijal analiziran je zajedno s uzorcima ispitanika.

3.1.1. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna je elektroforeza metoda kojom se električki nabijene molekule razdvajaju ovisno o razlici u elektroforetskoj pokretljivosti koja je ovisna o naboju i veličini molekule, te pH otopine pufera. Prvi je korak analize osloboditi hemoglobin A_1c iz eritrocita postupkom hemolize s hemolizirajućom otopinom. Ovaj korak izvodi se automatizirano na analizatoru. Hemolizirani uzorak krvi injektira se u alkalnom puferu u silika kapilaru maloga promjera (25µm) na anodnom kraju i započinje separacija hemoglobina na stabilnoj temperaturi od 34°C pod djelovanjem visokog napona (~10000V). Zbog snažnog elektroosmotskog toka kationa alkalnog pufera, različiti oblici hemoglobina iz uzorka putuju prema negativno nabijenoj katodi i razdvajaju se zbog razlike u površinskom naboju. Na katodnom kraju kapilare detektiraju se hemoglobinske frakcije na valnoj duljini specifičnoj za apsorpciju hemoglobina (415nm). Nakon analize kapilara se automatski ispire otopinom za ispiranje i priprema za novu analizu. Minicap Flex Piercing uređaj ima dvije silika kapilare i istovremeno analizira dva uzorka. Direktna detekcija omogućuje točnu relativnu kvantifikaciju frakcije hemoglobin A_1c i adultnog hemoglobina A_0 (14).



Slika 3: Princip kapilarne elektroforeze (osobna slika)

3. MATERIJALI I METODE

3.1.2. TINIA

Turbidimetrijska inhibicijska imunokemijska metoda (engl. Turbidimetric Inhibition Immunoassy, TINIA), temelji se na spektrofotometrijskom određivanju ukupnoga adultnog hemoglobina A_0 i hemoglobin A_1c frakcije.

Uzorak pune krvi tretira se lizirajućim reagensom kako bi se oslobodio hemoglobin iz eritrocita. Ukupni hemoglobin se određuje spektrofotometrijski na dvije valne duljine, 405 i 700nm.

Dodatkom pufera s anti- hemoglobin A_1c antitijelima nastaju topivi imunokompleksi anti-hemoglobin A_1c antitijela i hemoglobina A_1c iz uzorka. U sljedećem reakcijskom koraku se dodaje polihapten reagens s različitim epitopima hemoglobina A_1c koji se vežu na suvišak anti- hemoglobin A_1c antitijela, te nastaju netopivi kompleksi koji se mjere turbidimetrijski na valjnoj duljini 340 nm. Količina hemoglobina A_1c u uzorku je obrnuto proporcionalna količini nastalih imunokompleksa. Koncentracija hemoglobina A_1c izražava se kao omjer hemoglobina A_1c i koncentracije ukupnoga hemoglobina i očitava se s kalibracijske krivulje.

3.2. ISPITANICI/UZORCI

Evaluacija je provedena u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Osijek, na Odjelu za alergološku i imunološku dijagnostiku od 30. 06. do 16. 08. 2017.g.

Za provjeru nepreciznosti i netočnosti rabljeni su komercijalni kontrolni uzorci hemoglobina A_1c u dvije koncentracijske razine, Sebia HbA_1c Control 1 lot: 22026 i Sebia HbA_1c Control 2 lot: 23026. Kontrolni uzorci su liofilizati dobiveni iz humanih uzoraka. Prema uputama proizvođača otopljeni su s 0,75 mL destilirane vode, homogenizirani laganim miješanjem, te stabilizirani 45 minuta na temperaturi 2-4°C. Odmah nakon korištenja kontrolni su uzorci zamrznuti na -20°C do sljedeće uporabe. Proizvođač potvrđuje stabilnost kontrolnih uzoraka tijekom trideset ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

Za provjeru nepreciznosti korišteni su i humani uzorci. Za pripremu mješavine humanoga uzorka kao kontrolnog materijala, korišteno je 9 uzoraka humane venske krvi uzorkovane na K-EDTA antikoagulans (BD Vacutainer Systems, Preanalitical Solutions, Plymouth, UK, ukupan volumen od 3mL). Pomiješana su 4 humana uzorka K-EDTA pune krvi s normalnim vrijednostima hemoglobina A_1c (34 do 38 mmol/mol) do ukupnoga volumena 9 mL, te 5 uzoraka K-EDTA pune krvi s visokim vrijednostima hemoglobina A_1c (90 do 94 mmol/mol) do ukupnoga volumena 15 mL. Tako pripremljen kontrolni materijal podijeljen je u tri

alikvota koji su zamrznuti na -20°C. Prije priprave mješavina određivanje hemoglobina A_1c u navedenim uzorcima provedeno je TINIA metodom na analizatoru Dimension ExL, Siemens, u sklopu kvantifikacije hemoglobina A_1c zatražene od strane liječnika.

Za procjenu usporedivosti metoda analizirano je 117 uzoraka pacijenata KBC Osijek kojima je određivanje hemoglobina A_1c zatraženo od strane liječnika. Korišten je uzorak svježe venske krvi uzorkovan na K-EDTA antikoagulans (BD Vacutainer). Uzorci su najprije analizirani na analizatoru Dimension ExL, Siemens, te potom unutar 2 dana na analizatoru Minicap Flex Piercing, Sebia. Uzorci su nakon mjerenja zamrznuti na -20°C.

3.3. POSTUPAK ISTRAŽIVANJA

3.3.1. Provjera nepreciznosti i netočnosti metode

Procjena nepreciznosti i netočnosti metode provedena je prema CLSI EP05-A2 protokolu (6). Korišteni su komercijalno dostupni kontrolni uzorci u dvije koncentracijske razine proizvođača Sebia, te mješavina humanih uzoraka u dvije koncentracijske razine. Svi kontrolni uzorci mjereni su u triplikatu tijekom 5 radnih dana. Iz dobivenih rezultata procijenjena je ponovljivost i reproducibilnost, te apsolutni bias kao mjera netočnosti metode.

Rezultati su interpretirani kako je navedeno u tablici 6 (29).

Tablica 6: Kriterij za apsolutni bias (netočnost) i nepreciznost

Znanstveni institut za javno zdravstvo (Scientific Intitute of Public Health, WIV-ISP) kriteriji za apsolutni bias i nepreciznost (2014. godina)

Parametar	Kriterij prihvatljivosti				
	Odličan	Dobar	Prihvatljiv	Slab	Neprihvatljiv
Kriterij za HbA_1c u NGSP jedinicama [%]					
Apsolutni bias	<0,2	0,20-0,30	0,31-0,40	0,41-0,50	>0,5
Nepreciznost (CV) [%]	<1,4	1,4-2,0	2,1-2,9	3,0-4,0	>4
Kriterij za HbA_1c u IFCC jedinicama [mmol/mol]					
Apsolutni bias	<2	2-3	3-4	4-5	>5
Nepreciznost (CV) [%]	<2	2,0-2,99	3,0-3,99	4,0-4,99	>5

CV, koeficijent varijacije; HbA_1c, hemoglobin A_1c; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry (Međunarodno udruženje za kliničku kemiju); NGSP, National Glycohemoglobin Standardization Program (Nacionalni program za standardizaciju glikiranog hemoglobina)

3.3.2. Provjera usporedivosti metoda

Za provjeru usporedivosti metode kapilarne elektroforeze i TINIA metode analizirano je 117 uzoraka K-EDTA pune krvi pacijenata (55% ženskih ispitanika). Uzorci su odabrani tako da pokrivaju cijeli koncentracijski raspon (od 27 mmol/mol (4,6%) do 138 mmol/mol (14,8%)).

3. MATERIJALI I METODE

Uzorci su analizirani najprije TINIA metodom, te potom unutar 2 dana, metodom kapilarne elektroforeze.

3.3.3. Utjecaj hemoglobinopatija na određivanje hemoglobina A_1c

Metodom kapilarne elektroforeze na uređaju Minicap Flex Piercing i TINIA metodom na uređaju Dimension ExL analizirani su K-EDTA uzorci pune venske krvi 3 pacijenta s hemoglobinskim varijantama. Kod dva pacijenta potvrđena je delta beta lepore talasemija , a kod jednoga pacijenta perzistentno povišen hemoglobin F. Prisutnost navedenih patoloških stanja potvrđen je programom analize hemoglobinopatije Hemoglobin(e) na uređaju Minicap, Sebia.

3.4. STATISTIKA

Za obradu podataka korišteni su Microsoft Office Excel 2007 i MedCalc® statistički software (MedCalc Statistical Software version 14.8.1 MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; http://www.medcalc.org; 2014). Pomoću Microsoft Office Excel 2007 programa obrađeni su podatci za određivanje analitičkih značajki uređaja (ponovljivost, reproducibilnost i netočnost) i uspoređeni s kriterijima prihvatljivosti. Testovi na normalnost razdiobe, korelacija, značajnosti razlika i usporedivosti metoda, te grafikoni izrađeni su pomoću MedCalc® statističkog programa.

Ponovljivost i reproducibilnost (nepreciznost iz dana u dan) ispitana je mjerenjima istih uzoraka niske i visoke koncentracijske razine. Izračunata je srednja vrijednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije.

Ukupna srednja vrijednost svih dana mjerenja izračunata je iz formule:

$$\bar{x}_{(svih\ dana)} = \frac{\bar{x}_{(1.dan)} + \bar{x}_{(2.dan)} + \bar{x}_{(3.dan)} + \bar{x}_{(4.dan)} + \bar{x}_{(5.dan)}}{5}$$

Ponovljivost izražena pomoću standardne devijacije izračunata je iz formule:

$$\mathrm{Sr} = \sqrt{\overline{SD}^2}$$

Ponovljivost izražena kroz koeficijent varijacije u postotku izračunata je iz formule:

$$\mathrm{KVr} = \frac{Sr}{\bar{x}_{(svih\ dana)}} \cdot 100$$

Reproducibilnost je izražena kao standardno odstupanje u mjerenju iz formule:

$$S_1 = \sqrt{\frac{N-1}{N}} \cdot Sr^2 + Sb^2$$ N = 3, broj ponavljanja u danu.

Reproducibilnost prikazana kroz koeficijent varijacije izračunata je iz formule:

$$KV = \frac{S_1}{\bar{\bar{x}}_{(svih\ dana)}} \cdot 100$$

Netočnost je izražena kao apsolutni bias

$$BIAS_{apsolutni} = x_i - x_{ciljno}$$

i relativni bias

$$BIAS_{relativni} = \left(\frac{x_i - x_{ciljno}}{x_{ciljno}}\right) \cdot 100$$

Ciljna srednja vrijednost hemoglobina A_1c u kontrolnom materijalu definirana je od strane proizvođača.

Rezultati usporedbe dvije metode testirani su na normalnost razdiobe Kolmogorov-Smirnovim testom. Za razinu značajnosti testa odabran je P>0,05.

Spearmanovim testom korelacije određena je jačina povezanosti rezultata (30).

Tablica 7: Kriteriji za procjenu jačine povezanosti

0,00-0,19	vrlo slaba
0,20-0,39	slaba
0,40-0,59	umjerena
0,60-0,79	jaka
0,80-1,00	vrlo jaka

Passing-Bablok regresijskom analizom provjerena je usporedivost dviju metoda. Rezultati Passing-Bablok regresijske analize interpretirani su kako je navedeno u tablici 8.

Tablica 8: Passing-Bablok regresijska analiza uz interval pouzdanosti od 95%

Interval odsječka regresijskog pravca	Ne obuhvaća 0	Postoji konstantna razlika u izmjerenim vrijednostima
Interval nagiba regresijskog pravca	Ne obuhvaća 1	Postoji proporcionalna razlika u izmjerenim vrijednostima

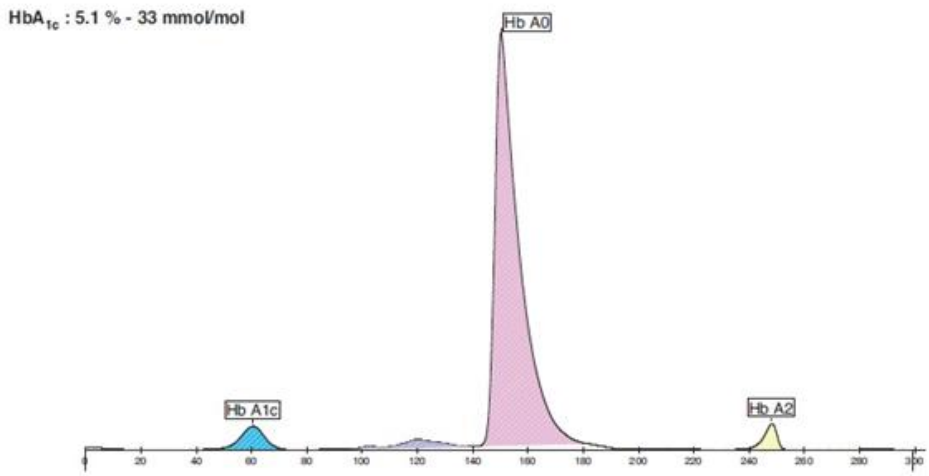
3. MATERIJALI I METODE

Razlike između dvije metode grafički su prikazane Bland-Altman točkastim dijagramom. Na os X nanosi se srednja vrijednost mjerenja istoga uzorka dvjema metodama, a na os Y razlike između vrijednosti ta dva mjerenja. Ukoliko se mjerenja nalaze unutar raspona ±1,96 SD, metode se smatraju podudarnima (30).

Rezultati analize dobiveni iz uzoraka pune krvi prije i nakon zamrzavanja na -20°C testirani su Kolmogorov-Smirnovim testom na normalnost razdiobe i uspoređeni su Wilcoxonovim testom parnih uzoraka. Statistički značajnim smatran je $P<0,05$.

4. REZULTATI

Elferogram prikazuje 3 vrška koji odgovaraju redom hemoglobinu A_1c, adultnom hemoglobinu A_0, te adultnom hemoglobinu A_2. (Slika 4)



Slika 4: Kapilarna elektroforeza (HbA_1c-hemoglobin A_1c, HbA_0-adultni hemoglobin A_0, HbA_2-adultni hemoglobin A_2) (31)

Vršci svih vrsta hemoglobina potpuno su odvojeni pri baznoj crti.

Ponovljivost i reproducibilnost određeni su analizom kontrolnih uzoraka i mješavinom humanih uzoraka K-EDTA venske krvi. Obje vrste kontrolnih materijala pripremljene su u dvije koncentracijske razine. Rezultati izraženi u IFCC (mmol/mol) i NGSP mjernim jedinicama (%) prikazani su u tablici 9.

Tablica 9: Ponovljivost i reproducibilnost na Minicap Flex Piercing, Sebia

Koeficijenti varijacije [%]	Mješavina humanog uzorka 1		CTRL 1		Mješavina humanog uzorka 2		CTRL 2	
	IFCC mmol/mol	NGSP %	IFCC mmol/mol	NGSP %	IFCC mmol/mol	NGSP %	IFCC mmol/mol	NGSP %
Koncentracija	36,4	5,5	34,0	5,3	91,5	10,5	66,0	8,2
Ponovljivost	3,01	1,76	1,88	1,21	1,29	0,92	1,78	1,43
Reproducibilnost	4,14	2,50	2,19	1,45	2,02	1,48	2,92	2,34

Rezultati ispitivanja netočnosti određeni analizom kontrolnih uzoraka i uzoraka mješavine humane K-EDTA venske krvi prikazana je u tablici 10. Rezultati su prikazani u IFCC (mmol/mol) i NGSP (%) mjernim jedinicama.

4. REZULTATI

Tablica 10: Procjena netočnosti analize kontrolnih uzoraka na Minicap Flex Piercing, Sebia i Dimension® ExL, Siemens

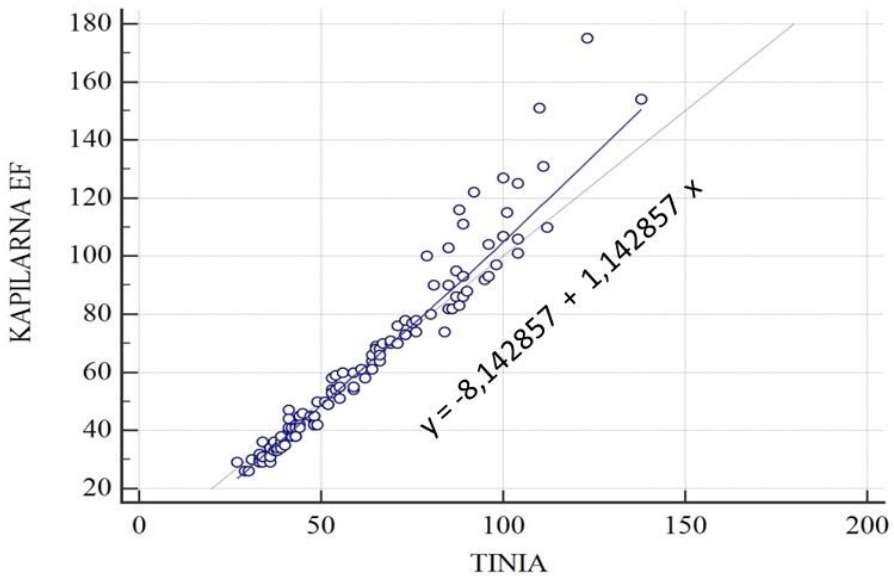
		Bias apsolutni	Bias relativni [%]
Minicap Flex Piercing, Sebia	CTRL 1 %	-0,06	-1,13
	CTRL 1 mmol/mol	-0,33	-0,98
	CTRL 2 %	-0,11	-1,38
	CTRL 2 mmol/mol	-1,13	-1,72
	Mješavina humanog uzorka 1 %	-0,02	-0,36
	Mješavina humanog uzorka 1 mmol/mol	0,00	0,001
	Mješavina humanog uzorka 2 %	0,03	0,25
	Mješavina humanog uzorka 2 mmol/mol	0,03	0,04
Dimension® ExL Siemens	CTRL 1 %	-0,01	-0,10
	CTRL 1 mmol/mol	0,73	1,47
	CTRL 2 %	0,17	1,87
	CTRL 2 mmol/mol	2,02	2,60

U ispitivanju usporedbe kapilarne elektroforeze i TINIA metode 37% analiziranih uzoraka imalo je normalnu vrijednost hemoglobina A_1c (<42 mmol/mol, <6%), 43% uzoraka imalo je umjereno povišenu vrijednost hemoglobina A_1c (42-80 mmol/mol, 6-9,5%), a 26% uzoraka imalo je visoku vrijednost hemoglobina A_1c (>80 mmol/mol, >9,5%). Najniža koncentracija hemoglobina A_1c izmjerena kapilarnom elektroforezom je 26 mmol/mol (4,5%), a najviša 175 mmol/mol (18,1%). Najniža koncentracija hemoglobina A_1c izmjerena TINIA metodom je 27 mmol/mol (4,6%), dok je najviša izmjerena vrijednsot hemoglobina A_1c 138 mmol/mol (14,8%).

Rezultati Kolmogorov-Smirnov testa pokazali su kako podatci dobiveni TINIA metodom i metodom kapilarne elektroforeze ne prate normalnu razdiobu, te je za testiranje povezanosti rezultata korišten Spearmanov koeficijent korelacije, koji pokazuje povezanost od 0,987 (0,981-0,991).

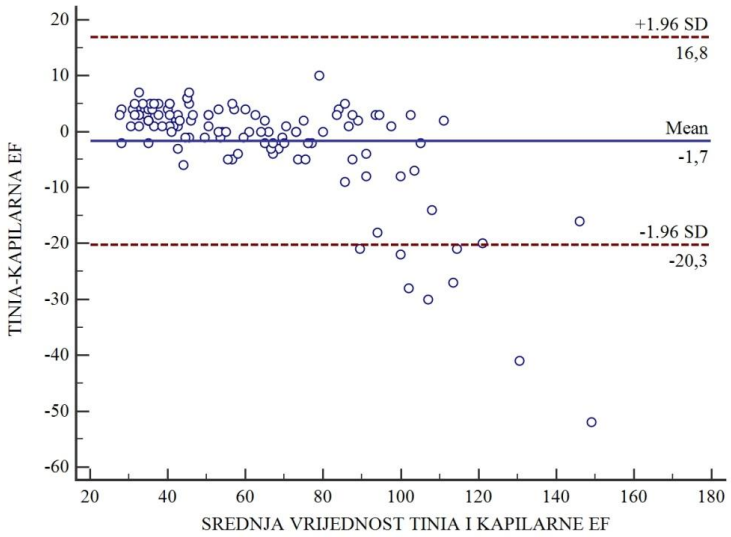
Passing-Bablok regresijska analiza rezultata mjerenja dobivenih TINIA metodom i metodom kapilarne elektroforeze pokazuje kako između dvije metode postoji konstantna i proporcionalna pogreška (nagib pravca 1,14 (od 1,09 do 1,19), odsječak 8,14 (od -10,54 do -5,81)). TINIA metodom mjere se niže vrijednosti hemoglobina A_1c, posebno u području većih vrijednosti.

Rezultat Cusum testa pokazuje kako nema značajnijeg odstupanja od linearnosti (P=0,60).



Slika 5: Grafikon Passing-Bablok regresijske analize

Na grafikonu Bland-Altman analize normalni i umjereno visoki rezultati grupirani su unutar dvije standardne devijacije. Mjerenja izrazito visokih koncentracija, preko 80 mmol/mol, rasipaju se znatno izvan prihvatljivoga raspona. Srednja razlika između dva mjerenja hemoglobina A_1c je -1,7±9,28 mmol/mol (-2±3%) iz čega je vidljivo kako TINIA metoda prosječno daje niže vrijednosti hemoglobina A_1c od metode kapilarne elektroforeze. Iz Bland-Altman prikaza također je vidljivo kako varijaciji srednje razlike od ±9,28 mmol/mol (±3%) najznačajnije doprinose visoke vrijednosti hemoglobina A_1c.

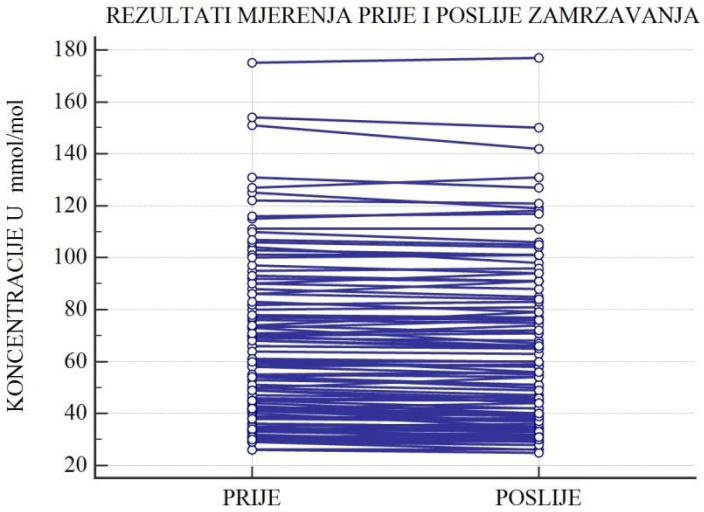


Slika 6: Bland-Altman grafikon

4. REZULTATI

Rezultat Kolmogorov-Smirnov testa na normalnost razdiobe rezultata kapilarne elektroforeze uzoraka nakon odmrzavanja pokazuje kako raspodjela ne prati normalnu razdiobu ($p<0,001$). Prethodno je utvrđeno kako niti rezultati mjerenja svježih uzoraka ne prate normalnu razdiobu ($p<0,001$).

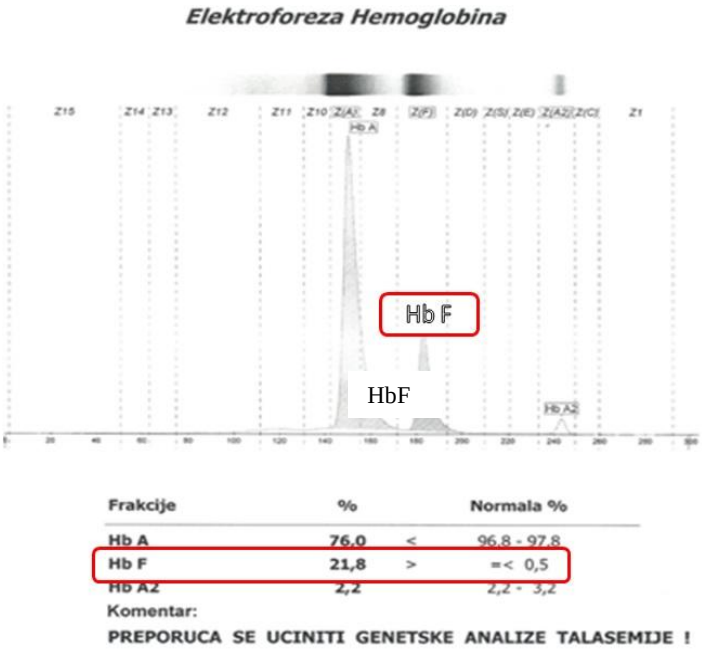
Važnost razlike rezultata dobivenih kapilarnom elektroforezom iz svježih uzoraka i nakon zamrzavanja na -20°C ispitana je Wilcoxonovim testom parnih uzoraka. Rezultati testa pokazuju kako su tek u 9% (10 od 113) mjerenja prije i nakon odmrzavanja analizom dobiveni identični rezultati, dok je u 64% (72 od 113) mjerenja vrijednost hemoglobina A_1c nakon odmrzavanja bila niža u odnosu na vrijednost izmjerenu prije zamrzavanja. U 23% mjerenja razlika u mjerenju prije i poslije zamrzavanja je veća od klinički značajne razlike od 3 mmol/mol. Veličina razlike mjerenja raste s porastom koncentracije hemoglobina A_1c. Rezultat Wilcoxonovog testa pokazao je kako postoji statistički značajna razlika u vrijednosti hemoglobina A_1c prije i nakon zamrzavanja uzorka na -20°C ($p<0,001$).



Slika 7: Grafički prikaz Wilcoxonovog, testa važnosti razlike rezultata dobivenih prije i nakon zamrzavanja (-20°C)

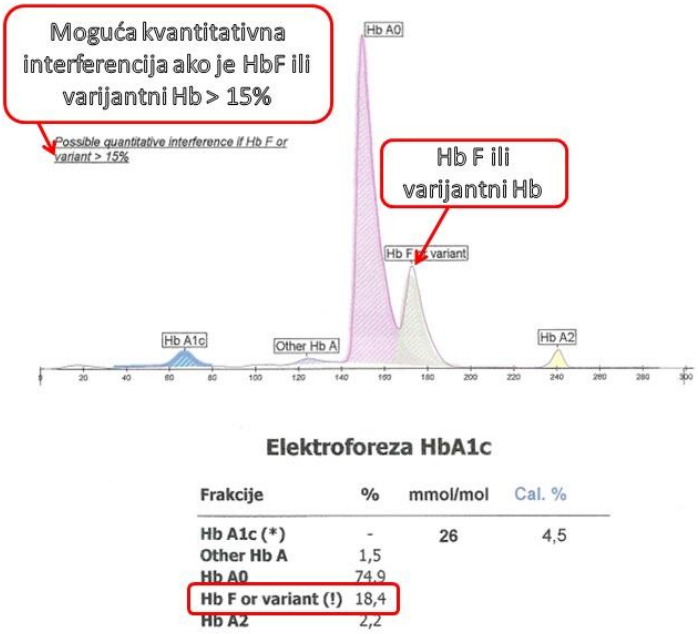
Zbog prikaza utjecaja varijanti hemoglobina analizirana su tri uzorka pacijenata koji boluju od urođeno povišenoga hemoglobina F i delta beta lepore talasemije.

Prikaz slučaja 1:



Slika 8: Frakcija hemoglobina F (HbF) na elferogramu

Kapilarnom elektroforezom hemoglobina utvrđen je hemoglobin F četiri puta viši od normalnoga. Pacijentica je odrasla ženska osoba. Iz istoga uzorka određen je hemoglobin A_1c TINIA metodom i rezultat je 29mmol/mol (4,8%).

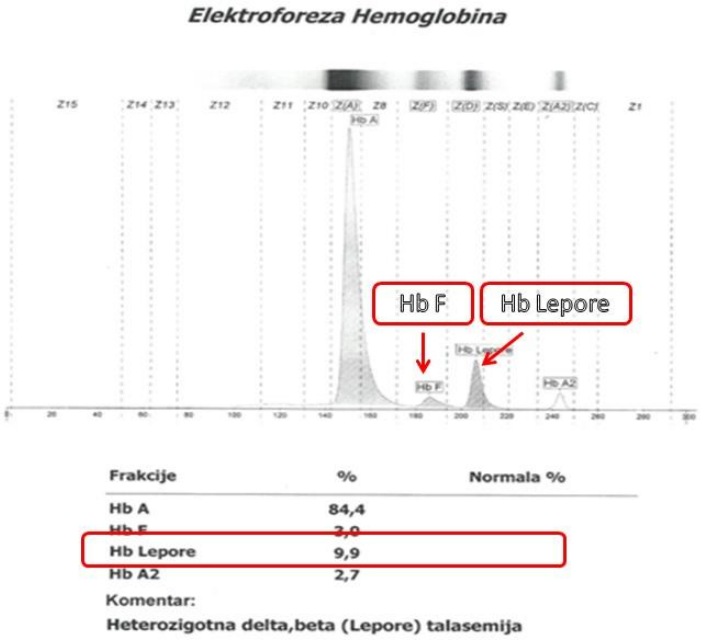


Slika 9: HbF ili varijantni hemoglobin na elferogramu

Kapilarnom elektroforezom u istom uzorku izmjeren je niži hemoglobin A_1c 26 mmol/mol (4,6%) jer imunoturbidimetrijskom metodom se ne može razlučiti glikirani hemoglobin gama lanaca prisutan u hemoglobinu F od glikiranog hemoglobina A_1c. Na elferogramu se prikazuje vršak s napomenom o mogućoj interferenciji ako je koncentracija varijantnog ili F hemoglobina veća od 15%. Ako se prilikom određivanja hemoglobina A_1c uoči takav vršak, pacijentu se može preporučiti učiniti elektroforezu hemoglobina, zbog sumnje na talasemiju.

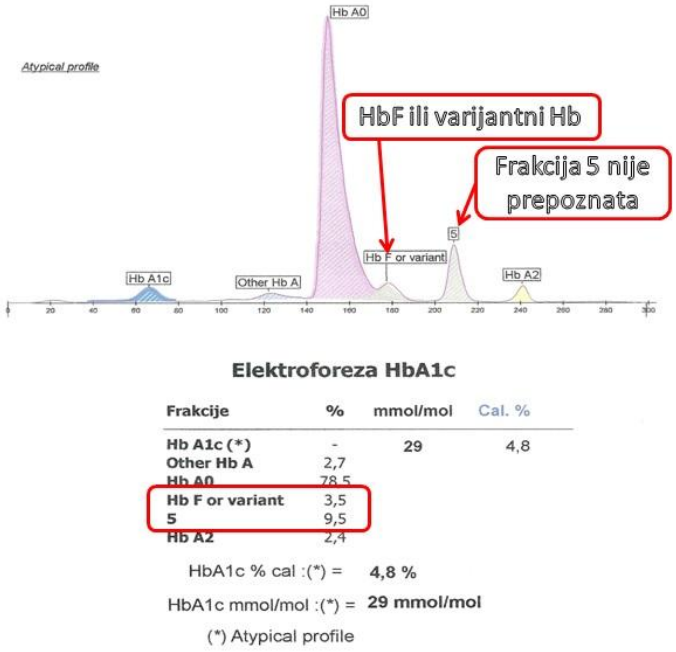
4. REZULTATI

Prikaz slučaja 2:



Slika 10: hemoglobin lepore i HbF na elferogramu

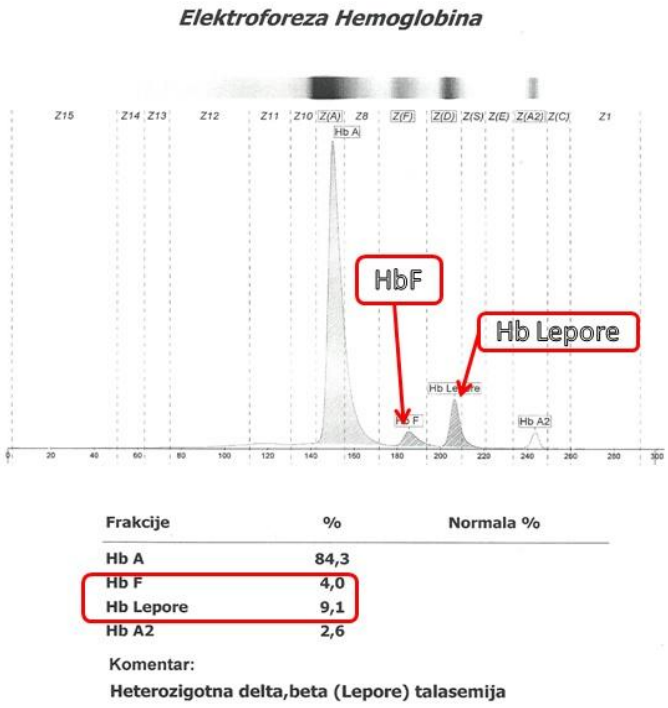
Kapilarnom elektroforezom hemoglobina utvrđena je heterozigotna delta beta lepore talasemija kod djeteta staroga osam godina. Iz istoga uzorka određen je hemoglobin A_1c TINIA metodom i rezultat je 34,4 mmol/mol (5,3%).



Slika 11: Hb lepore i HbF na elferogramu

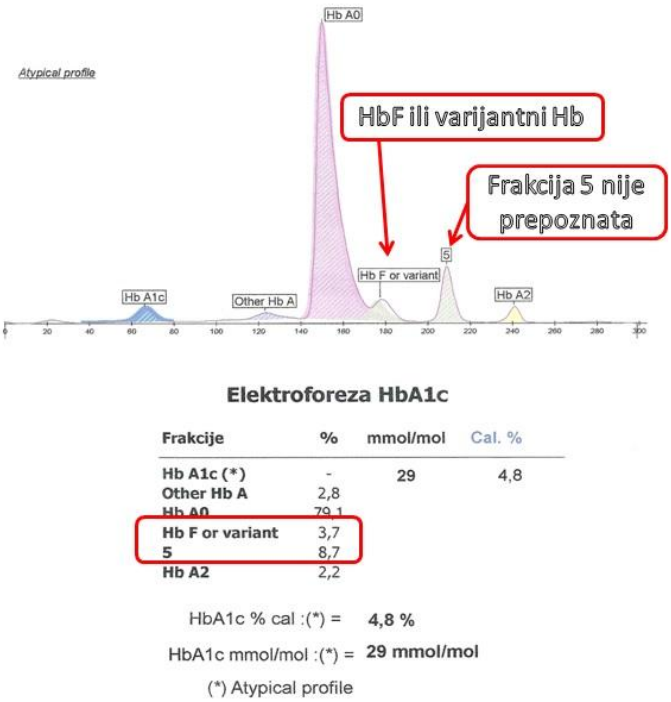
Kapilarnom elektroforezom iz istoga je uzorka izmjeren hemoglobin A_1c i dobiven rezultat 29 mmol/mol (4,8%). Rezultat je niži od rezultata TINIA metodom jer glikirane lance prisutne u lepore hemoglobinu imunoturbidimetrijski se ne može razlikovati od glikiranih lanaca u hemoglobinu A_1c. Kapilarnom elektroforezom na elferogramu se pojavljuje vršak s oznakom varijantnoga oblika hemoglobina ili hemoglobina F i frakcija označena brojem 5 jer je neprepoznata, a radi se o lepore hemoglobinu kako je potvrđeno elektroforezom hemoglobina. Pacijentu se, dakle, temeljem ovih opažanja može preporučiti testiranje na talasemije.

Prikaz slučaja 3:



Slika 12: Hb lepore i HbF na elferogramu

Također se radi o heterozigotnoj delta beta lepore talasemiji kod djeteta od četiri godine. Iz istoga je uzorka određen hemoglobin A_1c TINIA metodom i rezultat je 35,5 mmol/mol (5,4%).



Slika 13: Hb lepore i HbF na elferogramu

Kapilarnom elektroforezom je određen hemoglobin A_1c i dobiven niži rezultat od TINIA metode, 29 mmol/mol (4,8%).

5. RASPRAVA

Zbog rastuće prevalencije šećerne bolesti stroga kontrola i praćenje terapije oboljelih pacijenata postaje neophodno. Strategija terapije i odgađanje razvoja dugoročnih komplikacija šećerne bolesti, ovisi o točnom i preciznome mjerenju hemoglobina A_1c. Danas je ovaj biljeg uvršten i u smjernice za dijagnozu i praćenje šećerne bolesti, te je kriterij dopuštene varijacije postavljen na strogih 2% (3 mmol/mol). Nekoliko studija pokazalo je kako mjerenje hemoglobina A_1c može biti pod utjecajem intraindividualne biološke varijacije, dobi i načina života (32, 33, 34). Ovakvi utjecaji na kvalitetu praćenja terapije zahtijevaju da metode kojom se određuje hemoglobin A_1c ima visoku reproducibilnost i točnost. Rezultat kvantifikacije hemoglobina A_1c mora odražavati promjene u stupnju glikacije i odgovoru na terapiju, a ne biti rezultat analitičke netočnosti i nepreciznosti.

Trenutno se u kliničkim laboratorijima rabe različite tehnike za kvantifikaciju hemoglobina A_1c, među kojima su najzastupljenije imunokemijske i tekućinske kromatografije. Imunokemijske metode teško zadovoljavaju stroge analitičke kriterije i podložne su raznim interferencijama, dok metode tekućinske kromatografije zahtijevaju kompleksnu pripremu uzorka i nisu značajno robusne. Kapilarna je elektroforeza široko primjenjena metoda u kliničkim laboratorijima, posebno u elektroforezi proteina seruma i detekciji hemoglobinopatija. Prije smo desetak godina kapilarna elektroforeza spregnuta s tekućinskom kromatografijom rabljena je kao IFCC referentna metoda za kvantifikaciju hemoglobina A_1c. Međutim, zbog već navedenih problema tekućinske kromatografije, ova metoda nije saživjela u svakodnevnom rutinskome radu kliničkog laboratorija. Prije tri godine tvrtka Sebia (Lisses, Francuska) razvila je analizator Minicap Flex Piercing i omogućila jednostavnu uporabu sofisticirane tehnologije kapilarne elektroforeze u kvantifikaciji hemoglobina A_1c u svakodnevnome rutinskom radu laboratorija.

U ovom radu prikazani su rezultati laboratorijske evaluacije analitičkih performansi analizatora Minicap Flex Piercing.

Mjerenje netočnosti i nepreciznosti neophodno je u evaluaciji prihvatljivosti performansi analizatora za određivanje hemoglobina A_1c. Brojne kliničke studije pokazale su kako i vrlo male promjene hemoglobina A_1c (čak za smo 1%) značajno utječu na procjenu rizika od mikrovaskularnih komplikacija. Koeficijent varijacije izražen je i u NGSP (%) i u preporučenim IFCC (mmol/mol) mjernim jedinicama. Koeficijent varijacije za IFCC jedinice veći je od koeficijenta varijacije za NGSP jedinice. Ta razlika rezultat je nespecifičnosti

NGSP referentne metode (32). Prema WIV-ISP kriterijima ukupna laboratorijska nepreciznost izražena u NGSP jedinicama zadovoljava dobre i prihvatljive kriterije, te dobre kriterije izražene u IFCC jedinicama. Također, evaluirana metoda zadovoljava i kriterije Nacionalne akademije kliničke biokemije (engl. National Academy of Clinical Biochemistry, NACB) i ADA kriterije reproducibilnosti (<2%, odnosno 3mmol/mol). Jedino je koeficijent varijacije u visokom mjernom području izražen u NGSP jedinicama blago viši od kriterija (2,34%). Ovi rezultati su u skladu s literaturnim podatcima (32, 33, 34, 35), a čak i bolji od rezultata koje je prezentirao sam proizvođač (33). Prema laboratorijskoj evaluaciji imunokemijska metoda na Dimension ExL, Siemens zadovoljava prihvatljive kriterije prema WIV-ISP, dok zbog koeficijenta varijacije većega od 2% (3 mmol/mol) u obje koncentracijske razine i za IFCC i za NGSP jedinice, ova imunokemijska metoda ne zadovoljava stroge NACB/ADA kriterije. Međutim, zbog podložnosti interferencijama imunokemijskih metoda, ovakvi rezultati su i literaturno opisni. Koeficijent varijacije za različite imunokemijske metode je od 3,6% do potpuno neprihvatljivih 7,7% (34). Rezultati evaluacije ponovljivosti i reproducibilnosti kvantifikacije hemoglobina A_1c na analizatoru Minicap Flex Piercing kapilarnom elektroforezom pokazuju superiorne performanse u odnosu na trenutno korištenu metodu.

Performanse ponovljivosti i reproducibilnosti evaluirane su i na uzorku mješavine pripravljene spajanjem više uzoraka humane, pune krvi uzorkovane na K-EDTA antikoagulans. Velika studija usporedbe referentnih metoda i kalibracijskih materijala potvrdila je prednost ovakvoga pristupa jer je utjecaj biološke varijacije na kvalitetu analize značajno smanjen uporabom mješavine uzoraka različitih ispitanika u odnosu na uzorak dobiven od jednoga ispitanika (35). Korištenjem mješavine humanih uzoraka dobiveni su rezultati ukupne laboratorijske nepreciznosti za NGSP jedinice koji zadovoljavaju dobre i prihvatljive kriterije prema WIV-ISP, dok su kriteriji za nisku koncentracijsku razinu izraženi u IFCC jedinicama veći od granične vrijednosti za vrlo slabe performanse ponovljivosti i reproducibilnosti. Razlog tome je uočeno kontinuirano propadanje hemoglobina A_1c iz dana u dan u uzorku mješavine pohranjene na -20°C. Jasno je kako će se smanjenje koncentracije analita u uzorku značajnije odraziti na netočnost i ponovljivost mjerenja niske koncentracije hemoglobina A_1c. Iako je i kontrolni materijal tvrtke Sebia pripravak mješavine uzoraka pune krvi različitih ispitanika uzorkovane na antikoagulans K-EDTA, propadanje analita u ovim uzorcima nije uočeno. Razlog tome su dodani stabilizatori i konzervansi koji održavaju stabilnost hemoglobina A_1c i nakon višestrukoga zamrzavanja i odmrzavanja (33). Ovo su prvi literaturni rezultati koji potvrđuju kako se mješavina humanih uzoraka K-EDTA-pune

krvi zamrznuta na -20°C ne može adekvatno koristiti kao kontrolni materijal. Daljnjim istraživanjima potrebno je dokazati je li skladištenje takvoga kontrolnog materijala pogodnije na -70°C.

Analizom kontrolnoga materijala proizvođača Sebia dobiven je srednji apsolutni bias od -0,06% (-0,33 mmol/mol) pri koncentraciji od 5,3% (34 mmol/mol), te -0,11% (-1,13 mmol/mol) na koncentraciju hemoglobina A_1c od 8,2% (66 mmol/mol). Analizom mješavine humanih uzoraka dobiven je srednji apsolutni bias od -0,02% (0 mmol/mol) za koncentraciju od 5,5% (36,4 mmol/mol), te 0,03% (0,03 mmol/mol) za koncentraciju hemoglobina A_1c od 10,5% (91,5 mmol/mol). U mješavini humanih uzoraka kao ciljna vrijednost uzeta je srednja vrijednost mjerenja i ovakav materijal se ne može koristiti za procjenu netočnosti.

Netočnost metode kapilarne elektroforeze prihvatljiva je za praćenje glikemijskoga statusa i postavljanje dijagnoze šećerne bolesti. Srednja vrijednost apsolutnog bias za obje analizirane koncentracijske razine manja je od klinički značajne promjene prema NACB/ADA kriterijima (2%, odnosno 3 mmol/mol). Osim toga, srednja vrijednost apsolutnog biasa manja je od vrlo strogoga kriterija NICE (engl. National institute for health and care excellence) smjernica od 0,5%.

Evaluacija TINIA metode provedena u laboratoriju na analizatoru Dimension ExL također pokazuje zadovoljavajuću netočnost. S obzirom kako su komercijalni kontrolni materijali za obje metode pripremljeni iz uzoraka pune krvi zdravih dobrovoljaca i dobrovoljaca oboljelih od šećerne bolesti, treba naglasiti kako se rezultati netočnosti odnose na uzorke bez prisutnih hemoglobinskih varijanti. Marinova i suradnici dobili su u svojem istraživanju na analizatoru Minicap Flex Piercing identične rezultate procjene netočnosti u uzorku bez hemoglobina F i manje od 4% hemoglobina A_2 koji su zadovoljili i strogi kriterij od 0,5% dozvoljene razlike između dva mjerenja. Međutim, u kontrolnim uzorcima s dodanim hemoglobinom F i A_2 i bias je veći iako zadovoljava NACB/ADA kriterije od 2% dozvoljene razlike između dva mjerenja (36).

Ispitivanje usporedivosti metoda na Minicap Flex Piercing i Dimension ExL pokazalo je izvrsnu korelaciju dviju metoda (r=0,987). Međutim, bez obzira na odličnu korelaciju metoda, Passing-Bablok regresijska analiza pokazala je kako između dvije metode postoji i konstantno i proporcionalno odstupanje. TINIA metoda na analizatoru Dimension ExL rezultira za 8,14 mmol/mol nižim rezultatima hemoglobina A_1c u odnosu na metodu kapilarne elektroforeze. Pošto je klinički kriterij razlike između dva mjerenja 3 mmol/mol, jasno je kako je ova

konstantna pogreška klinički značajna. Posebno značajno odstupanje između dvije metode može se uočiti u području visokih vrijednosti hemoglobina A_1c (>80 mmol/mol). Razlog tome je razlika u kalibracijskom materijalu i značajniji utjecaj interferencije drugih oblika glikiranih hemoglobina (acetilirani, karbamilirani, labilni, varijantni hemoglobin) koje je metodom kapilarne elektroforeze moguće odvojiti od hemoglobina A_1c. Minicap Flex Piercing koristi kalibratore sljedive do IFCC referentnoga materijala i certificiran je prema IFCC i NGSP. TINIA metoda na Dimension ExL analizatoru certificirana je prema NGSP tek od listopada 2017. godine (35) i kalibratori su sljedivi smo prema DCCT referentnom materijalu. Literatura pokazuje kako između NGSP i IFCC referentne metode postoji konstantna razlika (36). Ovakva klinički značajna razlika između dvije metode onemogućuje istovremenu uporabu dvije metode. Pacijenta je nužno pratiti uvijek istom metodom, u istom laboratoriju. S obzirom na bolje analitičke performanse metoda kapilarne elektroforeze na Minicap Flex Piercing analizatoru ima prednost uporabe u kvantifikaciji hemoglobina A_1c u dijagnostici i praćenju šećerne bolesti.

U ovom je radu ispitana stabilnost uzorka pune krvi pohranjene na -20°C. Iako je uzorak pune krvi za određivanje hemoglobina A_1c stabilan na 2-8°C do 7 dana (32), dugoročno skladištenje uzoraka često je potrebno. Uzorci se u laboratorij često dostavljaju organiziranim prijevozom, a analizu ponekad nije moguće izvršiti unutar 7 dana, zbog redovnoga godišnjega održavanja analizatora ili mogućega kvara. U takvim je situacijama bitno poznavati stabilnost uzorka nakon zamrzavanja. Proizvođač ne preporuča pohranjivanje na -20°C, već na -70°C. Pošto većina laboratorija koristi zamrzivače od -20°C, za kvalitetno dugoročno skladištenje uzoraka važno je provjeriti stabilnost hemoglobina A_1c u takvim uvjetima. 64% uzoraka ima niže vrijednosti hemoglobina A_1c nakon odmrzavanja, a čak 20% uzoraka ima vrijednosti hemoglobina A_1c nakon odmrzavanja za 3-9 mmol/mol niže što je klinički značajna razlika i može utjecati na kvalitetu praćenja glikemijskog statusa i terapije. Rezultati ispitivanja stabilnosti uzorka pune krvi na -20°C pokazuje kako se za praćenje terapije i postavljanje dijagnoze šećerne bolesti ne mogu koristiti uzorci zamrznuti na -20°C. Više literaturnih izvora potvrđuje zadovoljavajuću usporedivost vrijednosti hemoglobina A_1c i klinički zanemariv bias ako se uzorci skladište na -70°C (37, 38), a isto potvrđuje i sam proizvođač.

Zbog važne uloge hemoglobina A_1c u dijagnostici i praćenju šećerne bolesti, neophodno je prepoznati moguće interferencije koje mogu utjecati na netočnost analize. Iako je incidencija hemoglobinopatija (prisutnost hemoglobina S, C, D, E) i talasemija mala, prisutnost ovakvih varijanti hemoglobina značajno utječe na kvalitetu analize. Posebno je značajno prepoznati

delta beta varijantu lepore hemoglobina jer se beta lepore talasemija endemično javlja u području Mediterana. Mnoge metode koje se rutinski rabe u kvantifikaciji hemoglobina A_1c podložne su interferencijama hemoglobinskih varijanti. U ovome radu prikazali smo primjere utjecaja hemoglobinskih varijanti na netočnost kvantifikacije hemoglobina A_1c u tri slučaja: slučaj povišenog hemoglobina F i dva slučaja delta beta lepore talasemije. Koncentracija hemoglobina F i A_2 određena je i preporučenom metodom kapilarne elektroforeze pomoću programa za potvrdu hemoglobinopatija i talasemija. Iz oba prikazana primjera vidljivo je kako su vrijednosti hemoglobina A_1c određene imunokemijskom TINIA metodom veće od vrijednosti određenih kapilarnom elektroforezom. Naime, metoda kapilarne elektroforeze prepoznaje i potpuno odvaja hemoglobin A_1c i hemoglobin A_0 od hemoglobina A_2 i hemoglobina F. Uređaj Dimension ExL nema tu mogućnost i u koncentraciju ukupnoga adultnog hemoglobina (HbA) ubraja i povišene koncentracije hemoglobina F i hemoglobina A_0. Klinički značajan utjecaj (>3 mmol/mol) na netočnost imunokemijske metode vidljiv je u slučaju prisutnosti lepore hemoglobina. Iako je u radu analiziran mali broj uzoraka s varijantama hemoglobina, literaturno je dobro opisno kako metoda kapilarne elektroforeze, za razliku od imunokemijskih, pa čak i nekih HPLC metoda, ne podliježe interferencijama varijanti hemoglobina (37, 38, 39, 40). Dodatna vrijednost analizatora Minicap Flex Piercing je i mogućnost probira na prisutnost hemoglobinopatija i talasemija (37). Pacijente s uočenim varijantama hemoglobina tijekom analize hemoglobina A_1c moguće je usmjeriti na potvrdne analize navedenih patoloških stanja.

Dodatne su prednosti rada na analizatoru Minicap Flex Piercing te, što ne zahtijeva pripremu hemolizata uzorka pune krvi, već se hemolizat priprema automatski na analizatoru. Na analizator se postavljaju primarni uzorci koje analizator miješa prije analize. Za analizator Dimension ExL potrebno je ručno promiješati uzorak i preliti ga iz primarne u sekundarnu epruvetu iz koje se vrši analiza. Dnevno i tjedno održavanje zadaje se i odvija automatizirano. Programsko sučelje Minicap Flex Piercing analizatora omogućuje pregled tijeka analize, a elferogram se izrađuje u realnom vremenu tijekom separacije hemoglobina. Normalni profil hemoglobina A_1c prikazuje se kao elferogram plave boje, narančasto i ljubičasto prikazani elferogrami predstavljaju upozorenje na prisutnost varijanti hemoglobina ili na povišeni hemoglobin A_1c. Uređaj izvodi analizu istovremeno u dvije kapilare, te u jednom satu analizira osam uzoraka.

5. RASPRAVA

Temeljem navedenoga vidljivo je kako performanse kapilarne elektroforeze na uređaju Minicap Flex Piercing, Sebia zadovoljavaju potrebe svakodnevne analize hemoglobina A_1c u kliničkom laboratoriju.

6. ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

1. Kvantifikacija hemoglobina A_1c kapilarnom elektroforezom na uređaju Minicap Flex Piercing, Sebia pokazuje bolje analitičke performanse nego trenutno korištena metoda na uređaju Dimension ExL, Siemens što potvrđuju rezultati evaluacije netočnosti i nepreciznosti.
2. Usporedbom dviju metoda uočeno je kako postoji klinički značajna razlika između dvije metode, te se obje ne mogu istovremeno koristiti.
3. Ispitivanje stabilnosti uzorka pokazalo je kako je najkvalitetnije mjerenje hemoglobina A_1c iz svježega uzorka pune venske krvi uzorkovane na K-EDTA. Ne preporuča se skladištenje uzoraka pune krvi na -20°C zbog značajno nižih vrijednosti hemoglobina A_1c nakon odmrzavanja.
4. Metodom kapilarne elektroforeze sa sigurnošću se može kvantificirati hemoglobin A_1c jer drugi oblici hemoglobina ne interferiraju s mjerenjem. Određivanje hemoglobina A_1c istovremeno može poslužiti kao test probira na moguću prisutnost hemoglobinopatija i talasemija.
5. Metoda kapilarne elektroforeze na uređaju Minicap Flex Piercing, Sebia zadovoljava stroge kliničke kriterije nepreciznosti i netočnosti što je čini pogodnom za kvantifikaciju hemoglobina A_1c u svrhu postavljanja dijagnoze šećerne bolesti i praćenja terapije i praćenja statusa glikemije.

7. SAŽETAK

Hemoglobin A_1c vodeći je biljeg glikemijske kontrole. Određivanje njegove koncentracije od velike je važnosti za dijagnozu, praćenje terapije i tijeka šećerne bolesti. Prikazani su rezultati evaluacije performansi uređaja Minicap Flex Piercing, Sebia prema CLSI EP05-A2 protokolu zbog uvođenja kapilarne elektroforeze za određivanje hemoglobina A_1c u rutinski rad.

Za provjeru nepreciznosti i netočnosti metode korišteni su komercijalni kontrolni uzorci i mješavina humanih uzoraka pacijenata u dvije koncentracijske razine, u triplikatu tijekom pet dana. Za procjenu usporedivosti s metodom u uporabi (TINIA, na analizatoru Dimension ExL, Siemens) korišteno je 117 uzoraka pacijenata KBC Osijek, venska krv uzorkovana na K-EDTA antikoagulans. Stabilnost uzoraka ispitana je usporedbom rezultata dobivenih kapilarnom elektroforezom iz 113 uzoraka prije i nakon zamrzavanja.

Rezultati su izraženi u IFCC (mmol/mol) i NGSP (%) jedinicama. Kapilarna elektroforeza na uređaju Minicap Flex Piercing, Sebia, zadovoljava stroge kliničke kriterije nepreciznosti i netočnosti. Niski koeficijent varijacije, te srednja vrijednost biasa za obje koncentracijske razine manja je od klinički značajne (2%, 3 mmol/mol).

Između dviju je metoda konstantna i proporcionalna razlika koja je veća od klinički značajne. TINIA metodom su dobiveni niži rezultati, osobito u visokim koncentracijama, te se obje metode ne mogu koristiti istovremeno.

Čak 20% rezultata iz zamrznutih uzoraka je klinički značajno niže, uzorci pune K-EDTA krvi ne mogu se pohranjivati na -20°C.

Kapilarna elektroforeza je pogodna za kvantifikaciju hemoglobina A_1c za postavljanje dijagnoze šećerne bolesti i praćenje terapije i praćenje statusa glikemije. Drugi oblici hemoglobina ne interferiraju u mjerenju, te se ujedno može koristiti i za probir hemoglobinopatija i talasemija.

Harmonizacija; hemoglobin, A_1c, standardizacija, metoda; šećerna, bolest

8. SUMMARY

Verification of Capillary Electrophoresis Method for Hemoglobin A_1c Measurement

Hemoglobin A_1c is the leading marker of glycemic control. Determination of its concentration is of great importance for diagnosing, monitoring therapy and course of diabetes. Results of performance evaluation of the Sebia Minicap Flex Piercing in accordance with protocol CLSI EP05-A2 are shown with the aim to introduce capillary electrophoresis as the method for measurement of hemoglobin A_1c into routine work.

Commercial control samples and a mixture of human samples from patients in two concentration levels, in triplicate during five days, were used to test imprecision and inaccuracy of the method. In order to estimate the comparability with the method currently in use (TINIA, on the Siemens Dimension ExL) 117 samples from patients of KBC Osijek were used, venous blood sampled on K–EDTA anticoagulant. The stability of the samples was tested by comparison to results from capillary electrophoresis of 113 samples before and after freezing.

Results are expressed in IFCC (mmol/mol) and NGSP (%) units. Capillary electrophoresis on the Sebia Minicap Flex Piercing fulfills strict clinical criteria for imprecision and inaccuracy. The low coefficient of variation and mean value of bias for both concentration levels is lower than the clinically significant (2%, 3 mmol/mol).

The constant and proportional difference between the two methods is higher than clinically significant. The TINIA method yields lower results, especially in high concentrations, therefore both methods cannot be used concurrently.

20% of results from frozen samples are clinically significantly lower, and samples of K-EDTA whole blood cannot be stored at -20°C.

Capillary electrophoresis is suitable for quantifying hemoglobin A_1c for diagnosing diabetes and monitoring therapy and glycemic status. Other forms of hemoglobin do not interfere with the method and it is also suitable for screening hemoglobinopathy and thalassemia.

Harmonization; hemoglobin, A_1c; standardization, methods; diabetes

9. LITERATURA

1. International Federation of Diabetes. IDF diabetes atlas. 7th edition. int, pristupljeno 18. 09. 2017. http//www.idf.org/diabetesatlas.

2. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2010. Diabetes Care, 2010. 33 (suppl): 11-61.

3. Food and Drug Administration. FDA

4. Šimundić AM, ur. Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Priručnik za trajno usavršavanje. Zagreb: Hrvatska komora medicinskih biokemičara. Medicinska naklada, 2013.

5. European Comittee for Clinical and Laboratory Standards. Guidelines for the evaluation of analyzer in clinical chemistry, ECCLS Document, Vol.3,No.2,1986.

6. CLSI. User Verification of Precision and Estimation of Bias Approved Guideline. 2. izdanje. CLSI Document EP05-A2. Wayne, PA, SAD: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005. In.

7. International vocabulary of metrology-basic and general concepts and associated terms (VIM). JCGM 200:2012. 3.izdanje.

8. CLSI. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. 2.izdanje. CLSI Document EP06-A.Wayne, PA, SAD: Clinical and Laboratory StandardsInstitute, 2003. In.

9. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada, 2009.

10. Sertić J, sur. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. 2nd ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2015.

11. dr.med.Martinec K, KB Merkur. "Dobra regulacija-život bez komplikacija. Časopis za zdrav život: "Slatki život-dijabetes". 2016: p. 12-13.

12. Canadian Diabetes Association. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. Canadian Journal of Diabetes, 2013.

13. Marengo-Rowe J. Structure-function relations of human hemoglobins Dallas, Texas: Proc, Baylor University Medical Center; 2006.

14. Burtis CA, Bruns DE.Tietz.Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Seventh Edition, 2007, Elsevier.

9. LITERATURA

15. Weykamp C, John WG i sur. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: A 6-Year Progress Report.Clinical Chemistry,2008;54(2):240-248.

16. Burtis CA, Bruns DE.Tietz.Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Seventh Edition, 2007, Elsevier. https://books.google.hr/books?id=p7XwAwAAQBAJ&pg=PA625&lpg=PA625&dq=HbA1c+tietz&source=bl&ots=jmU8gtXfWz&sig=-ofo4l7aMhmVQH1-G5Gjlx6-dps&. int. pristupljeno 22. 10. 2017.

17. Dimeski G,Yow KS, Brown NM. What is the most suitable blood collection tube for glucose estimation? American Clinical Biochemistry, 2015; 52 (Pt2): 270-275.

18. Rohlfing CL, Hanson H, Tennile AL, Little RR. Effects of whole blood storage on HbA1c measurements with five current assay methods. Diabetes Technol Ther, 20R; 14(3): 271-275.

19. World Journal of Methodology. Methods, units and quality requirements for the analisys of hemoglobin A1c in diabetes mellitus. 2016; 6(2): 133-142.

20. ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. 2017: Summary of Revisions. Diabetes Care, 2017; (Supll.1): 54-55.

21. WHO. Global Report on Diabetes. 2016. www.who. int, pristupljeno 14.10.2017.

22. World Health Organization. Definition and Diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. 2006.

23. Weykamp C. HbA1c: A Review of Analytical and Clinical Aspects of Dibetes Mellitus. Am LabMed, 2013; 33: 393-400.

24. IFCC Reference System for Measurement of Hemoglobin A1c in Human Blood and the National Srandardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: A Method-Comparison Study. 2004; Clinical Chemistry: 166-174.

25. Jeppsson, J., Kobold, U., Barr, J., et al. (2005). Approved IFCC Reference Method for the Measurement of HbA1c in Human Blood. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 40(1), pp. 78-89. Retrieved 18 Oct. 2017, from doi:10.1515/CCLM.2002.016.

26. Am J Clin Pathol. Evaluation of the Sebia Capillarys 3 Tera and the Bio-Rad D-100 Systems for the Measurement of Hemoglobin A1c. 2016 Jul; 146(1):67-77. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27357293, pristupljeno 22.10.2017.

27. HKMB. Osnove statistike u svakodnevnoj praksi. Urednik Šimunović AM. Zagreb, 2008.

28. http://www.sebia.com/en-EN/produits/minicap-hb-a1c. int, pristupljeno 10.10.2017.

29. Heylen O, Van Neyghem S, Exterbille S i sur. Evaluation of Sebia Capillarys 2 Flex Piercing for the measurement of HbA1c on Venous and Capillary Blood Samples. Am J Clin Pathol, 2014; 141: 867-877. In.

30. Sebia, Minicap HbA1c, ref 2215. Upute za rad, instrukcijski list 2015/11. In.

31. Penttila I, Penttiila K i sur. Methods, units and quality requirements for the analysis of hemoglobin A1c in diabetes mellitus. World J Methodol, 2016; 6(2): 133-142. In.

32. www.NGSP.org; List of NGSP Certified Methods, updated 11/2017. Pristupljeno 6.11.2017.

33. Marinova M, Aetinier S, Caldini s i sur. Multicenter evaluation of hemoglobin A1c assay on capillary electrophoresis. Clin Chim Aeta, 2013. http//olx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.06.014. In.

34. Urrechaga E.High-Resolution HbA1c separation and hemoglobinopathy detection with capillary electrophoresis. Am J Clin Pathol, 2012; 138: 448-456. In.

35. devices EPatCo2O1oivd. Directive 98/79/EC. Official Journal of the European Communities. 1998 October; 331: p. 1-3.

36. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2016. Diabetes Care 2016; 39: S1-S106.

37. American Diabetes Association.Diagnosis and Classification of diabetes mellitus.Diabetes Care 2014; 37(Supll 1): S81-S90.

38. DCCT. The Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Eng J Med, 1993; 329; 977-986.

39. UKPDS. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonyureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes Lncet, 1998; 352: 837-853.

40. White NH, Sun W, Cleary PA, Tamborlane WV, Danis RP, Hainsworth DP i sur. Effect of prior intensive therapy in type 1 diabeteson 10-year progression of retinopathy int the DCCT/EDIC: comparison of adults and adolescents. Diabetes, 2010; 59: 1244-1253.

41. Braga F, Dolci A, Montagnana M i sur. Revalution of biological variation og glycated hemoglobin (HbA1c)using an accurately designated protocol and an assay traceable to the IFCC reference system. Clin. Chem. Aeta 2011; 412: 1412-1416. In.

9. LITERATURA

42. Pani LN, Korende L, Meigs JB i sur. Effect of ageing on A1c levels in individuals without diabetes: evidence from the Framingham offspring study and the National Health and Nutrition Examination Survey 2001-2004. Diabetes Care, 2008, 31: 1991-1996. In.

43. Dasgupte K, Chan C, Da Costa i sur. Walking behaviourand glycemic control in type 2 diabetes: seasonal and gender differences-studydesign and methods. Cardiovasc Diabetol 2007, 6:1. In.

44. Xiaobin W, Yan C, Zemin W i sur. A comparative evaluation of the analitycal performances of Capillariys 2 Flex Piercing, Tosoh HLC-723 G8, Premier HB9210, and Roche Cobas c501 Tine-quant Gen 2 analyzers for HbA1c determination. Biochemia Medica, 2016; 26(3): 353-36. In.

45. Weykamp C, Waenink-Wieggers H, Kemna E, Siebelder C. HbA1c: petformance of the Sebia Capillarys 2 Flex Piercing. Clin Chem Lab Med, 2012. In.

46. Jaisson S, Leroy N, Maurice J i sur. First evaluation of Capillarys 2 Flex Piercing (Sebia) as a new analyzer for assay by capillary electrophoresis. Clin Chem Lab Med, 2012. In.

47. Salvin E, Coresh J, Jordahe J i sur. Stability of HbA1c measurement from frosen whole blood samples stored for over a decade. Diabet Med, 2015; 22(12): 1726-1730. In.

48. Liotta L, Di Franco A, Pazzagli M, Luconi M. Glycated hemoglobin (HbA1c) measurement in frozen whole blood depends on baseline values of fresh samples. Anal Bioanal Chem, 2013; 405: 429-434. In.

49. Chia-N i L, Rffrcts of hemoglobin C, D, E and S traits on measurements of HbA1c by six methods. Clinica Chimica Acta, 2012; 413: 819-821. In.

50. Brants A. Detection of hemoglobinopathies and thalassemias using automated separation systems. Medical Laboratory Observer, 2014. https//www.mlo-online.com, pristupljeno 8.11.2017.

51. Dimension Hb1c kit (Model DF 105A)Upute za rad, instrukcijski list 2015.

52. HKMB. Laboratorijska dijagnostika šećerne bolesti u trudnoći Standardni laboratorijski postupak. http://www.hkmb.hr/dokumenti/2014. pristupljeno 13.10.2017.

10. ŽIVOTOPIS

Lidija Buljubašić

Nadnevak i mjesto rođenja:

24. 03. 1968., Osijek

Kućna adresa:

Kozjačka 101,

31000 Osijek

Tel. 098861362

e-mail: lidija.buljubasic1@gmail.com

Obrazovanje:

Sanitarno – laboratorijski stručni radnik

1983-1987. Školski centar „Ruđer Bošković“, Osijek

Sveučilišni prvostupnik medicinsko-laboratorijske dijagnostike

2010-2013. Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Sveučilište J. J. Strossmayer, Osijek

Zaposlenja:

Od 17. 07. 1987. godine zaposlena u KBC Osijek, J. Hutlera 4, 31000 Osijek, u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku. Na Odsjeku za hematologiju radila dvadeset godina, do danas na Odjelu za imunološku i alergološku dijagnostiku.

Tel. 031/511 637