

Uit de laboratoriumpraktijk

Kalibratie van de Boehringer HbA1c-immunoassay met behulp van SKZL-kalibratoren

S.G.A. KOEHORST, H.J.M. SALDEN en F.M.J. ZUIJDERHOUDT

De Boehringer immunoassay HbA1c Tina Quant heeft voor de kalibratie minimaal 4 standaarden nodig. Daar de SKZL maar drie kalibratoren levert, is directe kalibratie met deze SKZL-kalibratoren niet mogelijk. In dit artikel wordt beschreven hoe op een eenvoudige wijze één of twee additionele kalibratoren kunnen worden gecreëerd. Daardoor zijn de SKZL-kalibratoren wel geschikt voor de HbA1c immunoassay.

Het percentage HbA1c van 50 patiënten werd gemeten na kalibratie met SKZL-kalibratoren en na kalibratie met Boehringer standaarden. Uit de vergelijking van de gemeten percentages HbA1c na de twee kalibraties blijkt dat de verschillen, vooral in het klinisch belangrijke gebied van 7-12%, uiterst klein zijn.

Trefwoorden: HbA1c immunoassay; kalibratie

Sinds een aantal jaren wordt het gly-Hb binnen ons laboratorium bepaald m.b.v. affiniteitschromatografie (1). Deze methode is zeer bewerkelijk en de Boehringer HbA1c immunoassay Tina-quant zou een geschikt alternatief kunnen zijn. Uit een eerder intern vergelijk tussen de affiniteitschromatografie en deze HbA1c-immunoassay bleek dat onze referentiewaarden zouden moeten worden aangepast wanneer zou worden overgaan op de HbA1c-immunoassay. Uiteindelijk zijn wij niet overgegaan omdat de kalibratie van deze assay medio 1995 opnieuw zou worden aangepast.

Om in de toekomst niet afhankelijk te zijn van eventuele aanpassingen van de kalibratie van de HbA1c immunoassay door de fabrikant zou een kalibratie volgens de referentiemethode van Goldstein (2) onze voorkeur hebben. Dit zou mogelijk zijn door gebruik te maken van de commercieel verkrijgbare SKZL-kalibratoren. Via de SKZL zijn drie GlyHb-kalibratoren beschikbaar waarvan gecertificeerde percentages HbA1c worden gegeven die zijn vastgesteld m.b.v. de methode van Goldstein (2). Voorwaarde voor het gebruik van deze kalibratoren voor de HbA1c-immunoassay is dat de absolute concentraties HbA1c en Hb

bekend moeten zijn omdat deze twee parameters op twee verschillende manieren worden gemeten en beide dus afzonderlijk gekalibreerd moeten worden. Daarnaast zijn voor de immunoassay minimaal vier kalibratoren noodzakelijk. Dit betekent dat er een additionele standaard moet worden gecreëerd.

In dit artikel wordt beschreven hoe op eenvoudige wijze de SKZL-kalibratoren rechtstreeks te gebruiken zijn voor de kalibratie van de HbA1c-immunoassay en hoe de noodzakelijke vierde kalibrator wordt gecreëerd.

MATERIALEN en METHODEN

Alle HbA1c-bepalingen werden uitgevoerd op de Hitachi 717. Hierbij werden de standaardinstellingen voor de HbA1c Tina Quant immunoassay bepaling gebruikt zoals die worden opgegeven door Boehringer Mannheim. De immuno HbA1c-bepaling van Boehringer bestaat uit een immunoturbidimetrische bepaling van de concentratie HbA1c en een fotometrische bepaling van het totaal Hb. De kalibratie van de fotometrische bepaling van het totaal Hb op de Hitachi 717 werd steeds op dezelfde wijze uitgevoerd; de Hb-bepaling werd gekalibreerd volgens een twee punts kalibratie m.b.v. de opgegeven waarde voor Boehringer standaard A, één van de vier Boehringer standaarden, en fysiologisch zout als nulpunt. De kalibratie voor de HbA1c-bepaling werd op drie verschillende manieren uitgevoerd:

1. Kalibratie van de HbA1c-bepaling met Boehringer standaarden (de Boehringer kalibratie). De kalibratie voor de bepaling van de HbA1c-concentratie wordt uitgevoerd m.b.v. de opgegeven waarden voor de concentratie HbA1c van de standaarden A, B, C en D.
2. Kalibratie van de HbA1c-bepaling met SKZL-kalibratoren (de SKZL-kalibratie). De SKZL-kalibratoren high, medium en low werden opgelost in 2,0 ml hemolysereagens (Boehringer Mannheim). Deze oplossing werd 15 min. gemengd bij kamertemperatuur en 5 min. gecentrifugeerd bij 3.000 rpm. Deze centrifugestap werd ingebouwd, omdat de gereconstitueerde SKZL-kalibrator veel microdeeltjes bevat, die de fotometrische bepaling van het Hb kunnen beïnvloeden. Het supernatant werd gebruikt als SKZL-kalibrator. Deze SKZL-kalibratoren werden verdund:

Deventer Ziekenhuis, Deventer

Correspondentie: Dr. S.G.A. Koehorst, Klinisch Chemisch Laboratorium, Deventer Ziekenhuis, Postbus 5001, 7400 GC Deventer.

Ingekomen: 22.07.96

Tabel 1. SKZL-kalibratoren zoals gebruikt voor de SKZL-kalibratie. De concentratie HbA1c is berekend uit het opgegeven percentage HbA1c door de SKZL en de gemeten Hb-concentratie.

SKZL standaard	Omschrijving		[HbA1c] mmol/l	[Hb] mmol/l	HbA1c %
Low	100 µl low	+ 900 µl hr	0,32	7,2	4,4
Medium	100 µl medium	+ 900 µl hr	0,76	10,3	7,4
High	100 µl high	+ 900 µl hr	1,20	11,7	10,2
Ext.std.	200 µl medium	+ 800 µl hr	1,52		

Ext.std.: additioneel gecreëerde standaard; hr: hemolysereagens (Boehringer Mannheim, Mannheim, Duitsland)

100 µl SKZL-kalibrator werd gemengd met 900 µl hemolysereagens (Boehringer Mannheim). De Hb-concentratie van de SKZL-kalibratoren werd bepaald na kalibratie van de Hb-bepaling m.b.v. Boehringer standaard A. De absolute concentraties van de HbA1c-kalibratoren werden berekend volgens de formule:

$$[\text{HbA1c}] = \frac{\% \text{ HbA1c} \times [\text{Hb}]}{100}$$

Met behulp van de berekende HbA1c-concentraties kan een kalibratie worden uitgevoerd met de SKZL-kalibratoren zoals in tabel 1 als voorbeeld is gegeven.

3. Kalibratie van de HbA1c-bepaling met Boehringer standaarden aangepast op SKZL-kalibratoren (aangepaste Boehringer kalibratie).

De concentraties HbA1c van de Boehringer standaarden A, B, C en D werden in duplo gemeten na kalibratie van de HbA1c-bepaling op de Hitachi 717 m.b.v. de SKZL-kalibratoren zoals in tabel 1 opgegeven. Het gemiddelde van de gemeten HbA1c-concentratie werd als nieuw opgegeven waarde gebruikt voor de kalibratie van de HbA1c-bepalingen met de op de SKZL aangepaste Boehringer standaarden A, B, C en D.

Na de verschillende kalibraties werd van patiëntenmonsters het percentage HbA1c bepaald. De gemeten percentages HbA1c na verschillende kalibraties worden met elkaar vergeleken.

RESULTATEN

Om de absolute HbA1c-concentratie te kunnen berekenen moet de Hb-concentratie gemeten worden van de SKZL-kalibratoren. Deze concentratie werd eerst gemeten op een hematologie automaat, de Sysmex K-4500 (Toa, Kobe, Japan) en vergeleken met de Hb-concentratie, gemeten op de Hitachi 717 volgens Boehringer. De afwijking tussen de gemeten Hb-concentraties bedroeg minder dan 3%. Daar voor de meting van het Hb op de K-4500 relatief veel monster nodig is, werd in het verdere onderzoek het Hb gemeten op de Hitachi 717.

De intra- en inter-run variatiecoëfficiënten werden berekend voor de drie gebruikte kalibraties. Deze verschilden niet van elkaar, de intra-run variatiecoëf-

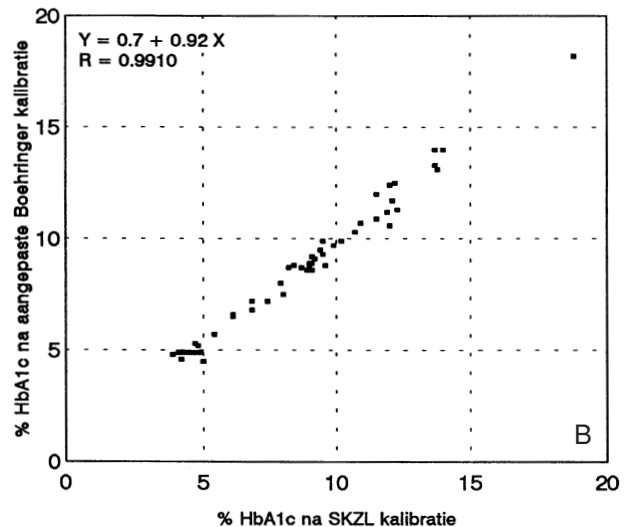
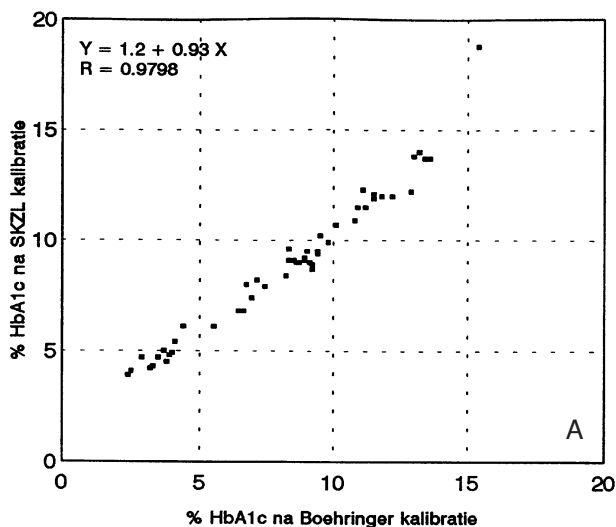
ficiënt bedroeg 2,5%, de inter-run variatiecoëfficiënt 3,0% bij een HbA1c-percentage van ongeveer 10% (voor de affiniteitschromatografie bedroegen deze variatiecoëfficiënten respectievelijk 5,1% en 6,3%).

Om de effecten van verschillende kalibraties te kunnen vergelijken is, van 50 patiëntenmonsters, na iedere kalibratie het percentage HbA1c gemeten. In figuur 1A is het vergelijk weergegeven tussen het percentage HbA1c gemeten na de Boehringer kalibratie met het percentage HbA1c gemeten na de SKZL-kalibratie. Het gemeten percentage HbA1c na de Boehringer kalibratie laat in relatie tot de SKZL-kalibratie een afwijking zien in het lage en het hoge gebied. De verschillen zijn klein voor de percentages tussen de 7 en 12%. Wanneer het percentage HbA1c gemeten na de SKZL-kalibratie wordt vergeleken met het percentage HbA1c gemeten na de aangepaste Boehringer kalibratie dan blijkt dat door deze aanpassing op de SKZL-standaarden, de verschillen in het hoge en lage gebied worden opgeheven (figuur 1B).

Rapportage van het percentage HbA1c volgens SKZL-standaarden is ook mogelijk door de SKZL-standaarden als patiëntenmonster mee te nemen in de analytische run. Met behulp van de gecertificeerde HbA1c-waarden van de standaarden en het in de analytische run gemeten percentage HbA1c wordt met orthogonale regressie de kalibratie-curve berekend. Met de resulterende formule worden gemeten patiëntenresultaten omgerekend naar HbA1c-waarden volgens de SKZL. Om te vergelijken in hoeverre deze correctie juist is worden deze resultaten vergeleken met het percentage HbA1c gemeten na kalibratie met SKZL-standaarden (figuur 2). Uit deze figuur blijkt dat de correctie vooral plaats vindt in het lage en niet in het hoge gebied.

DISCUSSIE

Uniforme kalibratie is een benadering waarmee de kwaliteit van de analyse van HbA1c verbeterd kan worden (3,4). De SKZL heeft voor deze uniforme kalibratie drie kalibratoren ontwikkeld (5). Omdat van deze kalibratoren alleen een gecertificeerd percentage HbA1c wordt gegeven en er maar drie kalibratoren beschikbaar zijn is het niet mogelijk deze SKZL-kalibratoren rechtstreeks voor kalibratie van de HbA1c-immunoassay te gebruiken.



Figuur 1. Vergelijk van de percentages HbA1c van 50 patiëntenmonsters gemeten na verschillende kalibraties. A: Vergelijk van het percentage HbA1c gemeten na kalibratie met Boehringer standaarden (Boehringer kalibratie) met het percentage HbA1c gemeten na de kalibratie met SKZL-kalibratoren (SKZL-kalibratie); B: Vergelijk van het percentage HbA1c gemeten na de kalibratie met SKZL-kalibratoren (SKZL-kalibratie) met het percentage HbA1c gemeten na kalibratie met de op de SKZL aangepaste Boehringer standaarden (aangepaste Boehringer-kalibratie). Correlaties zijn berekend m.b.v. lineaire regressie.

Rapportage van het percentage HbA1c volgens SKZL-standaarden is dan alleen mogelijk door de SKZL-standaarden als patiëntenmonster mee te nemen in de analytische run. De gemeten HbA1c-percentages van patiënten moeten dan worden omgerekend.

Door de in dit onderzoek beschreven aanpassingen is wel rechtstreekse kalibratie van de HbA1c-immunoassay met SKZL-kalibratoren mogelijk.

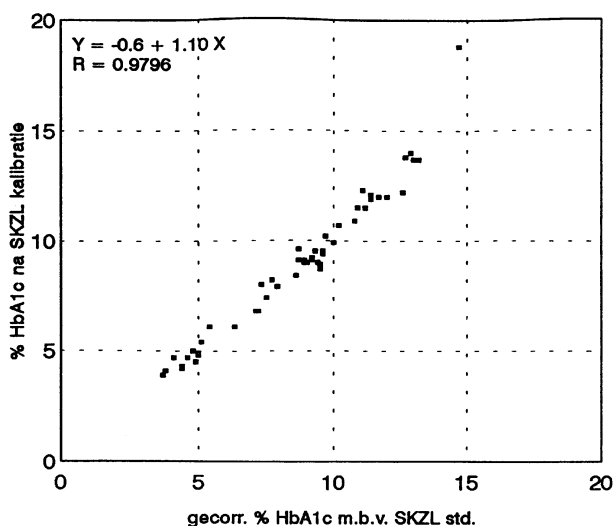
Om te evalueren hoe de gemeten percentages HbA1c van patiëntenmonsters zullen veranderen door de aanpassing op de SKZL-standaardisatie werd na de Boehringer kalibratie en de SKZL-kalibratie van 50 patiënten het percentage HbA1c gemeten. Uit het vergelijk tussen het percentage HbA1c gemeten na de

Boehringer kalibratie en het percentage gemeten na de SKZL-kalibratie, blijkt dat er verschillen zijn in het hoge en in het lage gebied. Opgemerkt dient te worden dat de verschillen in het hoge gebied maar gedeeltelijk te beoordelen zijn omdat er maar één patiënt gemeten is met een percentage HbA1c van meer dan 15%.

In figuur 1B wordt het gemeten percentage HbA1c na de SKZL-kalibratie vergeleken met het percentage HbA1c gemeten na de aangepaste Boehringer kalibratie. De verschillen in het hoge en lage gebied zoals die in figuur 1A werden geconstateerd zijn zoals verwacht gecorrigeerd. Met dit vergelijk wordt aangegeven, dat wanneer de HbA1c-concentratie van de Boehringer standaarden per lotnummer één keer worden aangepast op de SKZL-kalibratoren, het dan mogelijk is om m.b.v de aangepaste Boehringer standaarden de gemeten HbA1c-percentages direct volgens SKZL te rapporteren.

Indirecte rapportage volgens SKZL is mogelijk door omrekening van de gemeten percentages HbA1c na de Boehringer kalibratie m.b.v orthogonale regressie naar SKZL-kalibratoren die als monster in de analytische run zijn meegenomen. Deze omrekening corrigeert enigszins de uitslagen richting de SKZL-kalibratie (fig. 2). Deze correctie vindt vooral plaats op de monsters met een laag percentage HbA1c en minder op monsters met een hoog percentage. Dit is te verklaren doordat de hoogste SKZL-kalibrator een HbA1c-concentratie heeft van ongeveer 1,2 mmol/l wat bij een normaal Hb overeenkomt met een percentage HbA1c van ongeveer 10%.

Samenvattend kan worden gesteld dat het mogelijk is om de HbA1c-immunoassay te kalibreren m.b.v. SKZL-kalibratoren met gecertificeerde HbA1c-concentraties vastgesteld volgens de referentiemethode van Goldstein. Echter de verschillen in HbA1c-percentages gemeten na de SKZL en Boehringer kalibratie zijn gering. Met name in het klinisch belangrijke gebied van 7-12% is dit verschil klein, doch voor hoge



Figuur 2. Vergelijk van de percentages HbA1c van 50 patiëntenmonsters gemeten na de Boehringer kalibratie waarna de gemeten percentages m.b.v. orthogonale regressie werden omgerekend naar SKZL-standaarden die in de analytische run als monsters zijn meegenomen met de gemeten percentages HbA1c na de SKZL-kalibratie. Correlatie is berekend m.b.v. lineaire regressie.

percentages HbA1c is de aanpassing op SKZL-kalibratoren noodzakelijk. De aanpassing op SKZL-kalibratoren zoals in dit onderzoek beschreven kan ook toegepast worden om eventuele toekomstige variaties in lotnummers te ondervangen of om andere HbA1c-immunoassays die afwijkingen geven t.o.v. de referentiemethode aan te passen op de SKZL-kalibratoren.

Literatuur

1. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, Fugimoto EK, Mallia AK, Smith PK, England JD, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography. *Clin Chem* 1982; 28: 2088-2094.
2. Goldstein DE, Little RR, England JD, Wiedmeyer H-M, McKenzie EM. Methods for quantitating glycosylated hemoglobin: high performance liquid chromatography and thiobarbituric acid colorimetry. In Clarke WL, Larner J, Pohl SL. eds. *Methods of diabetes research, Vol. 2 Clinical Methods*. New York John Wiley 1986; 475-504.
3. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FJA, van der Slik W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. *Clin Chem* 1994; 40: 138-144.
4. Weykamp CW. Kalibratie, middelen en effect op kwaliteit van de analyse van glycohemoglobine. *Tijdschrift NVKC* 1994; 19: 101-106.
5. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FJA, van der Slik W. Evaluation of a reference material for glycated haemoglobin. *Eur J Clin Chem Biochem* 1996; 34: 76-72.

Summary

Calibration of the Boehringer HbA1c immuno assay using SKZL calibrators. Koehorst SGA, Salden HJM and Zuijderhoudt FMJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 309-312.

The Boehringer immunoassay HbA1c Tina Quant needs for calibration minimal four standards. The Dutch Foundation for Quality Assessment in Clinical Laboratories (SKZL) supplies only three standards. This article describes the creation of one or two additional standards, so that SKZL standards are suitable for the calibration of the HbA1c immunoassay.

The percentage of HbA1c of 50 patients was measured after calibration with the SKZL standards and with the Boehringer standards. Comparison of the measured percentages HbA1c after the different calibrations showed only minor differences, especially in the clinically important range of 7-12 % HbA1c.

Key-words: HbA1c immunoassay; calibration