

# Bachelorproef

---

**Studiegebied** Gezondheidszorg

**Bachelor** Biomedische Laboratoriumtechnologie

**Afstudeerrichting** Medische Laboratoriumtechnologie

**Academiejaar** 2015-2016

**Student** Cedric Vandemergel

---

**Thema**

**Evaluatie en vergelijking van vier  
verschillende toestellen voor de  
kwantificatie van HbA1c**

**Stageplaats**

---

**AZ Sint-Jan Brugge-Oostende AV, campus Brugge**



# Bachelorproef

---

**Studiegebied** Gezondheidszorg

**Bachelor** Biomedische Laboratoriumtechnologie

**Afstudeerrichting** Medische Laboratoriumtechnologie

**Academiejaar** 2015-2016

**Student** Cedric Vandemergel

---

**Thema**

**Evaluatie en vergelijking van vier  
verschillende toestellen voor de  
kwantificatie van HbA1c**

**Stageplaats**

---

**AZ Sint-Jan Brugge-Oostende AV, campus Brugge**

## Voor akkoord verklaring

*De stageplaats biedt modaliteiten aan om de bachelorproef uit te voeren en doet aan procesbegeleiding, maar neemt geen eindverantwoordelijkheid bij het uiteindelijke product.*

Prof. Dr. Langlois  
Externe stagebegeleider

Martine Lansens  
Stagegever

Dr. Sc. Vanbillemont  
Interne stagebegeleider

## Woord vooraf

Mijn studententijd aan de Howest te Brugge in de richting Medische Laboratorium Technieken loopt stilaan ten einde. De praktijkstage in het laboratorium van het AZ Sint-Jan Brugge en de bachelorproef zijn het perfecte sluitstuk van deze tijd, waaraan ik met vreugde en heimwee zal terugdenken. Met het schrijven van dit "woord vooraf" leg ik de laatste hand aan mijn scriptie. Het was een spannende periode waarin ik de gelegenheid kreeg om naast wetenschappelijk onderzoek ook praktijkervaring op te doen. Ik wil dan ook de diensthoofden en mijn collega's van het laboratorium hartelijk bedanken voor de fijne samenwerking. Heel wat mensen hebben hun steentje bijgedragen bij het tot stand komen van deze bachelorproef. In de eerste plaats ASO Dr. Mulliez voor de vele ideeën, de deskundige raadgevingen en de duwtjes in de juiste richting. Daarnaast ook een gemeend dankwoord aan mijn twee mentors, Dr. Langlois en Dr. Vanbillemont, voor de kritische evaluatie, de feedback en de discussies die ik kon voeren over de verschillende onderwerpen die tijdens de bachelorproef aan bod kwamen. Tot slot wil ik ook mijn ouders, broers, zus en vrienden vermelden voor de steun en het vertrouwen tijdens mijn studies.

# Abstract

## Objective

To evaluate and compare four commercially available HbA1c analyzers (Menarini HA-8180, Bio-Rad D-100, Tosoh G8 and Sebia Capillarys 2 flex piercing) with respect to (1) correlation against the current laboratory HbA1c analyzer (Menarini HA-8160) and (2) imprecision against the HbA1c analytical goal of the coefficient of variation  $\leq 2.9\%$ .

## Background

Glycated hemoglobin (HbA1c) has become the preferred method for monitoring diabetes over the last decade. Various commercially available analyzers have been developed for measuring HbA1c in a routine laboratory. The analyzers should deliver fast and accurate results providing both the practitioner and the patient with the information for an appropriate diagnosis, treatment and follow-up of the patient.

## Methods

The validation and comparison of the four analyzers are performed over a period of 2 weeks. During this period a series of standardized tests are executed and operator observations are recorded. The accuracy of each analyzer, including the laboratory analyzer, is assessed by using the calibrated SKML controls for both a low and a high HbA1c sample. The maximum allowed mean bias is 2 mmol/mol. The repeatability is performed by the consecutive measurement of ten low and ten high samples on each analyzer, whereas the reproducibility is executed by measuring ten identical both low and high samples twice a day during five consecutive days. For both criteria the calculated coefficient of variation CV must be maximum 2.9 %. The linearity is obtained by measuring test samples with linear increasing concentrations of 30 to 80 mmol/mol. A minimum  $R^2$  of 0.95 is considered to pass this test. In order to verify the correlation of the new analyzers compared to the current laboratory analyzer (Menarini HA-8160) a series of 128 samples, including five hemoglobinopathy samples, is measured. Calculations and graphs of the linear regression with correlation coefficient  $r$ , the Intercept A, slope B at a confidence level of 95%, are performed using Passing Bablok regression and Bland Altman plot. Carry-over tests to check how efficiently the analyzer can manage eventual contamination by a previous high HbA1c sample on the next normal samples are executed. Lastly the functionality and the observations made while testing, in particular the features, the complexity, the required preparations, the quality of the reports, the software and the user interface are evaluated.

## Results

The coefficient of variation is acceptable for all four analyzers, although the CVs of the repeatability and the reproducibility for both the Menarini HA-8180 and the Tosoh G8 analyzers are significantly lower than for the two other instruments. In respect to linearity only Tosoh G8 ( $R^2 = 0.947$ ) is slightly below the target. The Capillarys of Sebia shows the best linearity ( $R^2 = 0.9988$ ). Passing-Bablok regression executed on the four analyzers compared with the current Menarini HA-8160 shows only for Sebia an intercept A outside the confidence interval of 95%. Carry-over does not appear on either analyzer. The analyzer with the best user interface, the least complexity and generating the fastest and the best reports is the Bio-Rad D-100 analyzer.

## Conclusion

The Menarini HA-8180 is the best choice considering all criteria with acceptable precision, good linearity and acceptable agreement with the central laboratory results. The more only this instrument provides the feature of obtaining the HbA2 concentration simultaneously with the HbA1c measurement. Also in regard to simplicity of operation, fast and reliable reporting, the Menarini HA-8180 scores high.

## Lijst van afkortingen en symbolen

ADA	American Diabetes Association
atm	Atmosfeer
CE	Capillaire elektroforese
cHb	CarbamyI hemoglobine
CI	Confidence interval
CV	Variatie coëfficiënt
CV <sub>h</sub>	Variatiecoëfficiënt van de herhaalbaarheid
CV <sub>r</sub>	Variatiecoëfficiënt van de reproduceerbaarheid
d	Bias
EDTA	Ethyleendiaminetetra-azijnzuur
Hb	Hemoglobine
HbA	Volwassen hemoglobine
HbA0	Niet geglyceerd hemoglobine
HbA1a	Hemoglobine A1a
HbA1b	Hemoglobine A1b
HbA1c	Hemoglobine A1c
HbA2	Hemoglobine A2
HBB	Beta globuline
HbC	Hemoglobine C
HbD	Hemoglobine D
HbE	Hemoglobine E
HbF	Foetaal hemoglobine
HbH	Hemoglobine H (alfa thalassemie)
Hb-Pathie	Hemoglobinopathie
HbS	Hemoglobine S
Hb-variant	Hemoglobine-variant
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID	Identificatie
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
LA1c	Labiele A1c
LED	Light-emitting diode
LIS	Letsel Informatie Systeem
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
pI	Iso-elektrisch punt
r	Correlatiecoëfficiënt
R <sup>2</sup>	Determinatiecoëfficiënt
SA1c	Hemoglobine A1c
SD	Standaarddeviatie
SKML	Stichting Kwaliteit Medische Laboratoria
STAT	Statim, Latijn voor onmiddellijk
WHO	World Health Organization

## Verklarende woordenlijst

Te verklaren woord	Betekenis
Amadori-herschikking	Hierbij wordt een 1-amino-1-deoxyfructose derivaat (N-gesubstitueerd glucosylamine) gevormd via een keto-amine binding.
Chromatogram	Visuele weergave van de gescheiden stoffen verkregen door chromatografie.
Derivaat	Een afgeleide stof met een overeenkomstige structuur.
Functionaliteit	De mate van geschiktheid voor het desbetreffende doel.
Glycemie	Glycemie is een ander woord voor suikergehalte in het bloed.
Iso-elektrisch punt (pI)	Het deeltje migreert naar de omgeving waar de pI van het deeltje gelijk is aan de pH van de omgeving, zodat de stof geen netto elektrische lading draagt.
Macro- en micro-vasculair	Macrovasculaire complicaties door diabetes mellitus betekent dat de grote bloedvaten van hart, hersenen en benen worden aangetast. Bij microvasculaire complicaties worden de kleine bloedvaten van bv. de ogen, de nieren en zenuwen beschadigd.
Microcytose	Kleinere, blekere rode bloedcellen, door ijzergebrek.
Monitoring	Controle/ opvolging.
N-terminal	De N-terminal of aminoterminus is de aanduiding van het begin van een eiwit of een polypeptide en bestaat uit een aminozuur en een ongebonden aminogroep.
Pathologisch verhoogd staal	Ziekelijk verhoogde HbA1c waarde.
Protoneren	Additie van een waterstofion ( $H^+$ ) aan een molecule of een ion.
Retentietijd	Het tijdsverschil tussen het moment van injecteren en het moment dat de hoogste concentratie van de piek de detector passeert.
Uremische patiënten	Ziekte die ontstaat door opbouw van ureum in het bloed, door een onvoldoende werking van de nieren.



## Lijst van tabellen

Tabel 1: gekozen objectieve criteria.....	23
Tabel 2: beoordeling van de functionaliteit.....	24
Tabel 3: subjectieve criteria.....	25
Tabel 4: verschil tussen de SKML-waarde en de gemiddelde meting.....	26
Tabel 5: procentuele afwijking tussen SKML-waarde en de gemiddelde meting.....	26
Tabel 6: de herhaalbaarheid $CV_h$ .....	27
Tabel 7: de reproduceerbaarheid $CV_r$ .....	28
Tabel 8: afwijking concentratie van stalen voor en na de contaminatie.....	29
Tabel 9: Passing-Bablok regressie: huidig toestel vs. nieuwe toestellen.....	32
Tabel 10: Passing-Bablok regressie tussen de toestellen onderling.....	34
Tabel 11: Bland Altman plot resultaten: huidige Menarini HA-8160 tegenover de nieuwe toestellen.....	36
Tabel 12: Bland-Altman Plot voor de toestellen onderling .....	37
Tabel 13: samenvattende tabel voor de kwantitatieve criteria .....	38
Tabel 14: evaluatie van de functionaliteit .....	39
Tabel 15: subjectieve beoordeling: van zwak, neutraal, goed, tot zeer goed .....	40
Tabel 16: scorematrix kwantitatieve criteria.....	41
Tabel 17: beoordeling van de functionaliteit.....	42
Tabel 18: subjectieve beoordeling .....	43
Tabel 19: totaalscore .....	43

## Lijst van reactievergelijkingen

Reactievergelijking 1: ontstaan van versuikerd hemoglobine (stabiele ketoamine) (Lenters-Westra et al., 2012) .....	3
Reactievergelijking 2: ontstaan van hoge carbamyl-hemoglobine concentraties die de levensduur van de rode bloedcellen verkort en de HbA1c- metingen beïnvloedt (Jaisson, Pietrement & Gillery, 2011) .....	7

## Lijst van figuren

Figuur 1: hemoglobine bevat 2 alfa- en 2 beta-ketens en een heem-groep (Hemoglobine, 2016) .....	2
Figuur 2: heem-groep met centraal een Fe-atoom (Hemoglobine, 2016) .....	2
Figuur 3: opname van zuurstof door binding met Fe-atoom (Davis, 2015) .....	2
Figuur 4: hemoglobine types van gezonde volwassenen (eigen bewerking van Lenters-Westra et al., 2012) .....	3
Figuur 5: schema standaardmethoden ter bepaling van HbA1c.....	4
Figuur 6: evolutie van HbF naar HbA van de foetus tot 16 weken na de geboorte (eigen bewerking van Menarini Diagnostics, 2014) .....	6
Figuur 7: principe normale fase kolomchromatografie (eigen bewerking van Clark, 2007) .....	8
Figuur 8: in de linker kolom de anion uitwisselaar waarbij de kolom gepakt is met positief geladen deeltjes, met retentie van de negatieve geladen moleculen uit het staal. In de rechter kolom de omgekeerde werking (eigen bewerking van M. Bird, 1989) .....	9
Figuur 9: schematische weergave van de experimentele setup van een capillaire elektroforese (eigen bewerking van Precissi, z.j.).....	10
Figuur 10: theoretische Passing-Bablok met een confidence interval van 95%.....	12
Figuur 11: Bland Altman plot toont het verschil van een reeks testwaarden als functie van hun gemiddelden met CI=95%. De oranje lijn (nullijn) moet tussen +1.96SD en -1.96SD liggen .....	12
Figuur 12: comparator Menarini HA-8160 .....	14
Figuur 13: voorbeeld chromatogram .....	14
Figuur 14: Menarini HA-8180V-opstelling; 1: LCD-scherm, 2: reagentia, 3: STAT-positie, 4: printer, 5: invoer rek met stalen, 6: kolom/pre-filter, 7: aan-knop .....	15
Figuur 15: chromatogram verkregen door de menarini HA-8180 voor een pathologisch verhoogd HbA1c staal, 1: Ander HbA, 2: HbF, 3: LA1c, 4: HbA1c, 5: HbA0, 6: HbA2.....	16
Figuur 16: Bio-Rad D-100-opstelling: 1: touchscreen, 2: reagentia, 3: STAT-positie, 4: optioneel printer, 5: invoer rek met stalen, 6: kolom/pre-filter, 7: aan-knop .....	17
Figuur 17: chromatogram verkregen door de Bio-Rad D-100 voor een pathologisch verhoogd HbA1c staal. 1: Other HbA, 2: LA1c/cHb, 3: HbA1c, 4: aged HbA0, 5: HbA0, 6: HbA2.....	18
Figuur 18: Tosoh G8-opstelling; 1: touchscreen, 2: reagentia, 3: STAT-positie, 4: printer, 5: invoer rek met stalen, 6: kolom/prefilter, 7: aan-knop.....	19
Figuur 19: chromatogram verkregen door de Tosoh G8 voor een Pathologisch verhoogd HbA1c staal, 1: HbA1a, 2: HbA1b, 3: HbF, 4: LA1c, 5: HbA1c, 6: HbA0.....	20
Figuur 20: Sebia capillarys 2 flex piercing-opstelling; 1: invoer rek met stalen, 2: reagentia, 3: rek met stalen na bepaling, 4: indicator ready.....	21
Figuur 21: chromatogram verkregen door de Sebia Capillarys 2 flex piercing voor een Pathologisch verhoogd HbA1c staal, 1: HbA1c, 2: Other HbA, 3: HbA0, 4: HbA2.....	22

Figuur 22A: rode lijn toont de toegelaten bias, de grijze staaf de gemiddelde bias, de grijze staaf + foutbalk de totale error .....	27
Figuur 22B: rode lijn toont de toegelaten bias, de grijze staaf de gemiddelde bias, de grijze staaf + foutbalk de totale error .....	27
Figuur 23A: normale verdeling van de testresultaten normaal HbA1c staal .....	28
Figuur 23B: normale verdeling van de testresultaten verhoogd HbA1c staal.....	28
Figuur 24A: procentuele variatie van de HbA1c-meting van een normaal staal na één tot vijf dagen.....	29
Figuur 24B: procentuele variatie van HbA1c-meting van een verhoogd staal na één tot vijf dagen .....	29
Figuur 25: lineariteitsgrafieken: de $R^2$ is berekend t.o.v. de ideale waarde (rechte door de oorsprong) .....	30
Figuur 26: Passing-Bablok regressie van het comparator toestel vs. Menarini HA-8180 $r = 0.9945$ , 0 ligt in het 95% CI voor intercept A, terwijl 1 in het 95% CI voor slope B ligt. Dit betekent dat beide toestellen voldoende correleren .....	31
Figuur 27: Passing-Bablok regressie voor de correlatie tussen Tosoh en Bio-Rad: $r = 0.9964$ , 0 ligt in het 95% CI voor intercept A, terwijl 1 in het 95% CI voor slope B ligt. Dit betekent dat beide toestellen goed correleren en voor het gebruik uitwisselbaar zijn.....	33
Figuur 28: Bland-Altman plot tussen Menarini HA-8160 en Menarini HA-8180: de oranje lijn ligt in het $-1.96SD$ tot $+1.96SD$ interval: correlatie voldoet.....	35
Figuur 29: Bland-Altman plot tussen Tosoh en Bio-Rad: de oranje lijn ligt in het $-1.96SD$ tot $+1.96SD$ interval: correlatie voldoet. ....	36

# Inhoud

1.	Inleiding.....	1
2.	Literatuurstudie.....	2
2.1.	Hemoglobine als merker van diabetes.....	2
2.1.1.	Hemoglobine .....	2
2.1.2.	HbA1c.....	3
2.1.3.	Standaardbepaling van HbA1c .....	4
2.1.4.	Interfererende factoren tijdens de HbA1c bepaling .....	5
2.2.	Technieken voor HbA1c bepaling.....	7
2.2.1.	Ionenuitwisselingschromatografie.....	8
2.2.2.	Capillaire elektroforese .....	10
2.3.	Kwantitatieve validatie.....	11
2.3.1.	Passing-Bablok regressie.....	12
2.3.2.	Bland-Altman plot .....	12
3.	Materialen & Methoden.....	13
3.1.	Materialen .....	13
3.2.	Methoden .....	13
3.2.1.	Gebruikte toestellen .....	13
3.2.2.	Validatieplan.....	23
3.2.3.	Verwerking.....	25
4.	Resultaten .....	26
4.1.	Kwantitatieve criteria .....	26
4.1.1.	Juistheid .....	26
4.1.2.	Herhaalbaarheid.....	27
4.1.3.	Reproduceerbaarheid.....	28
4.1.4.	Carry-over test .....	29
4.1.5.	Lineariteit.....	30
4.1.6.	Correlatie .....	31
4.1.7.	Samenvatting van de kwantitatieve criteria .....	38
4.2.	Beoordeling van de functionaliteit.....	39
4.3.	Subjectieve beoordeling .....	40
5.	Discussie.....	41
5.1.	Scores voor de kwantitatieve criteria .....	41
5.2.	Beoordeling van de functionaliteit.....	42
5.3.	Subjectieve criteria.....	43
5.4.	Totaalscore.....	43
6.	Conclusie.....	44
7.	Referentielijst .....	45
8.	Bijlagen.....	47
	Bijlage 1: Materialen.....	47
	Bijlage 2: toegepaste formules.....	48
	Bijlage 3: Passing-Bablok regressies: huidig toestel vs. nieuwe toestellen .....	49
	Bijlage 4: Passing-Bablok regressies: nieuwe toestellen onderling .....	51
	Bijlage 5: Passing-Bablok regressies: standaardmethode vs vingerprikmethode .....	54
	Bijlage 6: Bland-Altman plot's: huidig toestel vs. nieuwe toestellen .....	55
	Bijlage 7: Bland-Altman plot's: nieuwe toestellen onderling .....	57
	Bijlage 8: Bland-Altman plot's: standaardmethode vs. vingerprikmethode .....	60

# 1. Inleiding

De prevalentie van diabetes mellitus neemt de laatste decennia wereldwijd toe. Deze ziekte kan complicaties aan het micro-vasculaire stelsel veroorzaken, zoals nierfalen, aandoeningen aan de zenuwen van voornamelijk de benen en de voeten en beschadiging van de oog-retina, wat tot blindheid kan leiden. Ook kunnen macro-vasculaire complicaties ontstaan, zoals beroerte, hartziekten en perifere vasculaire aandoeningen, wat amputaties van de getroffen ledematen tot gevolg kan hebben. De ontwikkeling van deze aandoeningen kan worden afgeremd of verhinderd door een optimale controle van de concentratie glucose in het bloed van de diabetespatiënt (Lenters-Westra et al., 2012).

Geglyceerd hemoglobine (HbA1c) wordt algemeen geaccepteerd als de belangrijkste merker voor de monitoring van glycemie bij diabetespatiënten en wordt gebruikt als risico-merker voor chronische complicaties bij type I en type II diabetes. Deze merker wordt gebruikt om de therapie aan te passen en om de patiënt te begeleiden in het correct naleven van het dieet. In 2011 heeft de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) verklaard dat HbA1c kan gebruikt worden om de diagnose te stellen op voorwaarde dat de apparatuur voor de bepaling van HbA1c aan strenge kwaliteitseisen voldoet, dat de testen gestandaardiseerd worden en dat er geen interferentie is met andere condities van de patiënt (Lenters-Westra et al., 2012).

De endocrinologen van het AZ Sint-Jan vragen een snelle HbA1c analyse, waardoor de diabetespatiënt bij consultatie in een zo kort mogelijke tijd het resultaat van het onderzoek kent. Het huidige toestel Menarini HA-8160 komt niet tegemoet aan deze vraag en is aan vervanging toe. De bachelorproef is daarom gewijd aan de evaluatie en de vergelijking van vier nieuwe toestellen voor de bepaling van HbA1c, namelijk Menarini HA-8180, Bio-Rad D-100, Tosoh G8 en Sebia Capillarys 2 Flex piercing. De eerste drie maken gebruik van de ionenuitwisselingschromatografie, terwijl de laatste gebaseerd is op de capillaire elektroforese. Deze toestellen worden gedurende twee weken ter beschikking gesteld om op allerlei stalen analyses uit te voeren en de toestellen te beoordelen volgens een op voorhand opgestelde lijst met beoordelingscriteria. Kwantitatieve criteria zijn de juistheid, de herhaalbaarheid, de lineariteit, de correlatie met het huidige toestel Menarini HA-8160 en de carry-over. Verder worden de functies van elk toestel onderling vergeleken, met onder andere de interferentie met Hb-varianten, de mogelijkheid om gelijktijdig de HbA2-concentratie te bepalen en de minimale doorlooptijd voor het meten van één of een reeks stalen. Als laatste komen een aantal subjectieve criteria aan bod, zoals de gebruiksvriendelijkheid, de complexiteit, de foutdiagnose en de stabiliteit van het toestel.

Finaal moet dit het AZ-Sint-Jan toelaten om een gefundeerde toestelkeuze te maken.

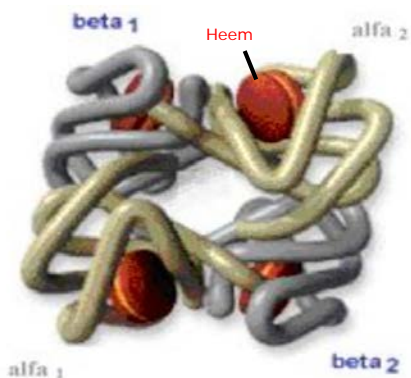
## 2. Literatuurstudie

### 2.1. Hemoglobine als merker van diabetes

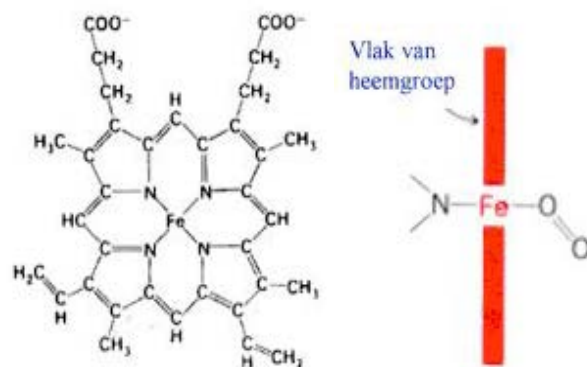
Hemoglobine A1c wordt beschouwd als de belangrijkste merker voor het vaststellen van diabetes en de monitoring van glycemie bij diabetespatiënten. Deze merker geeft een beeld van de concentratie aan glucose in het bloed over een langere periode, dit in tegenstelling tot andere meetmethodes die enkel informatie over de actuele toestand geven.

#### 2.1.1. Hemoglobine

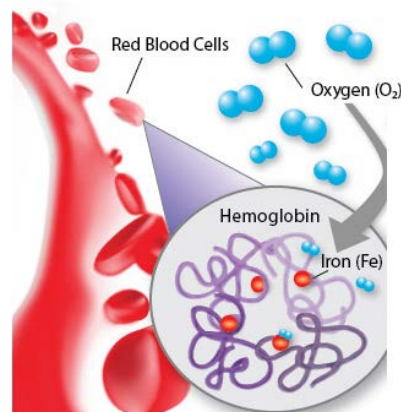
Hemoglobine is het proteïne in rode bloedcellen dat zuurstof van de longen naar de verschillende weefsels in het lichaam transporteert en op zijn beurt koolstofdioxide van de weefsels terugvoert naar de longen. Hemoglobine bestaat uit vier sub-eenheden, twee alfa- en twee beta-ketens, die onderling verbonden zijn (figuur 1) (Davis, 2015). Ondanks lichte verschillen tussen de alfa- en de beta-ketens hebben ze ieder een complexe organische verbinding die centraal een ijzeratoom (Fe) bevat (figuur 2). Deze verbinding wordt de heemgroep genoemd, die van uitzonderlijk belang is voor de werking van het eiwit aangezien moleculaire zuurstof zich via de heemgroep aan hemoglobine bindt en dus zorgt voor het transport van zuurstof (figuur 3). Wanneer mutaties optreden in de beta-keten van hemoglobine ontstaan hemoglobine-varianten, die in paragraaf 2.1.4.1 worden besproken (Hemoglobine, 2016).



Figuur 1: Hemoglobine bevat 2 alfa- en 2 beta-ketens en een heem-groep (Hemoglobine, 2016)



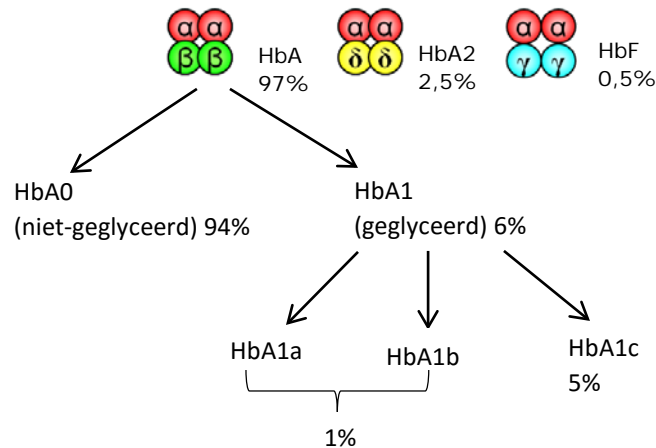
Figuur 2: Heem-groep met centraal een Fe-atoom (Hemoglobine, 2016)



Figuur 3: Opname van zuurstof door binding met Fe-atoom (Davis, 2015)

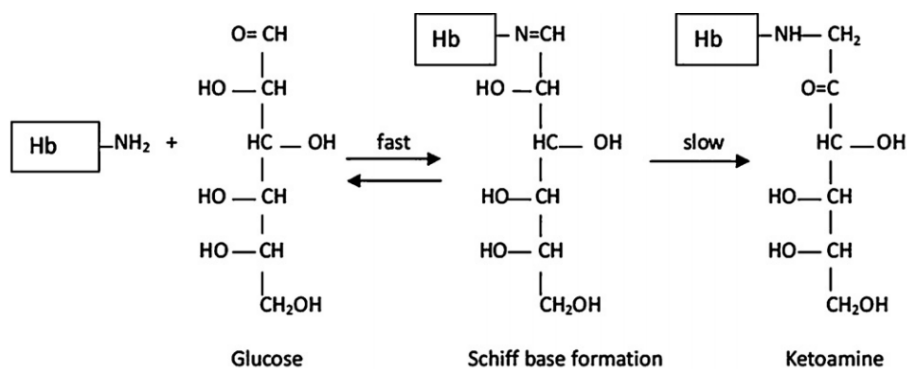
## 2.1.2. HbA1c

Bij gezonde individuen bestaat hemoglobine uit ongeveer 97% volwassen hemoglobine (HbA), 2.5% HbA2 en 0.5% foetaal hemoglobine (HbF). Normaal is 94% van de HbA niet-geglyceerd en 6% geglyceerd. Glycohemoglobine is de algemene term voor hemoglobine-glucose complexen, waarbij glucose gebonden is aan de alfa- of aan de beta-keten van hemoglobine. Het meest voorkomende complex is HbA1c (ongeveer 5%), terwijl HbA1a en HbA1b samen 1% vertegenwoordigen (figuur 4) (Lenters-Westra et al., 2012). Bij HbA1a zijn fructose 1,6-difosfaat en glucose 6-fosfaat gebonden aan de 'N-terminal' van de beta-keten. Bij HbA1b wordt pyrodruivenzuur aan de 'N-terminal' valine van de beta-keten gebonden (Chandrashekar, 2014).



Figuur 4: Hemoglobine types van gezonde volwassenen (eigen bewerking van Lenters-Westra et al., 2012)

HbA1c wordt gevormd door een niet-enzymatische reactie van glucose en de 'N-terminal' valine van één of beide beta-ketens van HbA. In het begin is de reactie tussen glucose en hemoglobine omkeerbaar (Schiff-base of labiele HbA1c), maar eens de Amadori-herschikking plaatsvindt, evolueert deze labiele vorm naar de stabiele ketoamine (HbA1c). De Schiff-base schommelt mee met de bloedglucose en is daardoor geen lange, maar een korte termijn parameter (reactievergelijking 1) (Lenters-Westra et al., 2012).



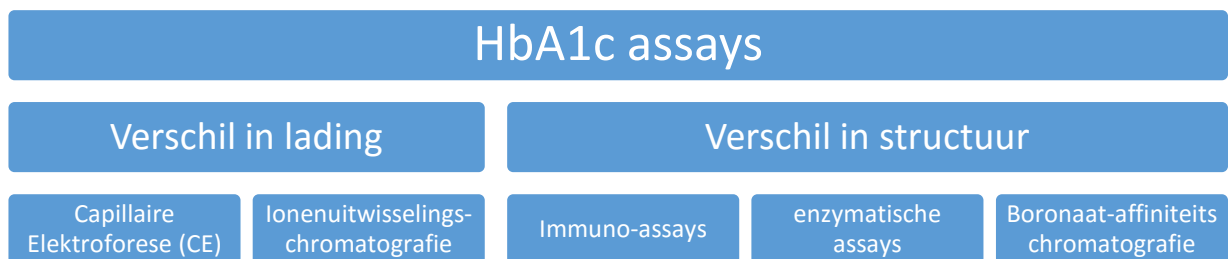
Reactievergelijking 1: ontstaan van versuikerd hemoglobine (stabiele ketoamine) (Lenters-Westra et al., 2012)

De vorming van HbA1c hangt af van de concentratie aan glucose in het bloed en de levensduur van de rode bloedcellen. Deze bedraagt 39 tot 56 dagen met een maximum van 120 dagen. De evolutie van de aanmaak van de rode bloedcellen geeft ook de evolutie van de glucose in het bloed weer: 50% is het gevolg van de glucose opname in de laatste 30 dagen, 40% van de vorige 31-90 dagen en 10% van de 91-120 dagen (Lenters-Westra et al., 2012).

Sinds 2010 is de eenheid voor de HbA1c-concentratie mmol/mol. Voorheen werd de concentratie uitgedrukt in procent. Het verband tussen beide waarden wordt gegeven door de formule: nieuwe waarde (mmol/mol) = 10.93 x oude waarde (%) – 23.5 mmol/mol (Wens J., Van Crombrugge P., 2016). Bij gezonde personen is de HbA1c-waarde lager dan 53 mmol/mol (7%). Dit betekent dat de bloedsuikers gemiddeld tussen de 6 en 9 mmol/l liggen. Voor een gemeten HbA1c hoger dan 53 mmol/mol dient een behandeling te worden ingesteld om toekomstige complicaties van diabetes te voorkomen. Wanneer tijdens regelmatige controles het niveau boven deze grens ligt of wanneer het niveau tussen twee metingen schommelt met meer dan 5 mmol/mol moet de therapie worden aangepast. Het wordt aangeraden om stabiele patiënten twee maal per jaar te controleren, terwijl patiënten met continu verhoogde waarden of sterk schommelende waarden minimaal vier maal per jaar te controleren (Lenters-Westra et al., 2012).

### 2.1.3. Standaardbepaling van HbA1c

Momenteel zijn er 30 verschillende assays beschikbaar, die op twee verschillende principes steunen. De ionenuitwisselingschromatografie (HPLC) en de capillaire elektroforese (CE) zijn gebaseerd op het principe “verschil in lading”, terwijl bij immunoassays, enzymatische assays en boronaat chromatografie assays het principe “verschil in structuur” toegepast wordt (figuur 5) (Lenters-Westra et al., 2012). Het principe “verschil in lading” wordt gedetailleerd besproken, omdat de vier geselecteerde toestellen hierop gebaseerd zijn.



Figuur 5: Schema standaardmethoden ter bepaling van HbA1c

De scheiding door “verschil in lading” laat toe om een oplossing te scheiden volgens de specifieke lading van de moleculen in de oplossing. De extra negatieve lading, die ontstaat wanneer glucose zich bindt aan de ‘N-terminal’ van de beta-keten van HbA, zorgt ervoor dat de hemoglobine met glucose sneller zal migreren (Lenters-Westra et al., 2012).

Bij kationuitwisselingschromatografie worden de geladen hemoglobines en andere componenten van de kolom op verschillende tijdstippen geëluëerd, volgens de lading van de moleculen in verhouding tot de stijgende ionensterkte wanneer ze langs een kationuitwisselingskolom passeren (M. Bird, 1989). Bij capillaire elektroforese migreren elektrisch geladen deeltjes, indien geplaatst in een elektrisch veld, in de richting van de omgekeerd gepolariseerde elektrode. De scheiding hangt af van de lading en dus de bewegingssnelheid van het deeltje (Pláteník, 2008).



## 2.1.4. Interfererende factoren tijdens de HbA1c bepaling

Bepaalde factoren kunnen met de HbA1c bepaling interfereren. Het gaat voornamelijk over hemoglobine varianten, verhoogde foetale hemoglobine, alfa- en beta-thalassemie en chemisch gemodificeerde derivaten (Interference HbA1c, 2016).

### 2.1.4.1. Hemoglobine varianten

Hemoglobine bestaat uit vier eiwitketens, namelijk twee alfa- en twee beta-ketens. Het HBB-gen codeert de beta-ketens. Mutaties van dit gen doen hemoglobine varianten ontstaan. De meest voorkomende hemoglobine varianten zijn HbS, HbC, HbD en HbE. Deze varianten komen in meer of mindere mate voor in bepaalde bevolkingsgroepen. De aanwezigheid van deze varianten verandert de ionenlading van de hemoglobine molecule, wat met de ionenuitwisselingschromatografie kan interfereren. Het vermogen om varianten van HbA af te scheiden is dus een belangrijke parameter in de beoordeling van de toestellen. Op het chromatogram zijn de varianten zichtbaar als een abnormale piek. Er wordt geschat dat wereldwijd 12 miljoen mensen met diabetes ook lijden aan één of andere hemoglobine-variante. Dit aantal zou stijgen tot 26 miljoen in 2030, wat aantoont dat deze groep significant is (R. Little & L. Roberts, 2009).

**HbS** is een variante van HbA en wordt veroorzaakt door een aminozuur substitutie van glutaminezuur naar valine op positie 6 van de beta-keten (R. Little & L. Roberts, 2009). Hemoglobine S veroorzaakt sikkelcelanemie, genoemd naar de vorm van de rode bloedcel (sikkel). Sikkelcelanemie is een aangeboren aandoening die overgeërfd wordt als beide ouders drager zijn van dit gen. Sikkelcelanemie komt voornamelijk voor bij mensen van Afrikaanse oorsprong (Sickel Cell Disease, 2012).

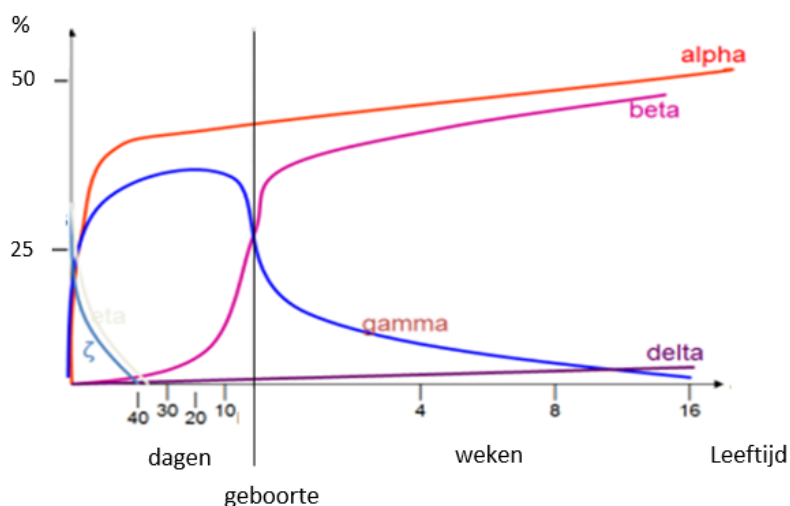
**HbC** is een variante van HbA en wordt veroorzaakt door een aminozuur substitutie van glutaminezuur naar lysine op positie 6 van de beta-keten. Deze aandoening wordt enkel overgedragen als beide ouders drager zijn van het gen. Patiënten lijden voornamelijk aan anemie. Hemoglobine C komt voor bij mensen van Afrikaanse oorsprong. Het gen is aanwezig bij 2 tot 3 % van de zwarte bevolking in de VS (A. Mitton, 2014).

**HbE** is een variante van HbA en wordt veroorzaakt door een aminozuur substitutie van glutaminezuur naar lysine op positie 26 van de beta-keten. Patiënten kunnen lijden aan microcytose. Hemoglobine E treft voornamelijk mensen in Zuid-Oost Azië (Vichinsky, 2007).

**HbD** is een variante van HbA en wordt veroorzaakt door een aminozuur substitutie van glutaminezuur naar glutamine op positie 121 van de beta globine-keten. HbD kan een lichte vorm van hemolyse of anemie induceren. Het wordt aangetroffen in Noord-West India in de Punjab-regio (De Souza Torres et al., 2015).

### 2.1.4.2. Verhoogd gehalte HbF

HbF bestaat uit 2 alfa- en 2 gamma-ketens en is sterk aanwezig in het bloed van de foetus. Bij een normale evolutie zal vanaf de geboorte het niveau van 60% à 95% dalen naar slechts 1% bij volwassenen (figuur 6). Indien een verhoogde HbF bij volwassenen optreedt, kan dit veroorzaakt worden door bepaalde ziekten, zoals thalassemie, anemie of leukemie, of door het verder aanmaken van HbF tot aan de volwassenheid. Dit verhoogde HbF-gehalte kan interfereren met de HbA1c-bepaling (R. Little & L. Roberts, 2009).



Figuur 6: Evolutie van HbF naar HbA van de foetus tot 16 weken na de geboorte (eigen bewerking van Menarini Diagnostics, 2014)

### 2.1.4.3. Alfa en beta thalassemie

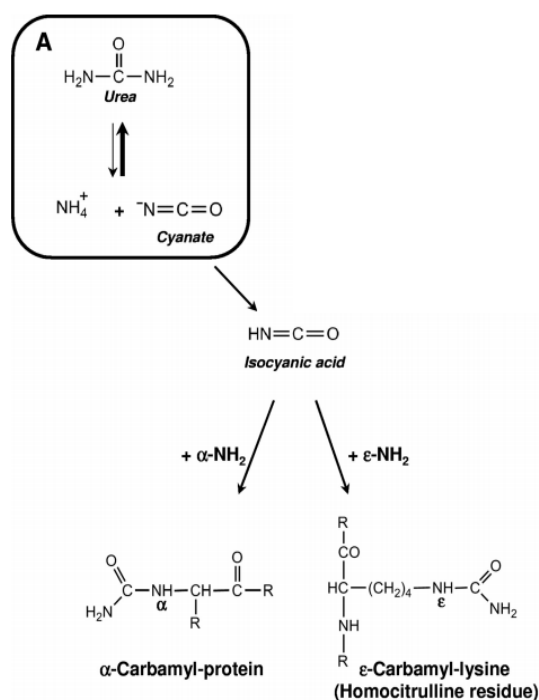
Alfa thalassemie wordt veroorzaakt door een deletie of een mutatie van één tot vier alfa globine genen. Hoe meer genen aangetast zijn, hoe minder alfa globine door het lichaam geproduceerd wordt. Van zodra drie genen aangetast zijn, wordt de ziekte HbH genoemd. Door de gereduceerde aanmaak van alfa globine ketens is er een verhoogd aantal beta-ketens. Deze vorm kan leiden tot ernstige symptomen, zoals anemie. HbH wordt voornamelijk in Zuid-oost Azië, het Midden-Oosten en Afrika aangetroffen. Wanneer vier genen betrokken zijn, worden geen alfa-ketens en dus ook geen hemoglobine aangemaakt, met vroegtijdige sterfte als gevolg.

Beta thalassemie wordt veroorzaakt door mutaties in één of beide beta globine genen. De ernst hangt af van welke mutatie aanwezig is en in welke mate er een verminderde beta globine productie plaatsvindt. Door een te sterke daling van het aantal beta-ketens wordt de productie van normale hemoglobine (HbA) verhinderd. Beta thalassemie komt voor in Afrika en Zuid-Oost Azië. Andere vormen van Thalassemie ontstaan wanneer een gen voor beta thalassemie samen met een gen voor een Hb-variante worden overgeërfd. Voorbeelden zijn HbE-beta thalassemie en HbS-beta thalassemie.

Personen met beta-thalassemie hebben meestal hogere percentages aan HbF en verhoogde fracties van HbA2. Deze hebben invloed op de bepaling van HbA1c. Het gelijktijdig bepalen van HbA2 en HbA1c, zonder te moeten wisselen van meetprocedure, is daarom een belangrijk voordeel (thalassemia, 2016).

#### 2.1.4.4. Chemisch gemodificeerde derivaten

Ureum heeft de eigenschap in vivo spontaan te splitsen in ammoniak en cyanaat. Protonering van cyanaat leidt tot de vorming van isocyaanzuur, dat reageert met de alfa- en epsilon-aminogroepen van proteïnen, die een carbamyl-groep vormt. De 'N-terminal' valine van de hemoglobine beta-keten is bijzonder reactief met isocyaanzuur, wat leidt tot de vorming van stabiele carbamyl-hemoglobine. Eerdere studies hebben aangetoond dat 1 mmol/l ureum in vivo wordt geassocieerd met de vorming van 0.063 % carbamyl-hemoglobine. Uremische patiënten kunnen hoge carbamyl-hemoglobine concentraties hebben, tot 3% van de totale hemoglobine (reactievergelijking 2), aangezien carbamyl-hemoglobine een vergelijkbaar iso-elektrisch punt heeft als HbA1c kan het interfereren bij de bepaling van HbA1c met behulp van ionenuitwisselingschromatografie (Bry, C. Chen & B. Sacks, 2001).



*Reactievergelijking 2: ontstaan van hoge carbamyl-hemoglobine concentraties die de levensduur van de rode bloedcellen verkort en de HbA1c-metingen beïnvloedt (Jaisson, Pietrement & Gillery, 2011).*

## 2.2. Technieken voor HbA1c bepaling

De HbA1c-concentratie kan enkel nauwkeurig worden bepaald door de hemoglobinefracties van elkaar te scheiden. Bij de te valideren toestellen wordt de scheiding gerealiseerd door ionenuitwisselingschromatografie (HPLC) of capillaire elektroforese (CE). Deze technieken worden in dit hoofdstuk verder toegelicht.

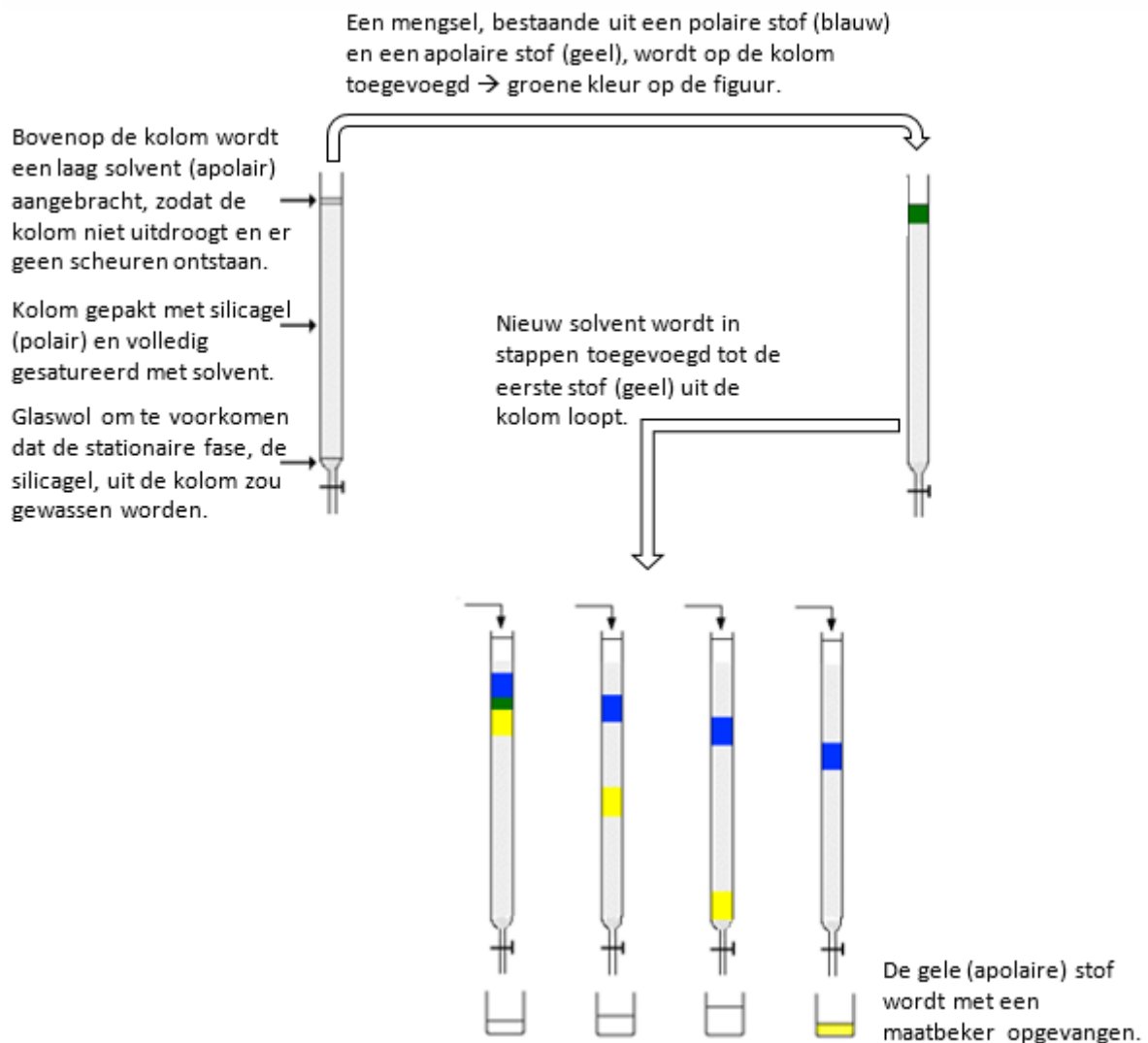
## 2.2.1. Ionenuitwisselingschromatografie

De ionenuitwisselingschromatografie is een scheidingstechniek die op de kolomchromatografie gebaseerd is. Door onder hoge druk de scheiding te laten verlopen, worden de resultaten nog vlugger en efficiënter verkregen.

### 2.2.1.1. Kolomchromatografie

Het principe van de normale fase (of omgekeerde fase) kolomchromatografie is gebaseerd op de polariteitseigenschappen van verschillende stoffen. Bij een normale fase wordt een apolair solvent gebruikt als mobiele fase. In combinatie met een polaire stof als stationaire fase elueren de apolaire elementen in het staal aanwezig, eerder uit de kolom dan de polaire elementen. Bij de omgekeerde fase kolomchromatografie wordt een polair solvent gebruikt en elueren eerst de polaire elementen uit de kolom (Clark, 2007).

De verschillende stappen van de normale fase kolomchromatografie worden in figuur 7 weergegeven: op een kolom wordt eerst de stationaire fase, daarna het staal en als laatste de mobiele fase toegevoegd. De mobiele fase drupt uit de kolom onder normale druk van 1 atm (Clark, 2007).



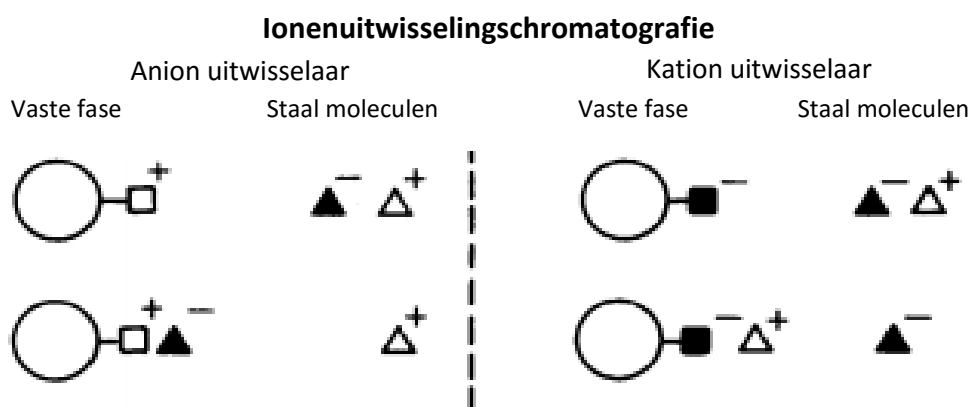
Figuur 7: principe normale fase kolomchromatografie (eigen bewerking van Clark, 2007).

### 2.2.1.2. Hoge druk vloeistofchromatografie (HPLC)

De hoge druk vloeistofchromatografie (HPLC) biedt heel wat voordelen. De druk op de kolom kan verhoogd worden tot 400 atm, waardoor het staal veel sneller kan geanalyseerd worden (Clark, 2007). Door de hogere druk zal de mobiele fase immers vlugger door de kolom elueren en zal de scheiding aan een hogere snelheid plaatsvinden. De kolom, die gebruikt wordt bij HPLC, bevat bovendien partikels die veel kleiner zijn. Daardoor is het oppervlak aanwezig in de kolom veel groter waardoor de elementen in het staal zich beter aan de stationaire fase kunnen binden (M. Bird, 1989).

### 2.2.1.3. Ionenuitwisselingschromatografie

Er bestaan meerdere versies van HPLC. Tijdens de bachelorproef worden enkel toestellen geëvalueerd met een HPLC van het type ionenuitwisselingschromatografie. Bij een ionenuitwisselingschromatografie bevat de stationaire fase als pakkingsmateriaal anionen of kationen. Indien de kolom gepakt wordt met anionen binden positief geladen stoffen zich op de kolom. Omgekeerd binden negatief geladen stoffen zich aan de kolom, indien deze gepakt wordt met kationen (figuur 8). Aan de hand van de ionisatie en de mate van affiniteit voor de kolom, kunnen specifieke stoffen of elementen bepaald worden (in dit geval soorten hemoglobine). Na toevoeging van een buffer met specifieke zuurtegraad elueren deze door hun specifieke lading of ionisatie met een verschillende snelheid van de kolom. Daarna gaan deze stoffen langs een detector. Door het verschil in retentietijd is het mogelijk om de stoffen te scheiden. Kwantificatie gebeurt op basis van piekoppervlakte (M. Bird, 1989).



Figuur 8: In de linker kolom de anion uitwisselaar waarbij de kolom gepakt is met positief geladen deeltjes, met retentie van de negatieve geladen moleculen uit het staal. In de rechter kolom de omgekeerde werking (eigen bewerking van M. Bird, 1989).

### 2.2.2. Capillaire elektroforese

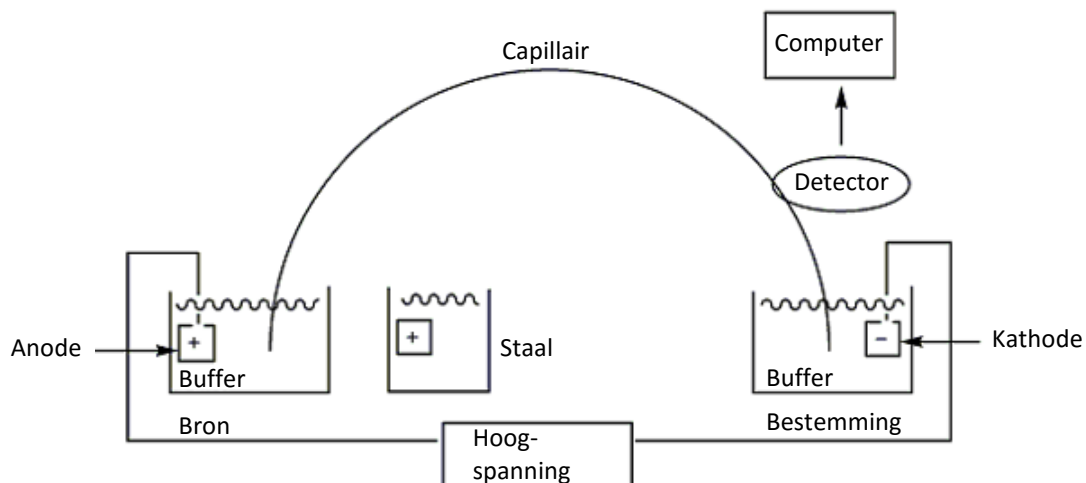
Bij capillaire elektroforese wordt de scheidingstechniek die op de elektroforese gebaseerd is, verder geoptimaliseerd door gebruik te maken van zeer dunne en lange capillairen. Daardoor kan het resultaat van de scheiding vlugger en met minder staal verkregen worden. De elektroforese en meer specifiek de capillaire elektroforese worden hierna toegelicht.

#### 2.2.2.1. Elektroforese

Elektroforese is een techniek die gebaseerd is op het bewegen van deeltjes (ionen, moleculen) doorheen een elektrisch veld in een vloeibaar medium. Elk elektrisch geladen deeltje in een waterige oplossing zal, indien het geplaatst wordt in een elektrisch veld, migreren in de richting van de omgekeerd gepolariseerde elektrode. De bewegingssnelheid zal proportioneel toenemen met de aangelegde spanning en de lading van het deeltje, maar afnemen met de grootte van het deeltje, daar dit door wrijving wordt afgeremd. De neutrale elementen worden door het elektrisch veld niet beïnvloed. Het scheiden van alle deeltjes met een verschillende grootte en een verschillende lading is op dit principe gebaseerd. Deze scheiding kan gebeuren voor kationen, anionen, organische zuren, aminozuren, peptides en proteïnen (Plátenik, 2008).

#### 2.2.2.2. Capillaire elektroforese

Bij capillaire elektroforese (CE) gebeurt de scheiding in zeer dunne (10-100  $\mu\text{m}$ ) en lange (20-200cm) gefuseerde silica capillairen, die met een elektrolyt gevuld worden. Het capillair is aangebracht tussen twee buffervaatjes met de elektroden, die met een hoogspanningsbron worden verbonden (figuur 9). De capillairen zijn aan de buitenkant bedekt met een beschermende polyimidelaag zodat de capillairen minder gemakkelijk breken. Bij de meest gebruikte detectiemethoden, namelijk ultraviolet- en fluorescentiespectroscopie, wordt een klein deel van de polyimidelaag aan één van de uiteinden van het capillair verwijderd, zodat "on-column" detectie mogelijk is. Het gebruik van capillairen heeft twee belangrijke voordelen. Enerzijds wordt de warmte, die vrijkomt met het aanleggen van de elektrische stroom, efficiënt verwijderd door de kleine diameter van het capillair. Anderzijds kan het volledige proces geautomatiseerd worden. Sommige instrumenten worden met een temperatuurregelsysteem uitgerust om reproduceerbare resultaten te verzekeren. De scheiding van het staal is immers afhankelijk van de elektroforese mobiliteit, die ook afhankelijk is van de viscositeit van de oplossing. De viscositeit daalt wanneer de temperatuur van de kolom stijgt (Precissi, z.j.)



Figuur 9: Schematische weergave van de experimentele setup van een capillaire elektroforese (eigen bewerking van Precissi, z.j.)

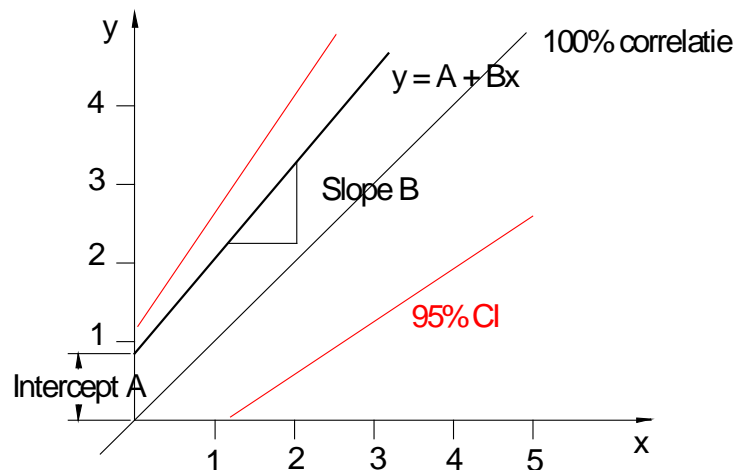
### 2.3. Kwantitatieve validatie

De validatie van de vier HbA1c-analyzers dient om na te gaan in hoeverre deze toestellen beantwoorden aan het vooropgestelde doel, namelijk het correct en snel bepalen van de HbA1c-concentratie. Voor deze validatie worden een aantal gestandaardiseerde testen uitgevoerd. De analyzer Menarini HA-8160 wordt als comparator toestel gebruikt. Voor de juistheid of bias wordt het criterium American Diabetes Association (ADA) toegepast, terwijl voor de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid de criteria International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) worden gehanteerd.

- a. De **juistheid** of bias van elk toestel en het comparator toestel: de mate van overeenstemming tussen de gemiddelde van een reeks testen en de correcte waarde van de gekalibreerde Stichting Kwaliteit Medische Laboratoria (SKML)-controles (klaessens, 2012).
- b. De **herhaalbaarheid** of de mate van overeenstemming van opeenvolgende metingen onder dezelfde omstandigheden. De metingen worden binnen één run uitgevoerd door dezelfde analist met dezelfde meetapparatuur. Een staal moet minimaal acht maal worden geanalyseerd (klaessens, 2012).
- c. De **reproduceerbaarheid** of de mate van overeenstemming van opeenvolgende metingen onder wisselende omstandigheden. Wisselende omstandigheden zijn bijvoorbeeld andere operatoren en verschillende runs (klaessens, 2012).
- d. **Carry-over** testen worden uitgevoerd om te achterhalen in hoeverre de toestellen gevoelig zijn voor carry-over van voorgaande proefstalen op de opvolgende metingen.
- e. De **lineariteit** geeft de rechtlijnigheid weer van de testresultaten voor een reeks stalen met een lineair toenemende concentratie.
- f. De **correlatie** van de nieuwe toestellen in vergelijking met het huidig toestel wordt bepaald voor minimaal 100 stalen. (klaessens, 2012)  
Voor de correlatie worden de Passing-Bablok regressie (zie par. 2.3.1) en de Bland-Altman Plot (zie par. 2.3.2) toegepast.

### 2.3.1. Passing-Bablok regressie

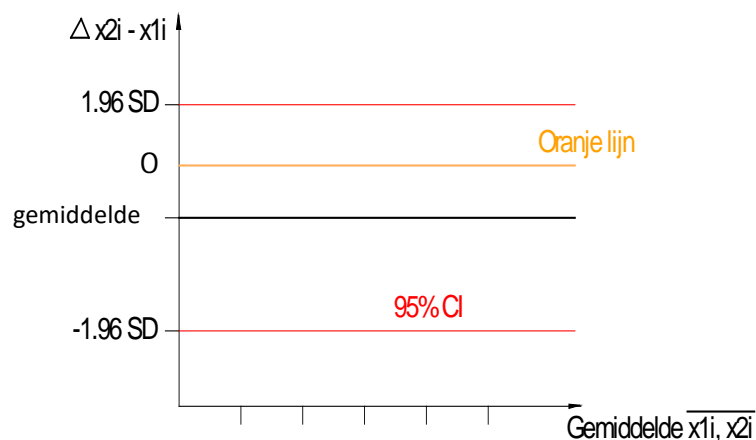
De correlatie tussen twee geselecteerde reeksen (methoden) kan aangetoond worden met de Passing-Bablok regressie. Naast de regressie worden ook de grenzen voor Intercept A en Slope B bij een zekerheidsinterval (confidence interval CI) van 95% berekend (figuur 10). De berekening laat toe twee methoden te vergelijken op constante en/of proportionele afwijking. Indien de Intercept A=0 en de slope B=1 in het berekende interval liggen, kan gesteld worden dat beide methoden gelijkwaardig zijn en deze onderling uitwisselbaar zijn. Indien A= 0 niet in het 95% interval van Intercept A ligt, kan worden geconcludeerd dat er een beduidende constante afwijking is tussen beide methoden. Indien B= 1 niet in het 95% interval van Slope B ligt, is er een proportionele afwijking tussen beide methoden.



Figuur 10: Theoretische Passing-Bablok met een confidence interval van 95%

### 2.3.2. Bland-Altman plot

De Bland-Altman plot is een grafische methode om twee meettechnieken met elkaar te vergelijken. Op de x-as wordt het gemiddelde van twee metingen gezet, terwijl op de y-as het verschil tussen beide metingen komt. Boven en onder het gemiddelde worden de grenzen getoond, namelijk  $-1.96 \times$  standaardafwijking en  $+1.96 \times$  standaardafwijking (confidence interval 95%). Indien de oranje lijn (nullijn) niet in dit interval ligt, is er onvoldoende correlatie tussen beide methoden (figuur 11).



Figuur 11: Bland Altman plot toont het verschil van een reeks testwaarden als functie van hun gemiddelden met CI=95%. De oranje lijn (nullijn) moet tussen  $+1.96SD$  en  $-1.96SD$  liggen.



## 3. Materialen & Methoden

In deze paragraaf komen naast de gebruikte materialen ook de methoden aan bod, met een overzicht van de gebruikte bloedstalen, een gedetailleerde beschrijving van elk toestel, het validatieplan en de uiteindelijke verwerking en interpretatie van de testresultaten.

### 3.1. Materialen

- Stalen: EDTA 2,7mL Starstedt tubes
- Rek om EDTA tubes in te stockeren
- Frigo (4°C) om rek met EDTA tubes in te stockeren
- Diepvries (-20°C) voor Sebia Capillarys 2 flex piercing hoge en lage HbA1c controles
- Diepvries (-80°C) voor SKML controles
- Maatkolf (1,5L)
- Gedemineraliseerd water
- Handschoenen
- Maatbeker (100mL)
- Afvalcontainer voor menselijke stalen
- Vortex
- Tips
  - o 2-20µL
  - o 10-100µL
  - o 100-1000µL
  - o 500µL-5mL
- Micropipet
  - o 2-20µL
  - o 10-100µL
  - o 100-1000µL
  - o 500µL-5mL
- Voor overige materialen per toestel alsook de SKML controles wordt verwezen naar bijlage 1: Materialen

### 3.2. Methoden

De validatie van de vier toestellen gebeurt aan de hand van geselecteerde bloedstalen. Voor de bias worden de SKML-controle stalen getest. De lineariteit, de carry-over testen en de correlaties worden uitgevoerd met routine stalen van patiënten. De herhaalbaarheid wordt getoetst met zowel een bloedstaal van een laborant (normaal HbA1c) als een routine staal (pathologisch verhoogd HbA1c). Voor de reproduceerbaarheid worden het bloedstaal van de laborant (normaal HbA1c) en de controle stalen van de fabrikanten (pathologisch verhoogd HbA1c) toegepast. De routine stalen, waaronder een aantal stalen met een Hb-pathie, van de patiënten zijn eveneens op de huidige Menarini HA-8160 bepaald. De andere stalen worden enkel op de nieuwe toestellen verwerkt.

#### 3.2.1. Gebruikte toestellen

Voor de validatie zijn volgende toestellen ter beschikking: het comparator toestel Menarini HA-8160 en de vier te valideren toestellen Menarini HA-8180, Bio-Rad D-100, Tosoh G8 en Sebia capillarys 2 flex piercing. Hierna volgt een gedetailleerde beschrijving van de werking en de software met rapporteringen van elk toestel.

### 3.2.1.1. Menarini HA-8160

#### Beschrijving toestel

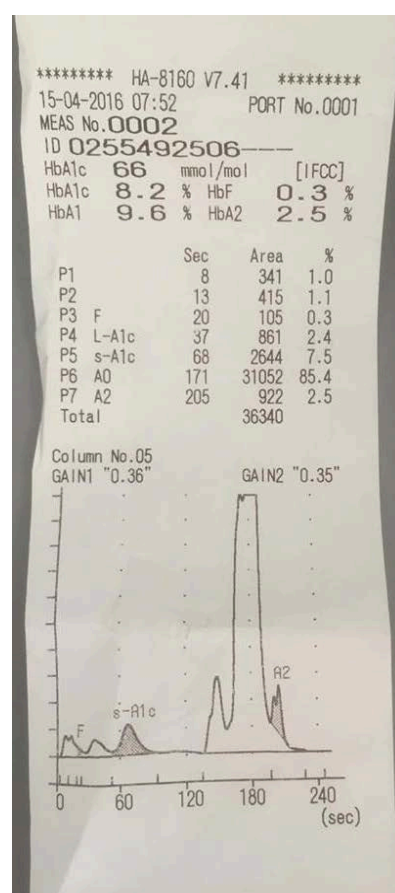
De Menarini HA-8160 (figuur 12) is een HbA1c-analyzer die op de omgekeerde fase kationuitwisselingschromatografie gebaseerd is (Thoelen, 2004). Dit toestel is in het AZ-Sint-Jan sinds 2002 in gebruik. Daar de resultaten erg betrouwbaar zijn, is beslist dit toestel te gebruiken voor de evaluatie en het vergelijken van de andere toestellen. De software laat toe de gemeten waarden (HbA1c, HbF en HbA2) naar de computer van het laboratorium (het LIS) te zenden.

#### Rapporten

De chromatogrammen worden direct na de analyse afgedrukt (figuur 13). Ze kunnen niet worden opgeslagen of doorgestuurd. In het AZ worden daarom alle chromatogrammen in een doos verzameld, die op maandbasis worden geklasseerd. Dit resulteert in tijdverlies door het vele zoekwerk en is achterhaald in het huidige digitale tijdperk.



Figuur 12: Comparator Menarini HA-8160



Figuur 13: voorbeeld chromatogram

### 3.2.1.2. Menarini HA-8180

#### Beschrijving toestel

De Arkay ADAMS Menarini HA-8180V (figuur 14) is gebaseerd op de omgekeerde fase kationuitwisselingschromatografie (Menarini Diagnostics, z.j.). De kolom bevat een ingebouwde pre-filter om ongewenste stoffen die de analyse kunnen verstoren vooraf te elimineren. Alle volbloed stalen worden voor de analyse gemengd met een speciale roereenheid. Een minimale hoeveelheid van 14 µl bloed is nodig voor de test. Elk rek is gemerkt met een streepjescode, die specifieke testparameters weergeeft. Dankzij een STAT-poort kan een dringende test worden uitgevoerd terwijl het systeem al werkt. HbA2 kan simultaan met HbA1c bepaald worden, zonder van modus te moeten veranderen. De gescheiden hemoglobine fracties passeren de LED fotometer flow cell, waar het apparaat wijzigingen in absorptie van 420nm en 500nm meet (Menarini Diagnostics, z.j.).



Figuur 14: Menarini HA-8180V-opstelling; 1: LCD-scherm, 2: reagentia, 3: STAT-positie, 4: printer, 5: invoer rek met stalen, 6: kolom/pre-filter, 7: aan-knop

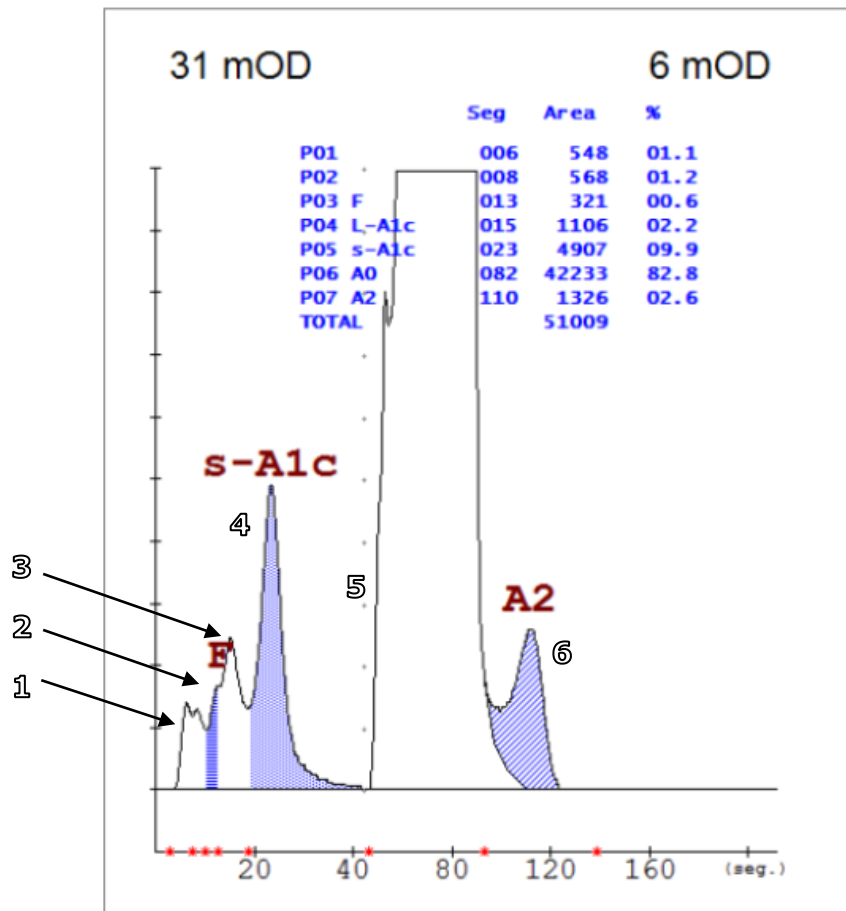
#### Beheersoftware: Menasoft

Menasoft is een management systeem voor het beheer van de resultaten van stalen. Dit systeem laat toe om te communiceren met het informaticasysteem van het labo (LIS). Stalen worden gesorteerd volgens data of volgens ID (Menarini Diagnostics, z.j.).

## Rapporten

De testresultaten worden afgedrukt met HbF-, HbA1c-, HbS- en HbC-pieken, met aanduiding van HbD- en HbE-varianten en de HbA2 (figuur 15).

**HbA1 12.2 %**  
**HbA1c 09.9 %**  
**HbF 00.7 %**  
**HbVar -**  
**IFCCd 85 mmol/mol**



Figuur 15: Chromatogram verkregen door de menarini HA-8180 voor een pathologisch verhoogd HbA1c staal, 1: Ander HbA, 2: HbF, 3: LA1c, 4: HbA1c, 5: HbA0, 6: HbA2

### 3.2.1.3. Bio-Rad D-100

#### Beschrijving toestel

Het toestel Bio-Rad D-100™ (figuur 16) is gebaseerd op het scheiden van hemoglobinefracties door kationuitwisselingschromatografie (HPLC). Volbloed stalen ondergaan voorafgaand aan de HbA1c bepaling een automatische hemolyse en verdunning. Vooraleer de oplossing met de cartridge in aanraking komt, wordt deze met de pre-filter voorbereid. In het laadstation is er plaats voor 10 rekken, elk met 10 posities, voor volbloedtubes van 5 of 7 ml gevuld met minimaal 1ml bloed. Voor stalen met een lager volume kan een oplossing worden voorbereid met minimaal 5 µl volbloed en aangevuld met een was-oplossing van 1.5 ml. Stalen voor spoedopdrachten of kwaliteitscontrole kunnen via de STAT-positie geladen worden. De gescheiden deeltjes passeren de flow cel waar de verschillen in absorptie worden gemeten bij 415nm en worden opgenomen in het digitale chromatogram (Bio-Rad, z.j.).



Figuur 16: Bio-Rad D-100-opstelling: 1: touchscreen, 2: reagentia, 3: STAT-positie, 4: optioneel printer, 5: invoer rek met stalen, 6: kolom/pre-filter, 7: aan-knop

#### Software

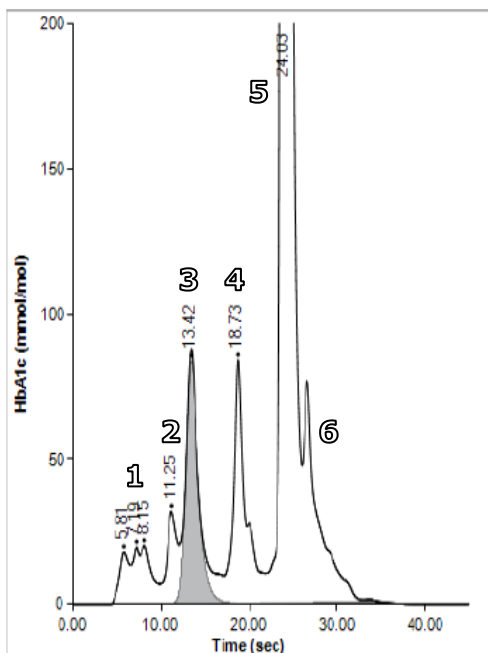
De software zorgt voor een automatische analyse van de hemoglobine pieken, met inbegrip van de retentie tijd, de piekgrootte en de relatieve grootte in procent. De gekozen pieken worden gekalibreerd voor ze in de chromatogram worden opgenomen (Jaisson et al., 2015).

## Rapporten

HbA1c wordt direct na de piek van de labiele fractie van HbA1c (LA1c) en de carbamyl Hb (cHb) en voor de HbA0 geëluëerd (figuur 17). Het gehalte HbA1c is berekend door de gemeten HbA1c te delen door alle HbA-gescheiden fracties. Elke Hb-fractie, die na de HbA0 piek wordt geëluëerd, wordt uitgesloten voor de berekening (Jaisson et al., 2015).

Rack: U13      Position: 8      HbA1c: **83.8 mmol/mol**  
 9.82 % NGSP  
 Run Date/Time: 03-Mar-2016 08:35:08

Note:      Comment:



Peak Name	RT	Area	Area%	Concentration (mmol/mol)
A1a	5.81	2906.43	1.28	---
A1b	7.19	2196.66	0.97	---
F	8.15	3858.77	1.70	---
LA1c	11.25	5743.28	2.53	---
HbA1c	13.42	18277.62	---	83.8
P3	18.73	17186.66	7.57	---
A0	24.03	176797.42	77.90	---

Total Area: 226967

Status: **Held**

Figuur 17: Chromatogram verkregen door de Bio-Rad D-100 voor een pathologisch verhoogd HbA1c staal. 1: Other HbA, 2: LA1c/cHb, 3: HbA1c, 4: aged HbA0, 5: HbA0, 6: HbA2

### 3.2.1.4. Tosoh G8

#### Beschrijving toestel

De Tosoh glycohemoglobine analyzer HLC-723G8 (figuur 18) is een glycohemoglobine analyzer die gebruik maakt van kationuitwisselingschromatografie (HPLC). Bij de analyse wordt het bloedstaal (3 $\mu$ l) automatisch verdund met een hemolyse & was-oplossing. Van dit specimen wordt dan een kleine hoeveelheid geïnjecteerd op de TSK-gel G8 variante HSi kolom. De gescheiden hemoglobine fracties stromen langs de LED flow cell, waar het apparaat wijzigingen in absorptie bij 415nm en 510nm meet. Het toestel verwerkt de gegevens en berekent de relatieve percentages van elke hemoglobine fractie. De totale oppervlakte van de SA1c wordt gedeeld door de som van alle oppervlaktes tot en met de A0 om een ruwe SA1c percentage te verkrijgen (R. Little, 2012).



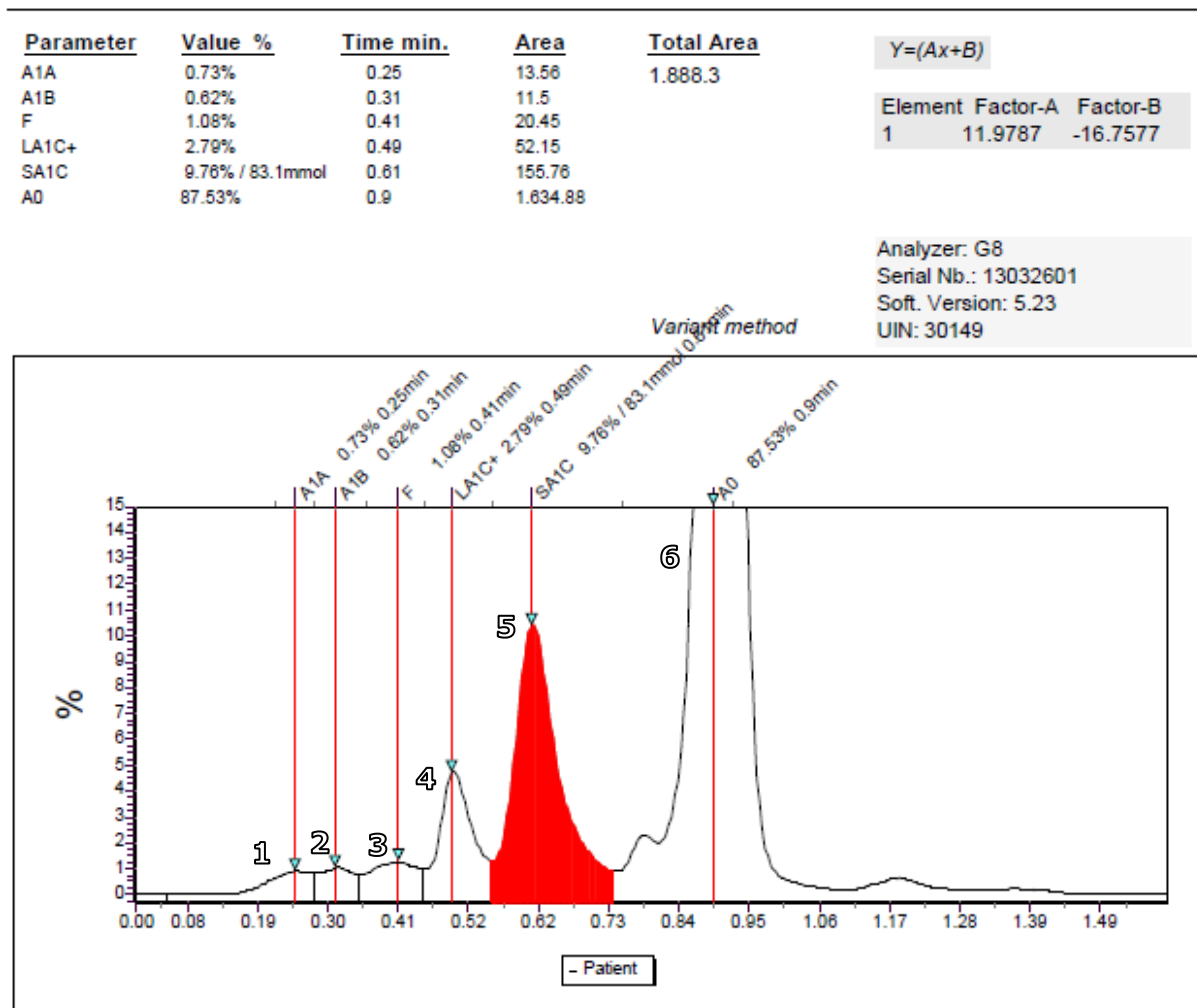
Figuur 18: Tosoh G8-opstelling; 1: touchscreen, 2: reagentia, 3: STAT-positie, 4: printer, 5: invoer rek met stalen, 6: kolom/prefilter, 7: aan-knop

#### Beheersoftware Piano

Het data managementsysteem laat toe de gegevens van de patiënt te beheren. Daarnaast worden persoonlijke en Levey-Jennings grafieken gegenereerd. Op het scherm worden de chromatogrammen getoond, die kunnen afgedrukt of verstuurd worden naar de behandelende arts (Piano, 2016).

## Rapporten

Er wordt automatisch een chromatogram geprint. Een voorbeeld van dergelijk afdruk is te zien in figuur 19.



Figuur 19: Chromatogram verkregen door de Tosoh G8 voor een Pathologisch verhoogd HbA1c staal, 1: HbA1a, 2: HbA1b, 3: HbF, 4: LA1c, 5: HbA1c, 6: HbA0



### 3.2.1.5. *Sebia Capillarys 2 Flex Piercing*

#### **Beschrijving toestel**

Het Sebia Capillarys 2FP toestel (figuur 20) laat naast automatische elektroforesen van proteïnen (serum en urine), het opsporen en kwantificeren van hemoglobine varianten en meer recentelijk ook de HbA1c bepaling toe (Sebia, 2003).

De CAPILLARYS HbA1c kit is gebaseerd op het Capillaire Zone Elektroforese principe, waarbij hemoglobine fracties gescheiden worden door hun lading in een alkalische buffer (pH 9.4). Door deze buffer worden hemoglobines gedetecteerd in de volgorde van kathode naar anode A2/C, E, S, D, F, A0, andere hemoglobine A (HbA) en uiteindelijk A1c. Het Sebia Cap 2FP toestel heeft acht silica capillairen die toelaten om acht analyses ter bepaling van HbA1c simultaan uit te voeren. Minimaal 18 µL van het bloedstaal wordt automatisch verdund (1/6) met een hemolyse oplossing. Het resultaat wordt geïnjecteerd aan de anode-zijde van het capillair door hydrodynamische injectie. Nadien wordt een hoogspannings-proteïne scheiding uitgevoerd, waarbij de hemoglobinefracties aan de kathode-zijde van de capillair aan 415 nm wordt gedetecteerd (Heylen, et al., 2014).



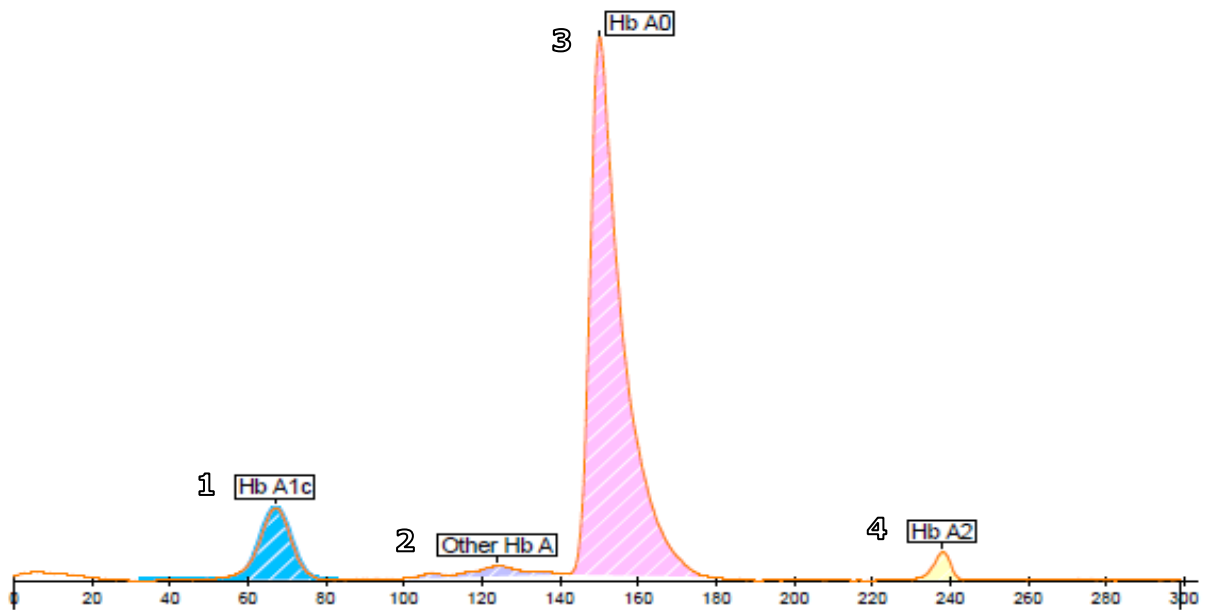
*Figuur 20: Sebia capillarys 2 flex piercing-opstelling; 1: invoer rek met stalen, 2: reagentia, 3: rek met stalen na bepaling, 4: indicator ready*

#### **Beheersoftware Phoresis**

Phoresis wordt gebruikt als operating systeem voor alle Sebia toestellen. Bi-directionele communicatie met de hoofdcomputer van het laboratorium is beschikbaar. Een volledig demografisch profiel van de patiënt wordt bijgehouden in de database (Sebia, 2003).

## Rapporten

Chromatogrammen en rapporten kunnen manueel aangevuld worden met uitgebreide commentaar (figuur 21).



### HbA1c-electroforese

Fracties	%	mmol/mol	Cal. %
Hb A1c	-	86	10.1
Other Hb A	2.8		
Hb A0	83.8		
Hb A2	2.3		

HbA1c % cal : **10.1 %** >

HbA1c mmol/mol : **86 mmol/mol** >

Figuur 21: Chromatogram verkregen door de Sebia Capillarys 2 flex piercing voor een Pathologisch verhoogd HbA1c staal, 1: HbA1c, 2: Other HbA, 3: HbA0, 4: HbA2

### 3.2.2. Validatieplan

De globale beoordeling bevat drie delen, namelijk de beoordeling van de kwantitatieve criteria, de evaluatie van de functionaliteit en de subjectieve waardering. Voor elk deel wordt een samenvattende tabel opgesteld, waarbij het toestel per criterium een score krijgt van 1 (minst presterende) tot 4 (beste toestel). Elk criterium krijgt ook een gewicht (van 1 tot 20) afhankelijk van het relatieve belang van het criterium. Het aandeel van de drie delen wordt procentueel in de eindscore verwerkt.

#### 3.2.2.1. Objectieve criteria

De beoordelingscriteria waaraan de vier toestellen moeten voldoen zijn door het AZ Sint-Jan opgegeven. Voor de juistheid worden de criteria van ADA gebruikt, terwijl voor de herhaalbaarheid en de reproduceerbaarheid de criteria van het IFCC worden gehanteerd.

Tabel 1: gekozen objectieve criteria

Beoordelingscriteria	Criteria	Testmethode per toestel
Juistheid – bias	$d \leq 2$ mmol/mol of $d\% \leq 2.77\%$ voor staal met hoge concentratie (75.1 mmol/mol) en $d\% \leq 5.83\%$ voor staal met normale concentratie (34.3 mmol/mol)	Eén verhoogd en één normaal SKML-staal in triplo meten
Herhaalbaarheid	$CV_h \leq 2.9\%$	Tien maal hetzelfde normaal en verhoogd staal na elkaar meten
Reproduceerbaarheid	$CV_r \leq 2.9\%$	Tien maal hetzelfde normaal en verhoogd staal, twee maal per dag gedurende vijf dagen meten
Carry-over	Geen streefwaarde vooropgesteld	Eén normaal staal, dan één verhoogd staal om nadien drie x hetzelfde normaal staal opnieuw te bepalen
Lineariteit	$R^2 \geq 0.95$	Concentraties van 30, 40, 50, 60, 70 en 80 mmol/mol meten
Correlatie in stalen met en zonder Hb-pathieën	$r \geq 0.975$	123 stalen zonder een Hb-pathie en vijf stalen met een Hb-pathie (1 HbD, 1 HbE, 1 alfa-thalassemie minor, 1 HbS/HbC en 1 homozygote HbS) eerst op het comparator toestel en nadien op de nieuwe toestellen meten
	Passing Bablok regressie: 0 in 95% CI van intercept A 1 in 95% CI van Slope B	
	Bland Altman plot: Nullijn in 95% CI (-1.96 SD tot +1.96 SD rond het gemiddeld absoluut verschil)	

### 3.2.2.2. **Beoordeling van de functionaliteit**

De beoordeling van de functionaliteit omvat een aantal gemeten criteria en een aantal criteria die door de fabrikant zijn beantwoord.

Tabel 2: *Beoordeling van de functionaliteit*

Beoordelingscriteria	Beschrijving
Tijd HbA1c-meting tien stalen	De tijd van opstart van het toestel tot het genereren van de chromatogrammen van tien stalen
Tijd HbA1c-meting één staal	Benodigde tijd voor de bepaling van één staal
Afsluitprocedure toestel	Tijd nodig om toestel af te sluiten
Vervanging reagentia	Al dan niet mogelijk tijdens het verwerken van een vorig staal
Aantal testen per kolom/ capillair	Info fabrikant
Aantal testen per filter	Info fabrikant
Doodvolume volbloed	Info fabrikant
Doodvolume verdunningen	Info fabrikant
Bepaling HbA2	Al dan niet mogelijk. Optimaal indien de bepaling simultaan met HbA1c gebeurt
Interferentie Hb-varianten	Mate van optreden
Interferentie verhoogd HbF	Mate van optreden
Interferentie met carbamyl Hb	Mate van optreden
Mogelijkheid vingerprik test	Functie al dan niet beschikbaar
Aangeven controles liggen correct	Functie al dan niet beschikbaar
Hoeveelheid reagentia tonen	Functie al dan niet beschikbaar
Vergissen rek met verlies teststalen	Beoordelen risico
Automatisch mengen staal	Functie al dan niet beschikbaar
Overlay grafiek van variante	Functie al dan niet beschikbaar
Tonen rest-tijd per staal	Functie al dan niet beschikbaar
Kostprijs reagentia	Rangorde van 1 (goedkoopste) tot 4 (duurste)
Kostprijs van het toestel	Rangorde van 1 (goedkoopste) tot 4 (duurste)

### 3.2.2.3. Subjectieve criteria

Tijdens de validatie van de vier toestellen worden de persoonlijke ervaringen genoteerd en beoordeeld van zwak (1), neutraal (2), goed (3) tot zeer goed (4).

Tabel 3: subjectieve criteria

Beoordelingscriteria	Beschrijving
Eenvoudige bediening	De complexiteit van het toestel bepaalt in hoge mate de vereiste opleiding en de kans op fouten
Software gebruiksvriendelijk	Duidelijke operating functies, beheer van data en communicatie met het hoofdsysteem
Gebruiksvriendelijke touchscreen en menustructuur	De kwaliteit van het touchscreen en de duidelijke menustructuur
Duidelijke chromatogrammen	Laten accurate interpretatie van de analyse toe
Errorgevoeligheid	Al dan niet veelvuldig optreden van fouten
Onderhoudsvriendelijkheid	Aanduiden onderhoud noodzakelijk, resterende tijd gebruik reagentia, kolom, capillairen en eenvoudige spoeling

### 3.2.3. Verwerking

De verwerking van de testresultaten gebeurt met Excel en Medcalc. Het berekenen van het gemiddelde en de standaardafwijking voor de bepaling van de bias, de CV, de lineariteit en de normale distributie worden aan de hand van Excel uitgevoerd. De grafieken en staafdiagrammen worden met Excel gegenereerd. Medcalc wordt toegepast voor de bepaling van de correlatie met de uitvoering van de Passing-Bablok regressies en de Bland-Altman plots. Voor de toegepaste formules wordt verwezen naar bijlage 2.

## 4. Resultaten

De vier toestellen worden gedurende twee weken uitvoerig getest. De kwantitatieve criteria, de evaluatie van de functionaliteit en de subjectieve ervaring dienen als basis voor de globale beoordeling.

### 4.1. Kwantitatieve criteria

Voor elk toestel worden de prestatiekenmerken getoetst aan de vooropgestelde criteria. Om de betrouwbaarheid van het toestel te garanderen, worden dagelijks de standaard controles bepaald met hoge en lage HbA1c-waarden. Indien de resultaten niet binnen de eisen van de fabrikant liggen, moeten corrigerende acties worden ondernomen, zoals herkalibreren.

#### 4.1.1. Juistheid

Voor de juistheid wordt gebruik gemaakt van de SKML-controles. Een verhoogde HbA1c (75.1 mmol/mol) en een normale HbA1c (34.3 mmol/mol) worden in triplo op de verschillende toestellen toegepast. De gemiddelde bias is samengevat in onderstaande tabel 4. Voor de streefwaarde bias  $\leq 2$  mmol/mol voldoen enkel de toestellen van Menarini en Sebia voor beide controlelevels. Het toestel van Bio-Rad toont de grootste afwijking voor het lage HbA1c-level, terwijl het toestel van Tosoh het minst scoort voor het hoge HbA1c-level. De bias wordt ook procentueel weergegeven (tabel 5).

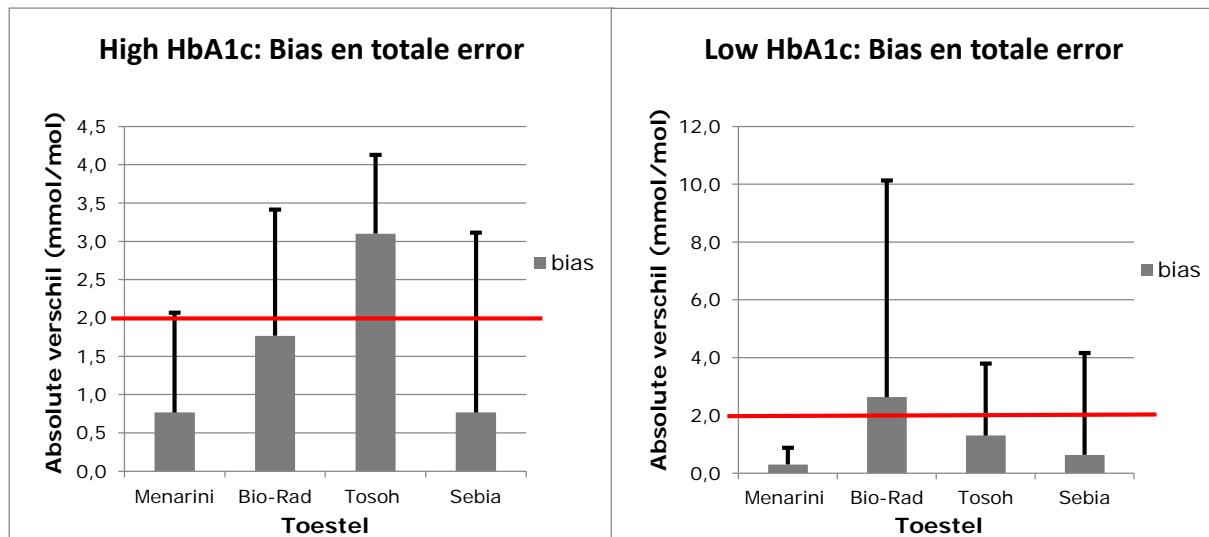
Tabel 4: Verschil tussen de SKML-waarde en de gemiddelde meting. Streefwaarde max. 2mmol/mol – de waarden in het rood voldoen niet.

Staal mmol/mol	Huidig toestel mmol/mol	Menarini mmol/mol	Bio-Rad mmol/mol	Tosoh mmol/mol	Sebia mmol/mol
High (75.1)	0.23	0.77	1.77	3.10	1.06
Low (34.3)	1.03	0.30	2.63	1.30	0.80

Tabel 5: Procentuele afwijking tussen SKML-waarde en de gemiddelde meting: voor de High maximaal 2.77% en voor de Low maximaal 5.83%. – waarden in het rood voldoen niet.

Staal mmol/mol	Huidig toestel %	Menarini %	Bio-Rad %	Tosoh %	Sebia %
High (75.1)	0.31	1.02	2.35	4.13	1.41
Low (34.3)	3.01	0.87	7.68	3.79	2.33

Een betere interpretatie van de bias wordt verkregen door de bias te verhogen met 1.65 maal de variatiecoëfficiënt, daar de metingen in triplo gebeuren. Deze totale error wordt samen met de bias in onderstaande staafdiagrammen weergegeven (figuur 22A en 22B). Hieruit blijkt dat de onnauwkeurigheid bij het toestel van Bio-Rad voor de normale en bij het toestel van Sebia voor de hoge HbA1c-levels het meest uitgesproken is. Gebaseerd op deze metingen scoort het toestel van Menarini het beste.



Figuur 22A: Rode lijn toont de toegelaten bias, de grijze staaf de gemiddelde bias, de grijze staaf + foutbalk de totale error.

Figuur 22B: Rode lijn toont de toegelaten bias, de grijze staaf de gemiddelde bias, de grijze staaf + foutbalk de totale error.

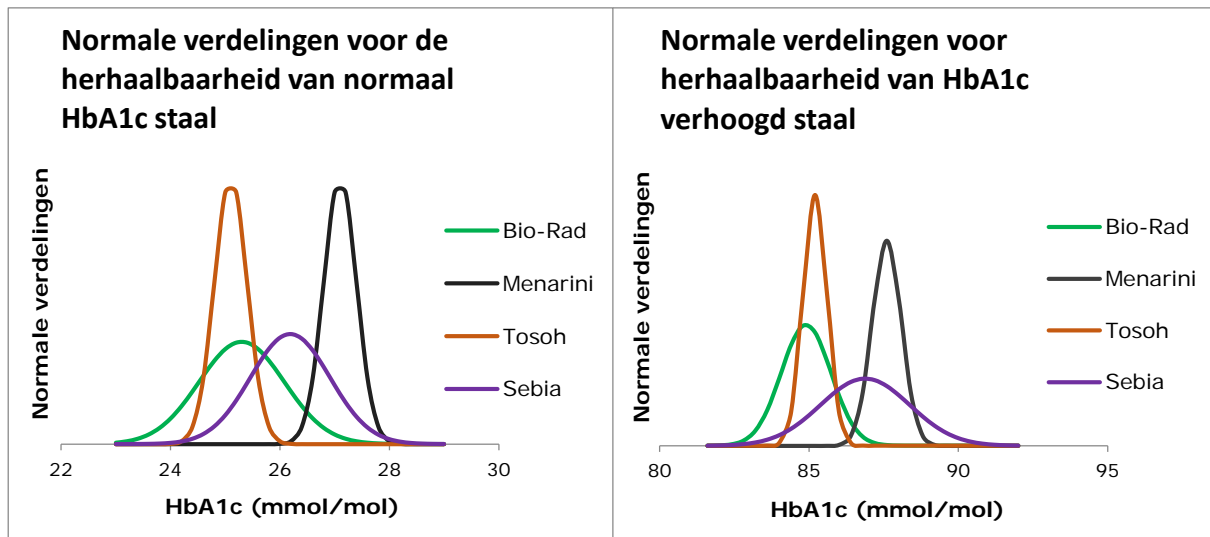
#### 4.1.2. Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid wordt getoetst door per toestel tien maal hetzelfde staal na elkaar te bepalen, dit zowel voor een normaal HbA1c staal (26 mmol/mol) als een pathologisch verhoogd HbA1c staal (86 mmol/mol). De stalen zijn voor alle toestellen hetzelfde, zodat de resultaten onderling vergeleken kunnen worden. De  $CV_h$  wordt berekend om de herhaalbaarheid te kwantificeren. Volgens IFCC mag de  $CV_h$  maximaal 2.9% bedragen (Lenters-Westra et al., 2012). Onderstaande tabel 6 geeft de resultaten van de herhaalbaarheid weer.

Tabel 6: De herhaalbaarheid  $CV_h$  - volgens IFCC max. 2.9% - waarden in het rood voldoen niet aan het criterium.

Staal mmol/mol	Menarini %	Bio-Rad %	Tosoh %	Sebia %
High (gemiddeld 86)	0.56	0.98	0.47	1.72
Low (gemiddeld 26)	1.11	3.09	1.20	2.77

Commentaar: enkel Bio-Rad D-100 voldoet net niet aan het criterium, maar het is duidelijk dat de spreiding van de testresultaten eveneens moet worden gevalideerd. Daarom wordt de herhaalbaarheid aan de hand van normale verdelingen voor zowel een normaal als een pathologisch verhoogd HbA1c staal in een grafiek uitgezet (figuur 23A en 23B).



Figuur 23A: Normale verdeling van de testresultaten normaal HbA1c staal

Figuur 23B: Normale verdeling van de testresultaten verhoogd HbA1c staal

Commentaar: wanneer de testwaarden voor een normaal staal en een verhoogd staal als normaalverdelingen met corresponderende gemiddelden en standaardafwijkingen worden uitgezet, zijn de verschillen tussen de vier toestellen duidelijk merkbaar. Het valt op dat voor beide stalen de toppen van de grafieken (gemiddelde waarde) steeds in dezelfde volgorde liggen, met voor de toestellen van Tosoh en Menarini een kleinere spreiding van de testresultaten.

#### 4.1.3. Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheidstesten worden uitgevoerd door tien maal hetzelfde staal twee maal per dag gedurende vijf dagen op de vier verschillende toestellen te analyseren. Het normale staal (26 mmol/mol) is afkomstig van een laborant, terwijl de verhoogde stalen (80 mmol/mol) geleverd zijn door de fabrikanten van de verschillende toestellen. Uit de testen wordt de  $CV_r$  berekend. Volgens IFCC mag de  $CV_r$  maximaal 2.9% bedragen (Lenters-Westra et al., 2012). Onderstaande tabel (tabel 7) geeft de resultaten weer.

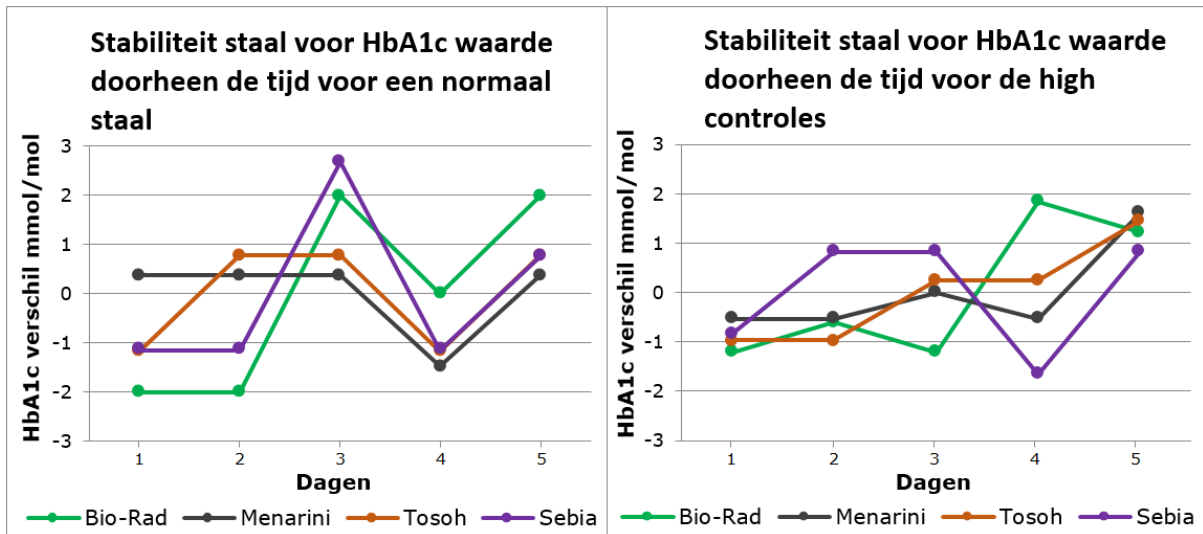
Tabel 7: De reproduceerbaarheid  $CV_r$  – volgens IFCC max. 2.9% - waarden in het rood voldoen niet aan het criterium.

Staal mmol/mol	Menarini %	Bio-Rad %	Tosoh %	Sebia %
High (gemiddeld 80)	0.99	1.44	1.09	1.70
Low (gemiddeld 26)	1.11	2.53	1.78	2.86

Commentaar: alle toestellen voldoen aan dit criterium. Ook hier is de spreiding bij het toestel van Sebia het grootst.



De reproduceerbaarheidstesten worden uitgevoerd gedurende vijf dagen. Er wordt voor elk toestel nagegaan of de routine stalen en de controlestalen van de fabrikanten na verloop van tijd bruikbaar blijven. Figuren 24A en 24B tonen de procentuele verschillen na verloop van tijd.



Figuur 24A: Procentuele variatie van de HbA1c-meting van een normaal staal na één tot vijf dagen.

Figuur 24B: Procentuele variatie van HbA1c-meting van een verhoogd staal na één tot vijf dagen.

Commentaar: er kan vastgesteld worden dat de HbA1c dagelijks schommelt. De vier toestellen tonen voor hetzelfde normaal HbA1c staal quasi dezelfde schommelingen met een procentuele variatie van +/- 2% (figuur 24A). De procentuele variatie voor de controlestalen is +/-1% (figuur 24B). Beide variaties zijn verwaarloosbaar en wijzen erop dat de stalen minstens vijf dagen houdbaar zijn.

#### 4.1.4. Carry-over test

Carry-over betekent dat er contaminatie van voorgaande stalen met zeer hoge concentraties op de volgende testen optreedt waardoor onverwacht hoge pieken kunnen ontstaan. Deze contaminatie kan in opeenvolgende testen blijven bestaan, maar zal geleidelijk afnemen. Om de invloed van carry-over te bestuderen, wordt eerst een normaal HbA1c-staal (gemiddeld 31 mmol/mol) bepaald, dan een pathologisch verhoogd HbA1c staal (gemiddeld 93 mmol/mol) gemeten, om uiteindelijk het eerste gemeten staal nog eens drie maal na elkaar te bepalen. Zo wordt het mogelijk om vast te stellen in welke mate het pathologisch staal effect heeft op de volgende metingen. Er wordt geen waarde vooropgesteld, maar het toestel met de minste gevoeligheid voor carry-over is aan te bevelen.

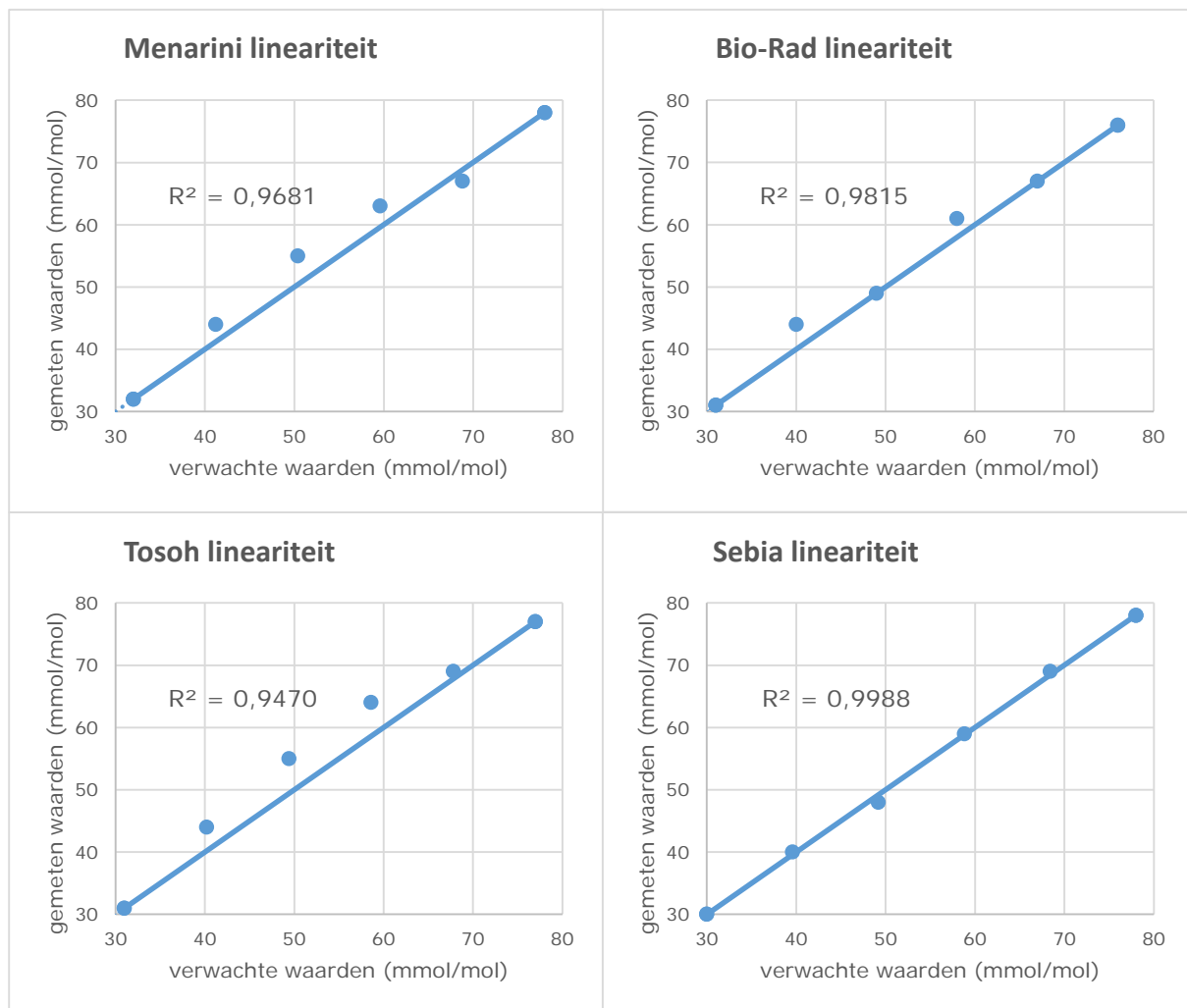
Tabel 8: Afwijking concentratie van stalen voor en na de contaminatie

Meting voor en na contaminatie	Menarini mmol/mol	Bio-Rad mmol/mol	Tosoh mmol/mol	Sebia mmol/mol
Meting voor contaminatie	32	32	31	30
1 <sup>e</sup> meting na contaminatie	32	32	31	31
2 <sup>e</sup> meting na contaminatie	32	32	31	29
3 <sup>e</sup> meting na contaminatie	32	32	31	30

Commentaar: uit de testen blijkt dat de toestellen weinig gevoelig zijn voor carry-over. De test is echter klinisch niet relevant, omdat er geen extreme concentratieverschillen zijn tussen normaal en verhoogd HbA1c staal. Contaminatie door een staal met een Hb-variant (voorbeeld HbF) zou beter aantonen in welke mate het toestel gevoelig is voor carry-over, daar de Hb-variant tot een grotere afwijking van de HbA1c kan leiden. Dit dient verder te worden onderzocht.

#### 4.1.5. Lineariteit

De lineariteitstesten worden uitgevoerd met verschillende samenstellingen van een verhoogd HbA1c staal (gemiddeld 77.25 mmol/mol) en een normaal staal (gemiddeld 31.00 mmol/mol) met vergelijkbare hematocrietwaarden. De stalen worden volgens een stijgende ratio, in stappen van 20%, van 0% tot 100% met elkaar gemengd. Dit resulteert in concentraties HbA1c van 31.00, 40.25, 49.50, 58.75, 68.00, 77.25 mmol/mol. Onderstaande figuur 25 geeft de resultaten voor de vier toestellen weer. Het criterium voor lineariteit voor het geteste meetbereik is een  $R^2$  van minstens 0.95.



Figuur 25: Lineariteitsgrafieken: de  $R^2$  is berekend t.o.v. de ideale waarde (rechte door de oorsprong).

Commentaar: enkel de G8 van Tosoh met een  $R^2=0.9470$  haalt het criterium  $R^2 \geq 0.95$  net niet. Er kan besloten worden dat het meetbereik voor deze concentraties voor alle toestellen voldoende betrouwbaar is. De Capillarys van Sebia heeft de beste lineariteit ( $R^2 = 0.9988$ ).

#### 4.1.6. Correlatie

De correlatie wordt getoetst door 128 opeenvolgende routine-stalen die op het comparator toestel Menarini HA-8160 zijn bepaald, ook te meten op de vier te valideren toestellen. Vijf stalen zijn afkomstig van patiënten met een hemoglobopathie, die bij de berekening van de correlatie al dan niet worden meegerekend. De Passing-Bablok regressie en de Bland-Altman plot worden voor de correlatie gebruikt. Van 9 routine-stalen wordt de vingerprikmethode gecontroleerd op de twee toestellen die met deze optie zijn uitgerust (Bio-Rad D-100 en Sebia Capillarys).

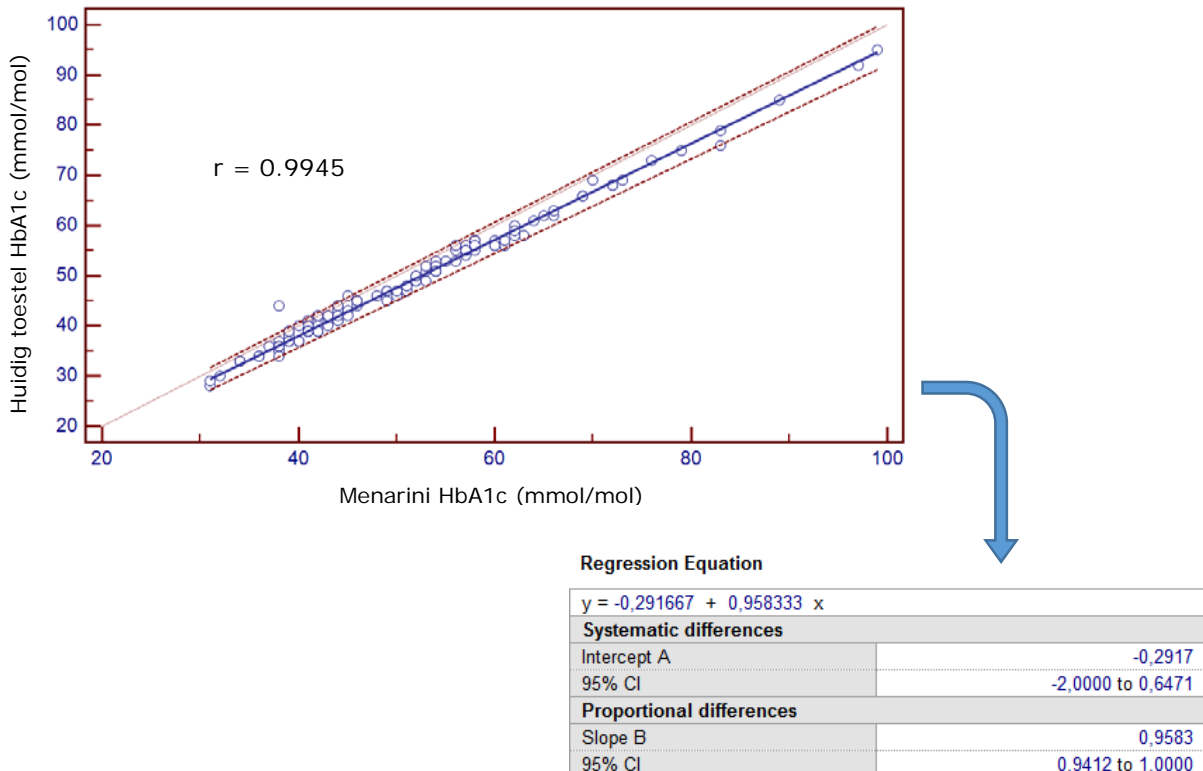
##### 4.1.6.1. Passing-Bablok regressie

De Passing-bablok regressies worden uitgezet tussen de vier te valideren toestellen en de comparator methode, alsook tussen de te valideren toestellen onderling. Om de vingerprikmethode na te gaan wordt voor de toestellen Bio-Rad D-100 en Sebia Capillarys de correlatie met de standaardmethode getoetst.

##### **Passing-Bablok regressie: comparator toestel versus de te evalueren toestellen**

De Passing-Bablok regressie grafieken van alle combinaties van het huidig toestel versus de vier te evalueren toestellen is te vinden in bijlage 3. Ter illustratie wordt de Passing-Bablok regressie van het comparator toestel versus Menarini HA-8180 getoond. Stalen met Hb-pathieën worden niet meegerekend (figuur 26).

##### **Correlatie tussen huidig toestel en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobopathieën**



Figuur 26: Passing-Bablok regressie van het comparator toestel vs. Menarini HA-8180:  $r = 0.9945$ , 0 ligt in het 95% CI voor intercept A, terwijl 1 in het 95% CI voor slope B ligt. Dit betekent dat beide toestellen voldoende correleren.

Hierna volgt een samenvattende tabel (tabel 9) van de correlatiewaarden van de vier nieuwe toestellen versus het huidig toestel (Menarini HA-8160).

Tabel 9: Passing-Bablok regressie: huidig toestel vs. nieuwe toestellen. Waarden in het rood voldoen niet aan het criterium.

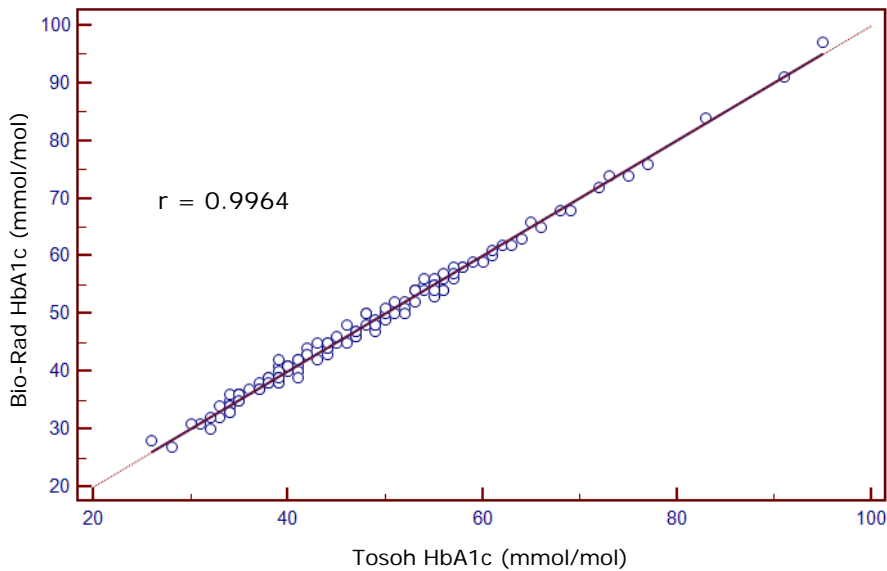
Criteria	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia
$r \geq 0.975$				
Met Hb-pathieën	0.9495	0.9735	0.9621	0.9819
Zonder Hb-pathieën	0.9945	0.9860	0.9865	0.9843
Intercept A 0 in 95% CI				
Met Hb-pathieën	-1.1333 tot 1.333	-3 tot 1.1143	-3 tot 0.0357	-4.8095 tot -2
Zonder Hb-pathieën	-2 tot 0.6471	-3 tot 0.2857	-3 tot -0.375	-4.8095 tot -2
Slope B 1 in 95% CI				
Met Hb-pathieën	0.9333 tot 0.9778	0.9143 tot 1	0.9286 tot 1	1 tot 1.0476
Zonder Hb-pathieën	0.9412 tot 1	0.9286 tot 1	0.9375 tot 1	1 tot 1.0476

Commentaar: de correlatiecoëfficiënt  $r$  voor stalen met hemoglobopathieën in de verwerking, ligt net onder het criterium voor drie van de vier toestellen. Zonder hemoglobopathieën voldoen alle toestellen aan het criterium. Dit wijst erop dat de Menarini HA-8160 niet goed met hemoglobopathieën overweg kan en dat deze met de pieken van HbA1c interfereert. HbA1c meting van een bloedstaal met HbS blijkt verhoogd met de huidige Menarini HA-8160 (76mmol/mol), maar normaal met de drie andere toestellen (tussen 40 en 49 mmol/mol). Voor de Capillarys van Sebia is geen meetresultaat van dit specifieke staal beschikbaar. Enkel de resultaten van Bio-Rad D-100 en Tosoh G8 vallen binnen de 95% CI voor zowel de intercept A als de slope B, met of zonder hemoglobopathieën. Voor de Capillarys van Sebia voldoet de intercept A=0 niet aan de 95% CI, aangeeft dat er een constante afwijking optreedt tegenover het comparator toestel. De slope B=1 ligt voor Menarini HA-8180 niet in het 95% CI, wat erop wijst dat er een proportionele afwijking is.

### Passing-Bablok regressie tussen de vier te evalueren toestellen onderling

De Passing-Bablok regressie grafieken tussen de te valideren toestellen onderling zijn te vinden in bijlage 4. Als voorbeeld wordt de Passing-Bablok grafiek van Tosoh G8 versus Bio-Rad D-100 zonder stalen met hemoglobinopathieën getoond (figuur 27).

#### Correlatie tussen Tosoh G8 en Bio-Rad D-100 zonder stalen met hemoglobinopathieën



#### Regression Equation

$y = 0,000000 + 1,000000 x$	
<b>Systematic differences</b>	
Intercept A	0,0000
95% CI	0,0000 to 0,0000
<b>Proportional differences</b>	
Slope B	1,0000
95% CI	1,0000 to 1,0000

Figuur 27: Passing-Bablok regressie voor de correlatie tussen Tosoh en Bio-Rad:  $r = 0.9964$ , 0 ligt in het 95% CI voor intercept A, terwijl 1 in het 95% CI voor slope B ligt. Dit betekent dat beide toestellen goed correleren en voor het gebruik uitwisselbaar zijn.

Tabel 10 geeft de onderlinge correlatiewaarden van de vier nieuwe toestellen. De Passing-Bablok regressies en bijhorende berekeningen zijn uitgevoerd met en zonder de vijf hemoglobinoopathie-stalen.

Tabel 10: Passing-Bablok regressie tussen de nieuwe toestellen onderling. Waarden in het rood voldoen niet aan het criterium.

Criteria	Bio-Rad vs Tosoh	Bio-Rad vs Menarini	Bio-Rad vs Sebia	Tosoh vs Menarini	Tosoh vs Sebia	Menarini vs Sebia
$r \geq 0.975$						
Met Hb-pathieën	0.9947	0.9769	0.9880	0.9953	0.9872	0,9785
Zonder Hb-pathieën	0.9964	0.9939	0.9932	0.9954	0.9940	0,9926
Intercept A 0 in 95% CI						
Met Hb-pathieën	0 tot 0	-1 tot -1	1.19 tot 3.428	-1 tot -1	1 tot 3	-4.9 tot -2.619
Zonder Hb-pathieën	0 tot 0	-1 tot -1	1.190 tot 3,273	-1 tot -1	0.804 tot 2.84	-4,363 tot -2.292
Slope B 1 in 95% CI						
Met Hb-pathieën	1 tot 1	1 tot 1	0.905 tot 0.952	1 tot 1	0.917 tot 0.957	1.048 tot 1.1
Zonder Hb-pathieën	1 tot 1	1 tot 1	0.909 tot 0.952	1 tot 1	0.92 tot 0.961	1.042 tot 1.091

Commentaar: de correlatiecoëfficiënt  $r$  ligt steeds boven 0.975, wat bewijst dat stalen met hemoglobinoopathieën weinig interferentie vertonen bij de bepaling van HbA1c. De toestellen Bio-Rad D-100 en Tosoh G8 blijken onderling perfect te correleren en zijn dus uitwisselbaar voor de analyses. Beide toestellen vertonen een constante afwijking tegenover de Menarini HA-8180. De Sebia Capillarys heeft de grootste afwijking tegenover de andere toestellen, maar dit kan verklaard worden door het feit dat de Capillarys op een andere techniek gebaseerd is (CE in plaats van HPLC).

### **Passing-Bablok regressie tussen de normale test en vingerprikmethode**

De Passing-Bablok regressie grafieken tussen de standaard test en de vingerprikmethode zijn te vinden in bijlage 5. De grafieken tonen aan dat voor de twee toestellen (Bio-Rad D-100 en Sebia Capillarys) de vingerprikmethode een aanvaardbare alternatieve methode is. De correlatiecoëfficiënt  $r$  is 0.9964 voor het toestel van Bio-Rad en 0.9941 voor de Capillarys van Sebia. Voor beide toestellen ligt de 0 in het 95% CI van intercept A en de 1 in het 95% CI van slope B.

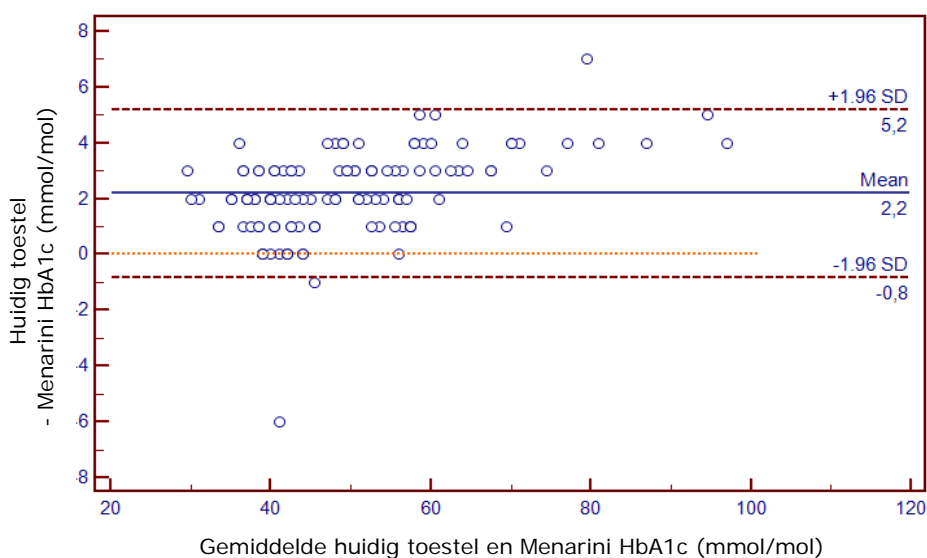
#### 4.1.6.2. Bland-Altman plot

De Bland-Altman plot's worden uitgezet tussen de vier nieuwe toestellen en de comparator methode en tussen de toestellen onderling. Om de vingerprikmethode na te gaan wordt voor de toestellen Bio-Rad D-100 en Sebia Capillarys de correlatie met de standaardmethode getoetst.

#### **Bland-Altman plot tussen het comparator toestel en de te evalueren toestellen**

De grafieken die de Bland-Altman plot's weergeven tussen het huidig toestel en de te valideren toestellen zijn te vinden in bijlage 6. Ter illustratie (figuur 28) wordt de Bland-Altman plot tussen het huidig toestel en de Menarini HA-8180 getoond, zonder stalen met hemoglobinopathieën in de correlatie.

#### **Correlatie tussen huidig toestel en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobinopathieën**



Figuur 28: Bland-Altman plot tussen Menarini HA-8160 en Menarini HA-8180: de oranje lijn ligt in het  $-1.96SD$  tot  $+1.96SD$  interval: correlatie voldoet.

Hierna volgen de samenvattende resultaten van de Bland Altman plot's van de te evalueren vier toestellen in relatie tot de huidige Menarini HA-8160 (tabel 11).

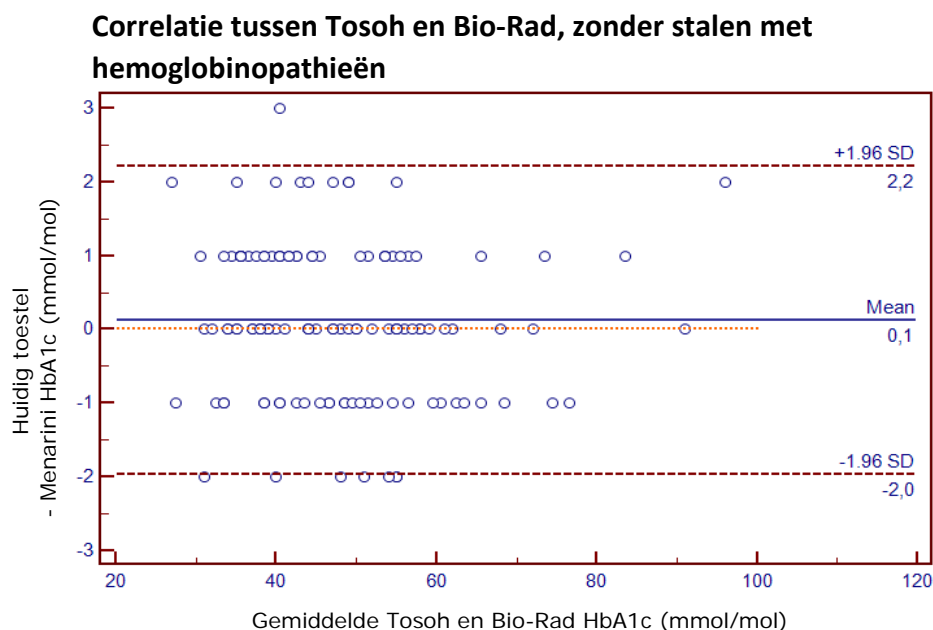
Tabel 11: Bland Altman plot resultaten: huidige Menarini HA-8160 tegenover de nieuwe toestellen

Criteria	Menarini mmol/mol	Bio-Rad mmol/mol	Tosoh mmol/mol	Sebia mmol/mol
Met Hb-pathieën				
-1.96 SD	-6.2	-3.0	-3.8	-3.1
Gemiddelde	2.3	3.3	3.5	2.0
+1.96 SD	10.8	9.6	10.9	7.1
Zonder Hb-pathieën				
-1.96 SD	-0.8	-1.4	-1.1	-2.5
Gemiddelde	2.2	3.1	3.3	2.1
+1.96 SD	5.2	7.6	7.7	6.8

Commentaar: bij alle toestellen ligt de oranje lijn (nullijn) tussen -1.96SD en +1.96SD van het gemiddeld verschil, dus alle toestellen voldoen aan het criterium. De gemiddelde HbA1c is voor alle toestellen in dezelfde grootteorde afwijkend tegenover de huidige Menarini (2 tot 3.5 mmol/mol), wat erop wijst dat de huidige Menarini gemiddeld hogere waarden geeft dan de nieuwe toestellen.

### Bland-Altman plot's tussen de vier nieuwe toestellen onderling

In bijlage 7 zijn de Bland-Altman plot's terug te vinden van de nieuwe toestellen onderling. Als voorbeeld (figuur 29) de Bland-Altman plot waarbij de Tosoh G8 wordt uitgezet versus de Bio-Rad D-100, zonder stalen met hemoglobinoopathieën.



Figuur 29: Bland-Altman plot tussen Tosoh en Bio-Rad: de oranje lijn ligt in het -1.96SD tot +1.96SD interval: correlatie voldoet.



Het volgende overzicht (tabel 12) toont de Bland-Altman Plot's voor de vier toestellen onderling.

Tabel 12: Bland-Altman Plot voor de nieuwe toestellen onderling

Criteria	Bio-Rad vs Tosoh mmol/mol	Bio-Rad vs Menarini mmol/mol	Bio-Rad vs Sebia mmol/mol	Tosoh vs Menarini mmol/mol	Tosoh vs Sebia mmol/mol	Menarini vs Sebia mmol/mol
Met Hb-pathieën						
-1.96 SD	-2.3	-6.3	-5.6	-3.4	-5.8	-5.7
Gemiddelde	0.2	-1.0	-1.2	-1.1	-1.3	0.0
+1.96 SD	2.7	4.2	3.3	1.3	3.3	5.8
Zonder Hb-pathieën						
-1.96 SD	-2.0	-3.7	-4.4	-3.4	-4.3	-3.4
Gemiddelde	0.1	-0.9	-1.0	-1.1	-1.1	0.1
+1.96 SD	2.2	1.8	2.4	1.3	2.1	3.5

Commentaar: bij alle toestellen ligt de oranje-lijn (nullijn) tussen  $-1.96SD$  en  $+1.96SD$  van het gemiddeld verschil, dus alle toestellen voldoen aan het criterium. De onderlinge verschillen zijn kleiner dan met de comparator methode (zie tabel 11). Een aantal toestellen blijken perfect uitwisselbaar te zijn, zoals de Bio-Rad D-100 en de Tosoh G8.

### ***Bland-Altman plot tussen de normale test en vingerprikmethode***

De Bland-Altman plot's van de normale test versus de vingerprikmethode zijn te vinden in bijlage 8. De nullijn ligt voor beide correlaties tussen  $-1.96 SD$  en  $+1.96 SD$ , wat bewijst dat de vingerprikmethode een aanvaardbare alternatieve methode is voor zowel de Bio-Rad D-100 als voor de Capillarys van Sebia.

#### 4.1.7. Samenvatting van de kwantitatieve criteria

In onderstaande lijst (tabel 13) staan alle kwantitatieve criteria met de streefwaarde en de overeenkomstige resultaten per toestel vermeld. De waarden in het rood zijn meetresultaten die niet aan het criterium voldoen.

Tabel 13: Samenvattende tabel voor de kwantitatieve criteria

Beoordelingscriteria	Criteria	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia
Juistheid – Bias %	High staal $\leq 2.77\%$	1.02	2.35	4.13	1.41
	Low staal $\leq 5.83\%$	0.87	7.68	3.79	2.33
Herhaalbaarheid	High staal $CV_h \leq 2.9\%$	0.56	0.98	0.47	1.72
	Low staal $CV_h \leq 2.9\%$	1.11	3.09	1.20	2.77
Reproduceerbaarheid	High staal $CV_r \leq 2.9\%$	0.99	1.44	1.09	1.70
	low staal $CV_r \leq 2.9\%$	1.11	2.53	1.78	2.86
Carry-over	$\Delta$ mmol/mol	OK	OK	OK	OK
Lineariteit	$R^2 \geq 0.95$	0.9681	0.9815	0.9470	0.9988
Correlatie met stalen met Hb-pathie	$r \geq 0.975$	0.9495	0.9735	0.9621	0.9819
	95% CI	NOK	OK	OK	NOK
	-1.96 tot +1.96 SD	OK	OK	OK	OK
Correlatie zonder stalen met Hb-pathie	$r \geq 0.975$	0.9945	0.9860	0.9865	0.9843
	95% CI	OK	OK	OK	NOK
	-1.96 tot +1.96 SD	OK	OK	OK	OK

Commentaar: wanneer de correlatie met de comparator methode met stalen met Hb-pathieën buiten beschouwing wordt gelaten, voldoen de vier toestellen aan de criteria uit het validatieplan. Menarini HA-8180 scoort het beste qua bias en CV's, terwijl de Capillary van Sebia de beste lineariteit heeft. De spreiding van de meetresultaten is het grootst bij de Bio-Rad D-100 en de Tosoh G8.

## 4.2. Beoordeling van de functionaliteit

In tabel 14 wordt de functionaliteit beoordeeld. Interferentie van een Hb-variante op de HbA1c-bepaling is erg belangrijk en moet in de beoordeling worden opgenomen. De testen zijn evenwel niet sluitend, zodat deze evaluatie gebaseerd is op de informatie beschikbaar op de site [www.NGSP.org](http://www.NGSP.org) (Interference HbA1c, 2016).

Tabel 14: Evaluatie van de functionaliteit (“/” : info onbekend; “Nt” : niet van toepassing)

Beoordelingscriteria	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia
Tijd HbA1c-meting 10 stalen	36 min. 55s.	9 min. 14s.	18 min. 20s.	35 min. 40s. (= 16 stalen)
Tijd HbA1c-meting 1 staal	6 min. 9s.	2 min. 26s.	3 min. 1s.	22 min. 57s.
Afsluitprocedure	Niet nodig	Niet nodig	Ja, duurt 5 min.	Ja, duurt 30 min.
Vervanging reagentia	Within-run mogelijk	Mogelijk in stand-by	Mogelijk in stand-by	Bij opstart of veranderen modus
Aantal testen per kolom/ capillair	7,500	10,000	2,500	3,000
Aantal testen per filter	10,000	2,000	400	Nt
Doodvolume volbloed	1 mL	978 µL	1 mL	100 µL
Doodvolume verdunningen	400 µL	220 µL	100 µL	108 µL
Bepaling van HbA2	Ja, simultaan	Neen	Ja	Ja
Interferentie Hb-varianten	Neen	Neen	Ja	Neen
Interferentie verhoogd HbF	Neen, tot 30%	/	Neen, tot 30%	Neen, tot 15%
Interferentie met Carb. Hb	/	/	Neen	Neen
Mogelijkheid vingerprik test	Neen	Ja	Neen	Ja
Aangeven controles liggen correct	Neen	Ja	Ja	Neen
Hoeveelheid reagentia tonen	Ja	Ja	Neen	Neen
Vergissen rek met verlies teststalen	Neen	Neen	Neen	Ja
Automatisch mengen staal	Ja	Neen	Neen	Ja
Overlay grafiek van variante	Ja	Neen	Ja	Neen
Tonen resttijd per staal	Ja	Ja	Neen	Neen
Kostprijs reagentia rangorde	2	4	1	3
Kostprijs van het toestel rangorde	1	3	2	4

### 4.3. Subjectieve beoordeling

De subjectieve beoordeling van de nieuwe toestellen is simultaan met de kwantitatieve testen uitgevoerd. Tabel 15 geeft de resultaten weer.

Tabel 15: Subjectieve beoordeling: van zwak, neutraal, goed, tot zeer goed

Beoordelingscriteria	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia
Eenvoudige bediening	Goed	Zeer goed	Neutraal	Zwak
Software gebruiksvriendelijk	Goed	Zeer goed	Zwak	Neutraal
Gebruiksvriendelijke touchscreen en menustructuur	Zeer goed	Neutraal	Goed	Zwak
Duidelijke chromatogrammen	Neutraal	Goed	Zwak	Zeer goed
Errorgevoelig	Goed	Zeer goed	Zwak	Neutraal
Onderhoudsvriendelijk	Goed	Zeer goed	Neutraal	Zwak

## 5. Discussie

De beoordeling van elk toestel gebeurt op basis van kwantitatieve criteria enerzijds en op de evaluatie van de functionaliteit en de subjectieve criteria anderzijds. Voor alle criteria worden scores toegekend (van 1 tot 4 van minst tot best presterend en 0 indien niet aanwezig). De score is geen absolute waardering, maar eerder een rangorde die het onderling vergelijken van de toestellen mogelijk maakt. Alle criteria worden van een gewichtsfactor voorzien (van 1 tot 20) om het relatief belang te wegen. De kwantitatieve criteria krijgen een aandeel van 70 % van de punten, de functionaliteit een aandeel van 20 %, terwijl de subjectieve criteria 10 % der punten vertegenwoordigen.

### 5.1. Scores voor de kwantitatieve criteria

Tabel 16: Scorematrix kwantitatieve criteria

Beoordelingscriteria	Criteria	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia	Gewicht
Juistheid – Bias %	High staal $\leq 2.77\%$	4	2	1	3	5
	Low staal $\leq 5.83\%$	4	1	2	3	5
Herhaalbaarheid	High staal $CV_r \leq 2.9\%$	4	2	4	1	5
	Low staal $CV_r \leq 2.9\%$	4	1	4	2	5
Reproduceerbaarheid	High staal $CV_h \leq 2.9\%$	4	2	4	1	5
	low staal $CV_h \leq 2.9\%$	4	2	3	1	5
Carry-over (*1)	mmol/mol	0	0	0	0	0
Lineariteit	$R^2 \geq 0.95$	2	3	1	4	10
Correlatie in stalen met Hb-pathieën (*2)	$r \geq 0.975$	0	0	0	0	0
	95% CI	0	0	0	0	0
	-1.96 tot +1.96 SD	0	0	0	0	0
Correlatie in stalen zonder Hb-pathieën	$r \geq 0.975$	4	3	3	2	20
	95% CI	4	4	4	1	5
	-1.96 tot +1.96 SD	4	4	4	4	5
TOTALE SCORE (max. 280)		260	180	200	165	
TOTALE SCORE (%)		92.8%	64.3%	71.4%	58,9%	

(\*1) het testscenario is ontoereikend om carry-over voldoende vast te stellen

(\*2) voor de correlatie in stalen met Hb-pathieën zijn de testresultaten niet betrouwbaar

Commentaar: voor de kwantitatieve criteria krijgt Menarini HA-8180 de hoogste score (92.8%). Tosoh G8 scoort beter dan de overige twee toestellen door de hogere  $CV_r$  en  $CV_h$ .

## 5.2. Beoordeling van de functionaliteit

Tabel 17: Beoordeling van de functionaliteit

Beoordelingscriteria	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia	Gewicht
Tijd HbA1c-meting 10 stalen	1	4	3	2	20
Tijd HbA1c-meting 1 staal	2	4	3	1	20
Afsluiten noodzakelijk	4	4	2	1	5
Vervanging reagentia	4	3	3	1	5
Aantal testen per kolom/ capillair	3	4	2	2	5
Aantal testen per filter	3	2	1	4	5
Doodvolume volbloed	2	2	2	4	5
Doodvolume verdunningen	1	2	4	4	10
Bepaling HbA2	4	0	2	1	20
Interferentie Hb-varianten	4	4	0	4	5
Interferentie verhoogd HbF	4	1	4	3	5
Interferentie met Carb. Hb	1	1	4	4	5
Mogelijkheid vingerprik test	0	4	0	4	10
Aangeven controles liggen correct	0	4	4	0	5
Hoeveelheid reagentia tonen	4	4	0	0	5
Vergissen rek met verlies teststalen	4	4	4	0	20
Automatisch mengen staal	4	0	0	4	5
Overlay grafiek van variante	4	0	4	0	5
Tonen resttijd per staal	4	4	0	0	5
Kostprijs reagentia (rangorde)	3	1	4	2	20
Kostprijs van het toestel (rangorde)	4	2	3	1	20
TOTALE SCORE (max. 820)	575	525	550	355	
TOTALE SCORE (%)	70.1%	64.0%	67.0%	43.3%	

Commentaar: Menarini HA-8180 behaalt de hoogste score qua functionaliteit. Dit komt onder andere door een aantal extra functies, zoals het simultaan meten van HbA2, en de lagere kostprijs. Ook de toestellen van Bio-Rad en Tosoh komen in de buurt, vooral door de kortere verwerkingstijd van de stalen. De vingerpriktest voor de toestellen van Bio-Rad en Sebia geven een betrouwbare correlatie met de standaardmethode. Beide toestellen scoren dus maximaal voor dit criterium.

### 5.3. Subjectieve criteria

Tabel 18: Beoordeling subjectieve criteria

Beoordelingscriteria	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia	Gewicht
Eenvoudige bediening	3	4	2	1	20
Software gebruiksvriendelijk	3	4	1	2	20
Gebruiksvriendelijke menustructuur	4	2	3	1	20
Duidelijke chromatogrammen	2	3	1	4	10
Errorgevoelig	3	4	1	2	20
Onderhoudsvriendelijk	3	4	2	1	10
TOTALE SCORE (max. 400)	310	350	170	170	
TOTALE SCORE (%)	77.5%	87.5%	42.5%	42.5%	

Commentaar: de toestellen van Bio-Rad en Menarini scoren duidelijk hoger dan de twee andere toestellen, voornamelijk door de gebruiksvriendelijkheid en het gering aantal errors. Het toestel van Menarini scoort iets lager dan de D-100 van Bio-Rad door de minder duidelijke chromatogrammen.

### 5.4. Totaalscore

De totaalscore wordt berekend door de drie onderdelen met de corresponderende gewichtsfactor te vermenigvuldigen.

Tabel 19: Totaalscore procentueel uitgedrukt voor elk toestel

Score	Menarini	Bio-Rad	Tosoh	Sebia	Factor
Kwantitatieve Criteria	92.8%	64.3%	71.4%	58.9%	x 70%
Functionaliteit	70.1%	64.0%	67.0%	43.3%	x 20%
Subjectieve Criteria	77.5%	87.5%	42.50%	42.5%	x 10%
EINDTOTAAL (*)	86,77 %	66,55 %	67,66 %	54,14 %	

(\*) het eindresultaat geeft enkel een relatieve beoordeling van het toestel weer. Deze waarde dient om de toestellen onderling te kunnen vergelijken.

Commentaar: de Menarini HA-8180 scoort duidelijk het hoogst. De Bio-Rad D-100 en Tosoh G8 scoren gelijkwaardig, maar de erg lage waarde voor de subjectieve criteria van het toestel van Tosoh geeft aan dat dit toestel nogal wat technische tekorten vertoont.

## 6. Conclusie

De endocrinologen vragen een snelle HbA1c analyse, zodat de diabetespatiënt bij consultatie in een zo kort mogelijke tijd het resultaat van het onderzoek heeft. Het huidige toestel HA-8160 in het AZ Sint-Jan is verouderd en komt niet tegemoet aan de vraag van de diabetes kliniek. De bachelorproef is daarom gewijd aan de evaluatie en de vergelijking van vier geselecteerde toestellen voor de bepaling van de HbA1c, namelijk Menarini HA-8180, Bio-Rad D-100, Tosoh G8 en Sebia Capillarys 2 Flex piercing.

De fabrikanten stellen gedurende twee weken de toestellen ter beschikking voor dit onderzoek. De analytische kwalificatie van elk toestel waarbij een aantal prestatiekenmerken, zoals de juistheid, de herhaalbaarheid, de reproduceerbaarheid en de lineariteit, worden getoetst, toont aan dat alle toestellen ruim voldoende beantwoorden aan de gestelde eisen. De correlatie van de onderzochte toestellen versus de comparator methode Menarini HA-8160 voldoet aan de criteria, behalve indien stalen met hemoglobinoopathieën in de analyse worden meegenomen. De onderlinge correlaties tussen de te valideren toestellen zijn echter wel acceptabel, wat erop wijst dat de comparator methode niet geschikt is voor de meting van stalen met hemoglobinoopathieën. De toestellen vertonen geen carry-over met verhoogd HbA1c maar dit effect is sowieso gering omdat er geen extreme concentratie verschillen zijn tussen een normaal en hoog HbA1c. Beter worden deze carry-over testen uitgevoerd met een bloedstaal met verhoogd HbF. Contaminatie kan in dit geval een groot effect hebben op de meetresultaten. Voor de kwantitatieve criteria scoort Menarini HA-8180 het hoogst.

De functionele verschillen tussen de vier toestellen zijn significanter. Dit vertaalt zich in de tijd nodig om een staal of een reeks stalen te analyseren, de kwaliteit en de leesbaarheid van de chromatogrammen, in het bijzonder de analyse mogelijkheden van interferenties van bloedstalen met hemoglobinoopathieën, de beschikbare functies en de kostprijs voor de reagentia en de hulpmiddelen. De interferentie van Hb-varianten op de bepaling van HbA1c zal aan belang winnen door de toenemende immigratie van mensen van diverse etnische origine. In deze studie worden onvoldoende testen van stalen met Hb-pathieën uitgevoerd om te kunnen concluderen welk toestel het best met interferenties omgaat. De kostprijs en de verwerkingstijd voor het analyseren van een staal hebben een grote invloed op de finale keuze van een methode of een toestel. Door de wereldwijde toenemende prevalentie van diabetes mellitus zal de vraag naar een vlugge en accurate diagnose enkel toenemen. De HPLC-methode is te verkiezen boven de capillaire elektroforese omdat deze laatste omslachtig is en de kostprijs per analyse aanzienlijk hoger ligt. Qua functionaliteit scoort het toestel van Sebia beduidend lager dan de drie andere toestellen. Menarini HA-8180 heeft nog een extra voordeel daar tijdens de bepaling van de HbA1c simultaan de HbA2 gemeten wordt zonder de noodzaak om van analysemodus te veranderen.

Een derde luik in de vergelijking van de vier toestellen is de subjectieve beoordeling van de werking van de toestellen. Qua gebruiksvriendelijkheid, complexiteit, datamanagement en interfacing met de hoofdcomputer van het laboratorium, halen Menarini HA-8180 en vooral Bio-Rad D-100 hogere scores dan de twee andere toestellen.

Menarini HA-8180 heeft globaal gezien de beste score en is daarom het gekozen toestel om in het routinelaboratorium van het AZ Sint-Jan te worden ingezet om het huidige toestel Menarini HA-8160 te vervangen.



## 7. Referentielijst

Agilli, M., et. al. (2013). Hb H Interference on Measurement Of HbA1c With Ion-Exchange HPLC. *Acta Inform Med*. PP. 216 - 218

Bio-Rad. (2014). D-100™ Hemoglobin Testing System operation Manual. (ongepubliceerd werk).

Bird, I.M. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ*, pp. 783 - 787

Bry, L., Chen, P.C. & Sacks, D.B. (2001). Effects of Hemoglobin Variants and Chemically Modified Derivatives on Assays for Glycohemoglobin. *Clinical Chemistry*, PP. 153 - 163

Chandrashekar, V. (2014). Minor Hemoglobins Other Than A2 in Iron Deficiency. *LABMEDICINE*, PP. 327 - 331

Clarck, J. (2007). High performance liquid chromatography – HPLC. Geraadpleegd op 28 december 2015 via <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>

Davis, C.P. (2015). Hemoglobin. Geraadpleegd op 26 februari 2016 via <http://www.medicinenet.com/hemoglobin/article.htm>

De Souza Torres, L. (2015). Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, PP. 120-126

Giddins, C.J. (z.j.). chromatography. Geraadpleegd op 28 december 2015 via <http://www.britannica.com/science/chromatography>

Hemoglobine in bloed. (2016). Hemoglobine en de rode kleur van bloed. Geraadpleegd op 26 februari 2016 via [https://wet.kuleuven.be/wetenschapinbreedbeeld/lesmateriaal\\_biochemie/waaromisbloeddrood/bloed\\_rood](https://wet.kuleuven.be/wetenschapinbreedbeeld/lesmateriaal_biochemie/waaromisbloeddrood/bloed_rood)

Heylen, et al. (2014). Evaluation of the Sebia CAPILLARYS 2 Flex Piercing for the Measurement of HbA1c on Venous and Capillary Blood Samples. *ASCP*, pp. 867 - 877

Interference HbA1c. (2016). Factors that interfere with HbA1c test results (2016). Geraadpleegd op 8 maart 2016 via <http://www.ngsp.org/factors.asp>

Jaisson, S., et. al. (2015). Analytical performances of the D-100™ hemoglobin testing system (Bio-Rad) for HbA1c assay. *Clin Chem Lab Med*, PP. 1473 - 1479

Jaisson, S., Pietrement, C. & Gillery, P. (2011). Carbamylation-Derived Products: Bioactive Compounds and Potential Biomarkers in Chronic Renal Failure and Atherosclerosis. *Clinical Chemistry*, PP. 1499 - 1505

Klaessens, J. (2012). *Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium*. Utrecht: Syntax Media

Lenters-Westra, A., et al (2012). Haemoglobin A1c: Historical overview and current concepts. *Diabetes for research and clinical practice*, pp. 75-84

Little, R. (2011). Laboratory Procedure Manual, G8 Glycohemoglobin Analyzer. Geraadpleegd op 28 december 2015 Via [http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes\\_11\\_12/GHB\\_met\\_G\\_Tosoh\\_G8.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_11_12/GHB_met_G_Tosoh_G8.pdf)

Little, R. & Roberts W.L. (2009). A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement. *J Diabetes Sci Technol*, pp. 446 - 451

Menarini Diagnostics. (z.j.). HA-8180V. geraadpleegd op 29 februari 2016 via <http://www.menarinidiagnostics.com/Products/Haemoglobin-Analyser/HA-8180V>

Menarini Diagnostics. (z.j.). HA-8180V. (ongepubliceerd werk).

Menarini Diagnostics. (z.j.). Menasoft. Geraadpleegd op 29 februari 2016 Via <http://www.en.menarinidiag.es/Products/Haemoglobin-Analyser/Menasoft>

Mitton, A. (2014). Hemoglobin C Disease. Geraadpleegd op 8 maart 2016 via <http://emedicine.medscape.com/article/200853-overview>

Piano, 2016. The Piano data management system. Geraadpleegd op 10 april 2016 via <https://www.diagnostics.eu.tosohbioscience.com/solutions/piano>

Pláteník, J. (2008). Electrophoresis. Geraadpleegd op 26 december 2015 via [electrophoresis.pfd](http://www.electrophoresis.pfd)

Precissi, J. (z.j.). Capillary Electrophoresis. Geraadpleegd op 26 december 2015 via [http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Capillary\\_Electrophoresis](http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Capillary_Electrophoresis)

Sebia. (2003). CAPILLARYS™ 2 FLEX Piercing. Geraadpleegd op 19 maart 2016 via <http://www.sebia-usa.com/products/capillarys2fp.html>

Sebia. (2003). Phoresis. Geraadpleegd op 8 april 2016 via <http://www.sebia-usa.com/products/Phoresis.html>

Sickel Cell Disease. (2015). What is Sickel Cell Disease? Geraadpleegd op 8 maart 2016 via <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/sca>

Taillieu, C. (2015). Implementatievalidatie van analysemethoden. (ongepubliceerd werk).

Thalassemia, (2016). Thalassemia. Geraadpleegd op 17 mei 2016 via <https://labtestsonline.org/understanding/conditions/thalassemia/start/3>

Thoelen, I. (2004). HbA1c: will the HbA1c auto-analyzer HA-8160 (Menarini Diagnostics) imply a substantial improvement compared to the HA-8140? Geraadpleegd op 3 maart 2016 via [http://w1.uzleuven.be/labo/Leermodule/EBLM\\_CAT/doc/CAT\\_040714\\_HbA1c.pdf](http://w1.uzleuven.be/labo/Leermodule/EBLM_CAT/doc/CAT_040714_HbA1c.pdf)

Vichinsky, E. (2007). Hemoglobin E Syndromes. Geraadpleegd op 8 maart 2016 Via <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2007/1/79.long>

Wens, P., Van Crombrugge, P. (2011). HbA1c-waarden: van % naar mmol/mol. Geraadpleegd op 7 mei 2016 via <http://www.domusmedica.be/documentatie/archief/nieuws/72-kwaliteit-nieuws/3561-hba1c-waarden-van-naar-mmolmol.html>

## 8. Bijlagen

### Bijlage 1: materialen

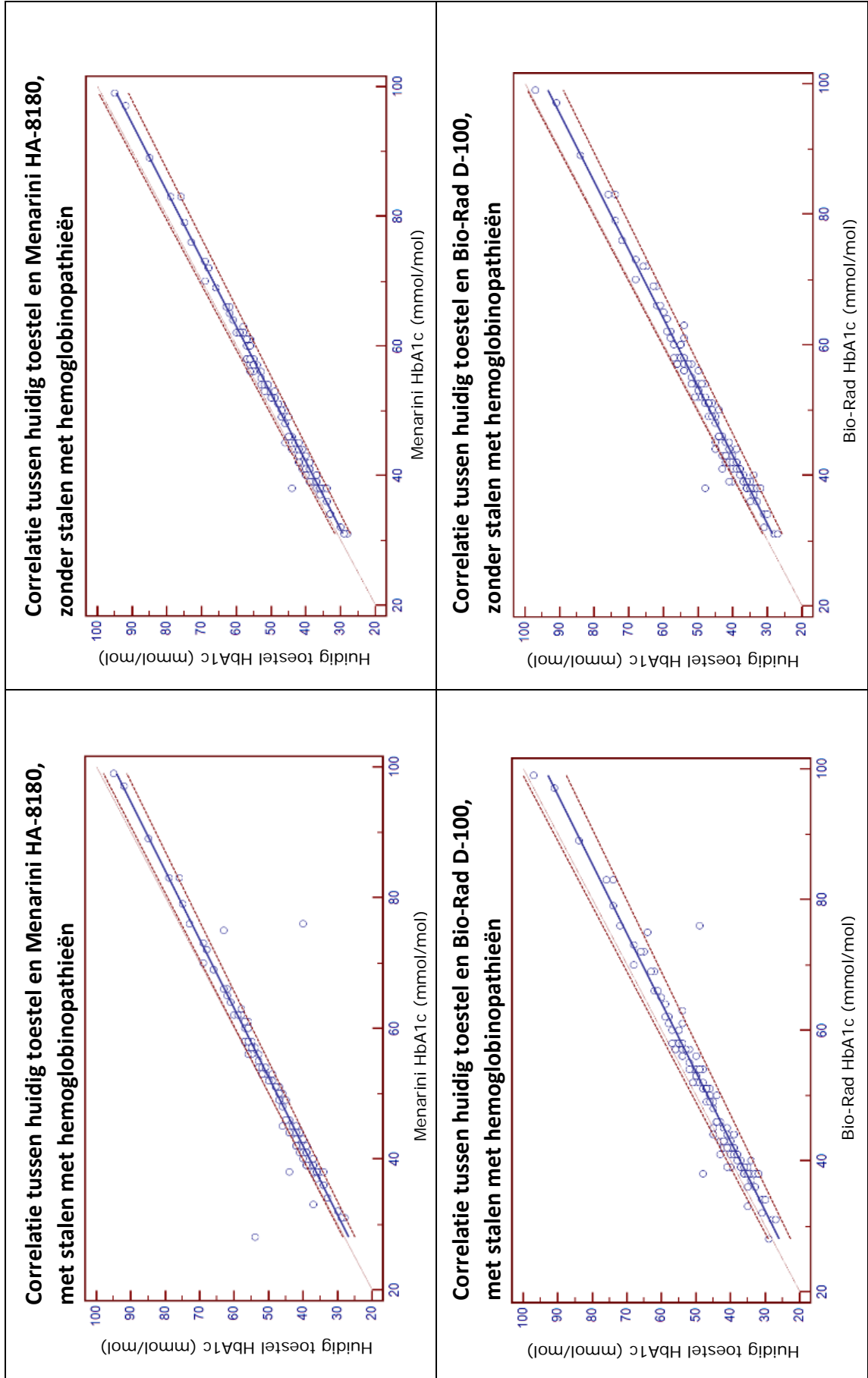
	Lotnr.	EXP.	Ref.nr.
<b>Bio-Rad D100</b>			
D-100TM Hemoglobin testing system			290-1000
Sample vials, 100x1,5ml	127170	N/A	270-2149
Hemoglobin capillary collection systeem	126660	23/03/2017	196-2052
Bio-Rad controle: Level 1	33921	31/10/2017	
Bio-Rad controle: Level 2	33922	31/10/2017	
D-100TM HbA1c Elution buffer A, 2600mL	64011697	2016-05	290-1004
D-100TM HbA1c Elution buffer B, 1400mL	64011092	2016-04	290-1004
D-100TM Wash solution, 3300mL	64011452	2016-04	290-1004
D-100TM HbA1c filter	31038AI		290-1007
D-100TM HbA1c kolom	31037AJ		290-1005
D-100TM Sample Diluent, 1L	64013387	2016-07	290-1004
<b>Tosoh G8</b>			
HbA1c controle pack (high and low)	AB5040	2017/06	21974
Tosoh callibrator pack	8BCAL03A	2016-08	
Hitachicubs	15A2653	2020-10	
B-thalassemia elution buffer No. 3 (S)	T8-304A	2016-07	
B-thalassemia elution buffer No. 2 (S)	T8-204A	2016-07	
B-thalassemia elution buffer No. 1(S)	T8-104A	2016-07	
B-Thal kolom		2018-02	
Hemoglobin F and A2 controle pack (high and low)	1047	2018-05	997050
G8 variant elution buffer HSI No. 3 (S)	H8-301A	2017-09	21851
G8 variant elution buffer HSI No. 2 (S)	H8-202A	2017-10	21850
G8 variant elution buffer HSI No. 1(S)	H8-101A	2017-09	21849
G8 variante kolom	AB5040	2017-06	
Hsi hemolysis and washing solution (L)	HW003G/B	08/07/2017	
<b>Menarini HA8180</b>			
Hemolysis/washing solution 80H	5K1221	2016-11	
Menarini HA8180 kolom	5D010P	2016-04	
Controle Menarini: Level 1	99-1-B514	2017-06	
Controle Menarini: Level 2	99-2-B514	2017-06	
Control dilution set 80	5K1231	2016-11	
Eluent 80A	5K1201	2016-11	
Eluent 80CT	5G1701	2016-07	
Eluent 80B	5K1211	2016-11	
<b>Sebia capillarys 2 flex piercing</b>			
Capillarys HbA1c hemolysing solution	01065/01	2018/06	
Capillarys HbA1c buffer	02065/01	2018/06	
Capillarys HbA1c controles: Low	15124/xx	2017/12	
Capillarys HbA1c controles: High	16124/xx	2017/12	
Sebia clean protect	11024/01	2017/02	2059
Capillarys hemoglobine hemolysante	26015/01	2018/01	
Capillarys hemoglobine buffer	24025/01	2017/02	
<b>SKML controle</b>			
Controle SKML high	2015.2901	2018-06	
Controle SKML low	2015.2903	2018-06	

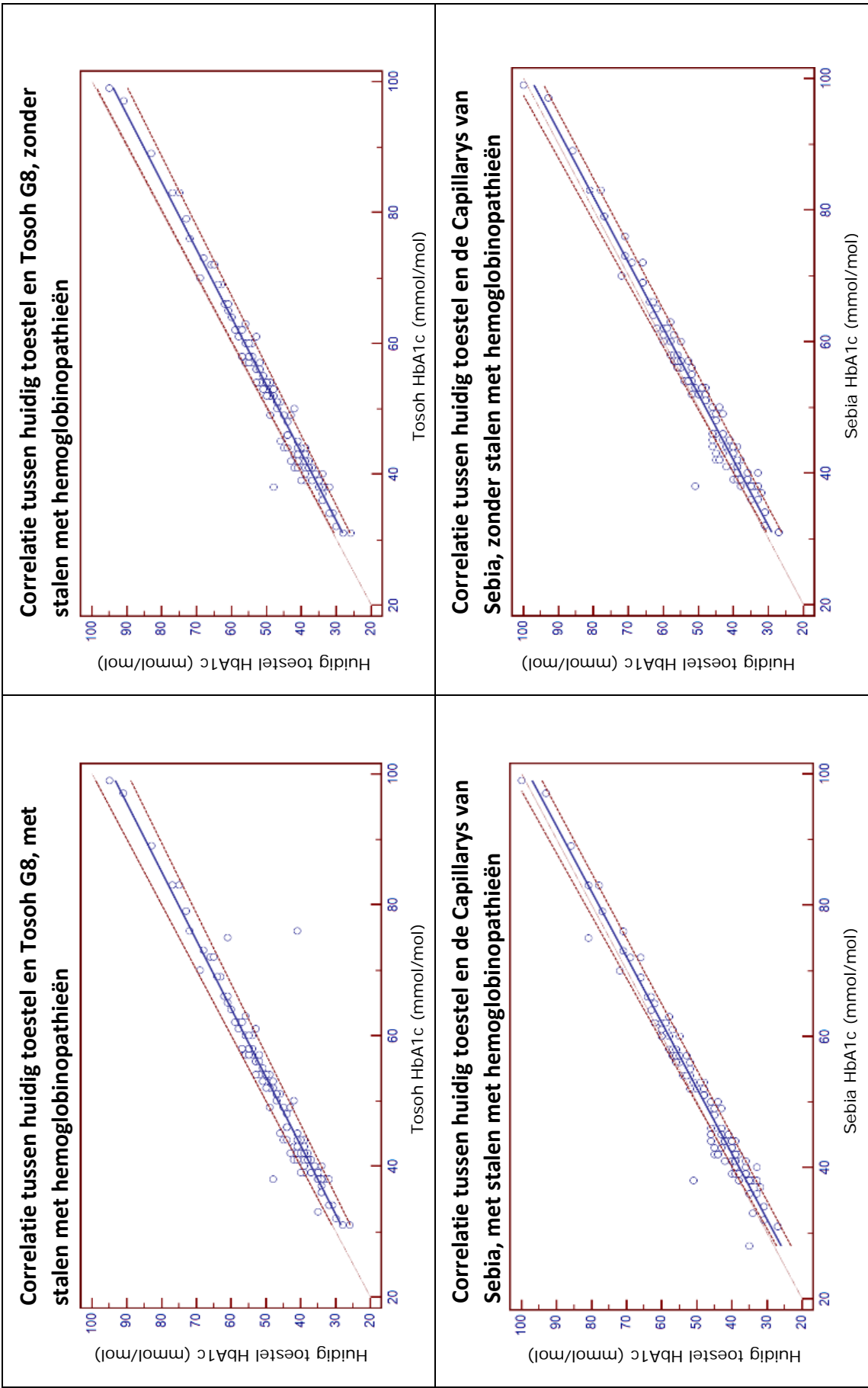
## Bijlage 2: toegepaste formules

De volgende formules uit de statistiek worden gebruikt tijdens de bachelorproef om de meetresultaten te verwerken:

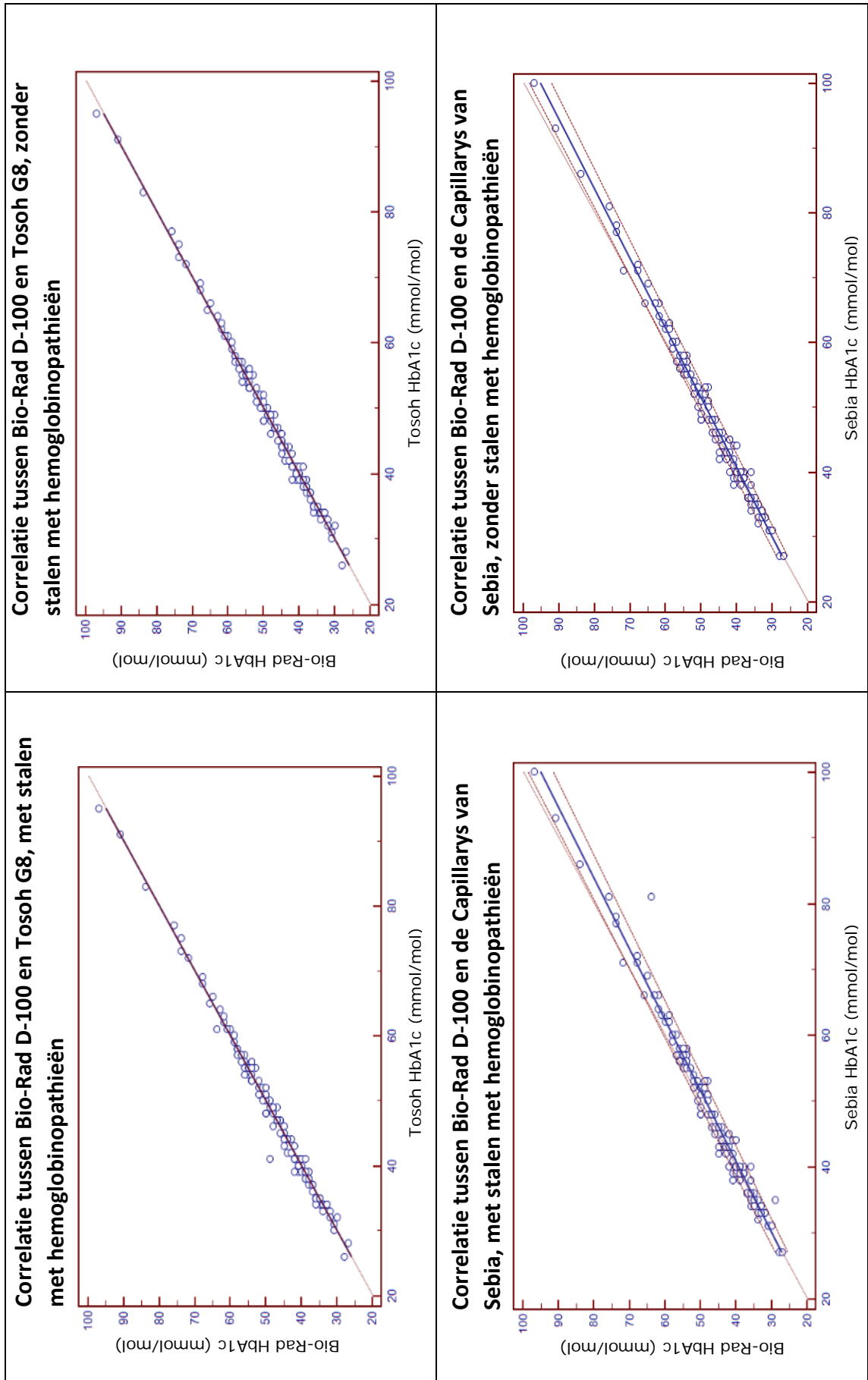
Variabele	Formule
Het gemiddelde $\bar{x}$	$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i.$
De standaarddeviatie $s$	$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$
De procentuele variatiecoëfficiënt CV	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$
De juistheid of Bias $d$	<p>Absolute Bias: <math>d = \bar{x} - C_{ref}</math> (mmol/mol)</p> <p>Procentuele Bias: <math>d\% = \frac{d}{C_{ref}} * 100</math> (%)</p> <p>Totale error (absoluut): <math>TE = d + 1.65 * s</math> (<math>s</math> = standaarddeviatie van de steekproef)</p>
De determinatiecoëfficiënt $R^2$ (lineariteit)	$R^2 = 1 - \frac{SSE}{SST}$ <p>, met</p> $SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$ <p>SSE: rest-kwadrantensom;  <math>y_i</math> = gemeten waarde, <math>\hat{y}_i</math> = verwachte waarde</p> $SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$ <p>SST: totale kwadrantensom;  <math>y_i</math> = gemeten waarde, <math>\bar{y}</math> = gemiddelde van <math>n</math>-waarden</p>
De correlatie $r$	$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} * S_{yy}}}$ <p>met</p> $S_{xx} = \sum (x - \bar{x})^2$ $S_{yy} = \sum (y - \bar{y})^2$ $S_{xy} = \sum (x - \bar{x}) * (y - \bar{y})$
Absolute afwijking van de concentratie na contaminatie $\Delta$	Absolute $\Delta =  C_2 - C_1 $

**Bijlage 3: Passing-Bablok regressies: comparator toestel ( huidig toestel) vs. nieuwe toestellen**

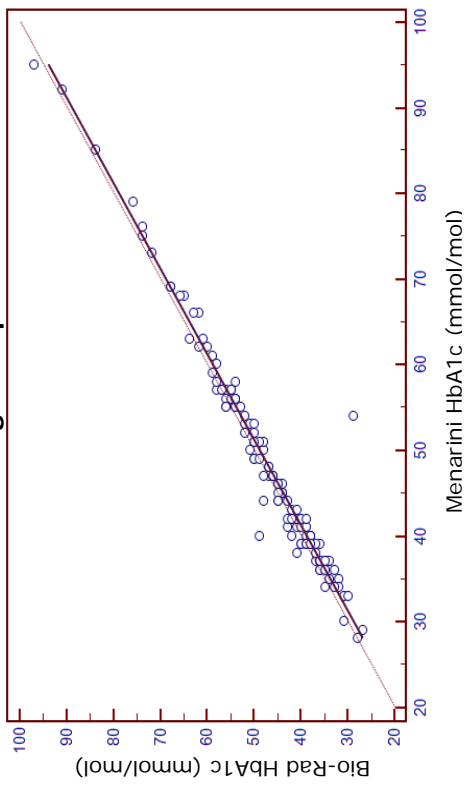




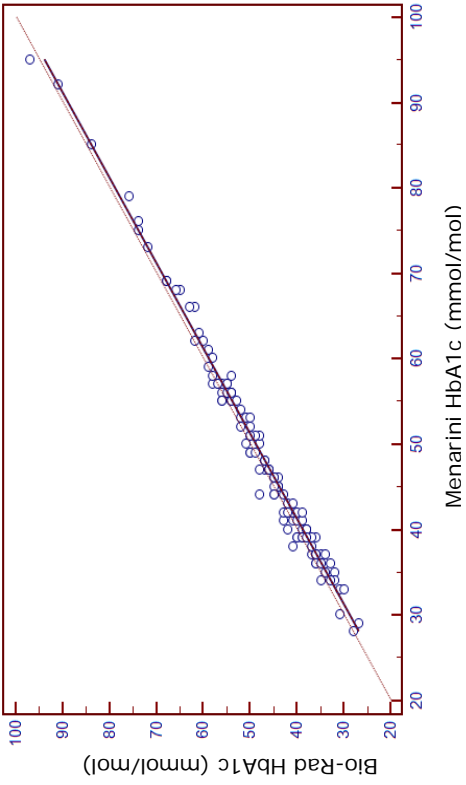
**Bijlage 4: Passing-Bablok regressies: correlatie toestellen onderling**



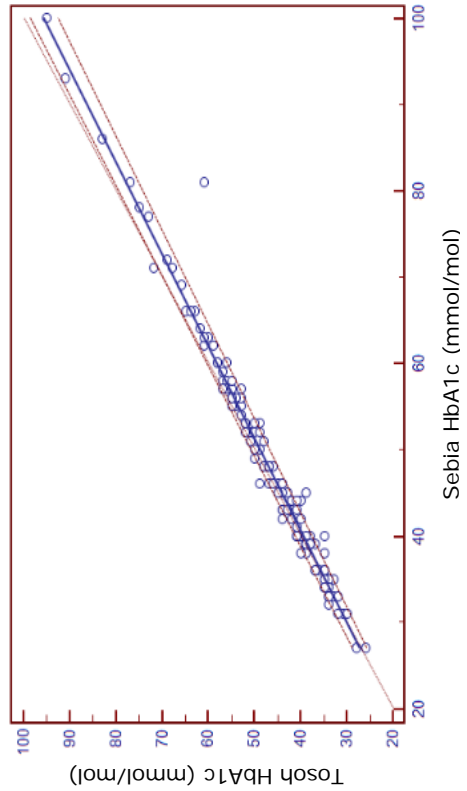
**Correlatie tussen Bio-Rad D-100 en Menarini HA-8180, met stalen met hemoglobinopathieën**



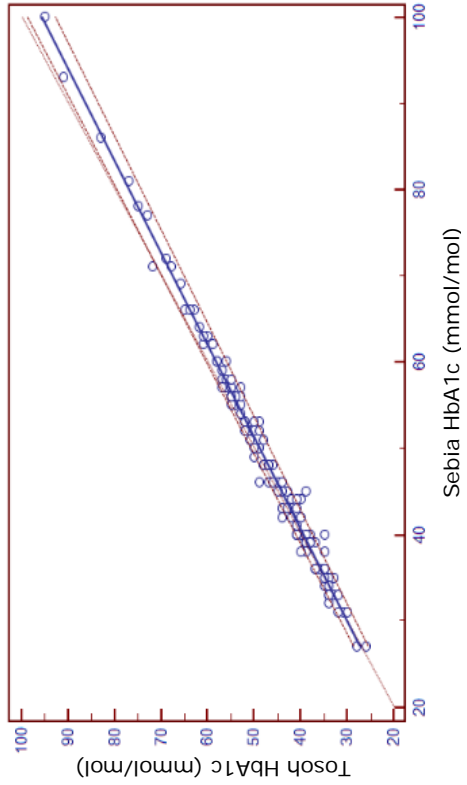
**Correlatie tussen Bio-Rad D-100 en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobinopathieën**



**Correlatie tussen Tosoh G8 en de Capillarys van Sebia, met stalen met hemoglobinopathieën**

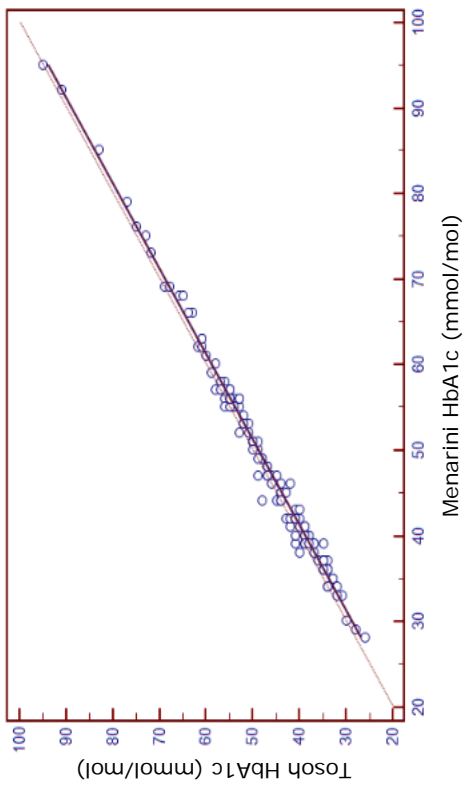


**Correlatie tussen Tosoh G8 en de Capillarys van Sebia, zonder stalen met hemoglobinopathieën**

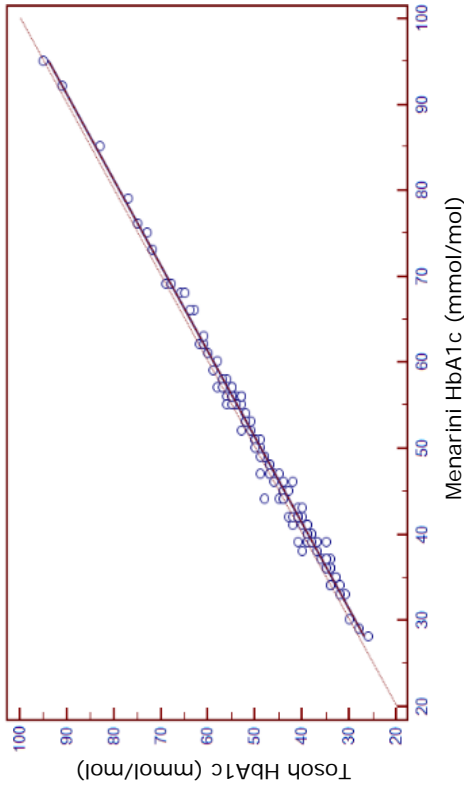




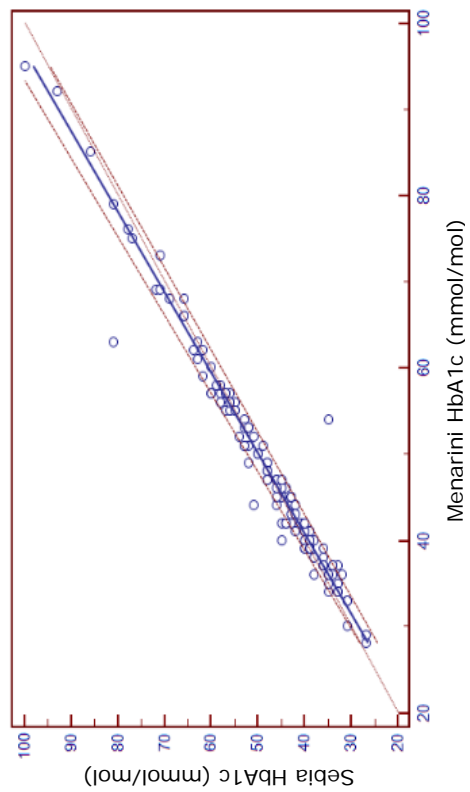
**Correlatie tussen Tosoh G8 en Menarini HA-8180, met stalen met hemoglobinopathieën**



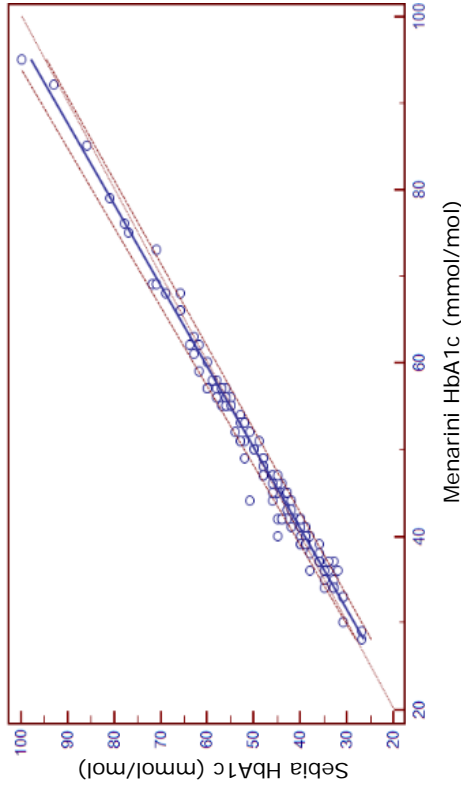
**Correlatie tussen Tosoh G8 en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobinopathieën**



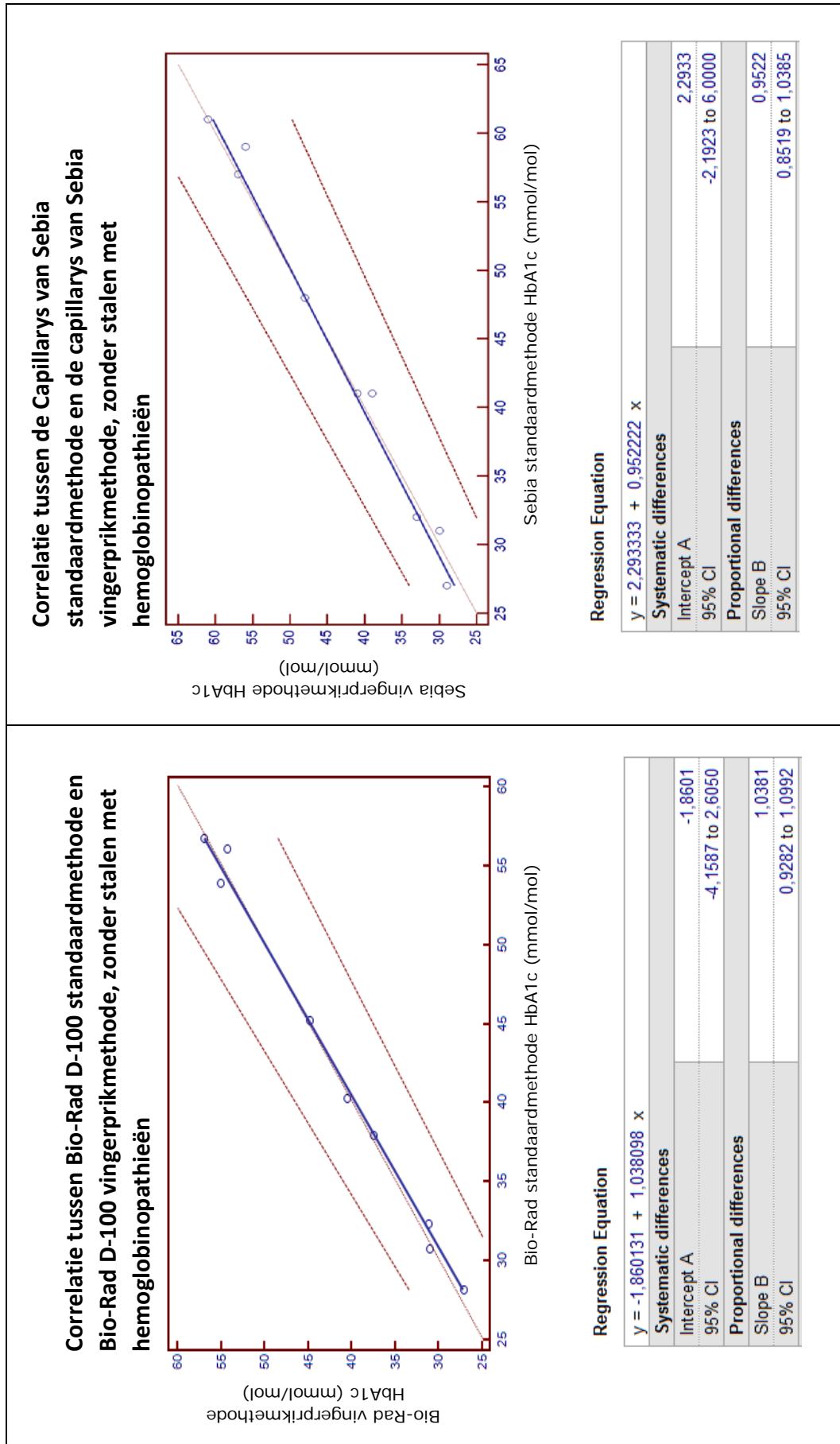
**Correlatie tussen de Capillarys van Sebia en Menarini HA-8180, met stalen met hemoglobinopathieën**



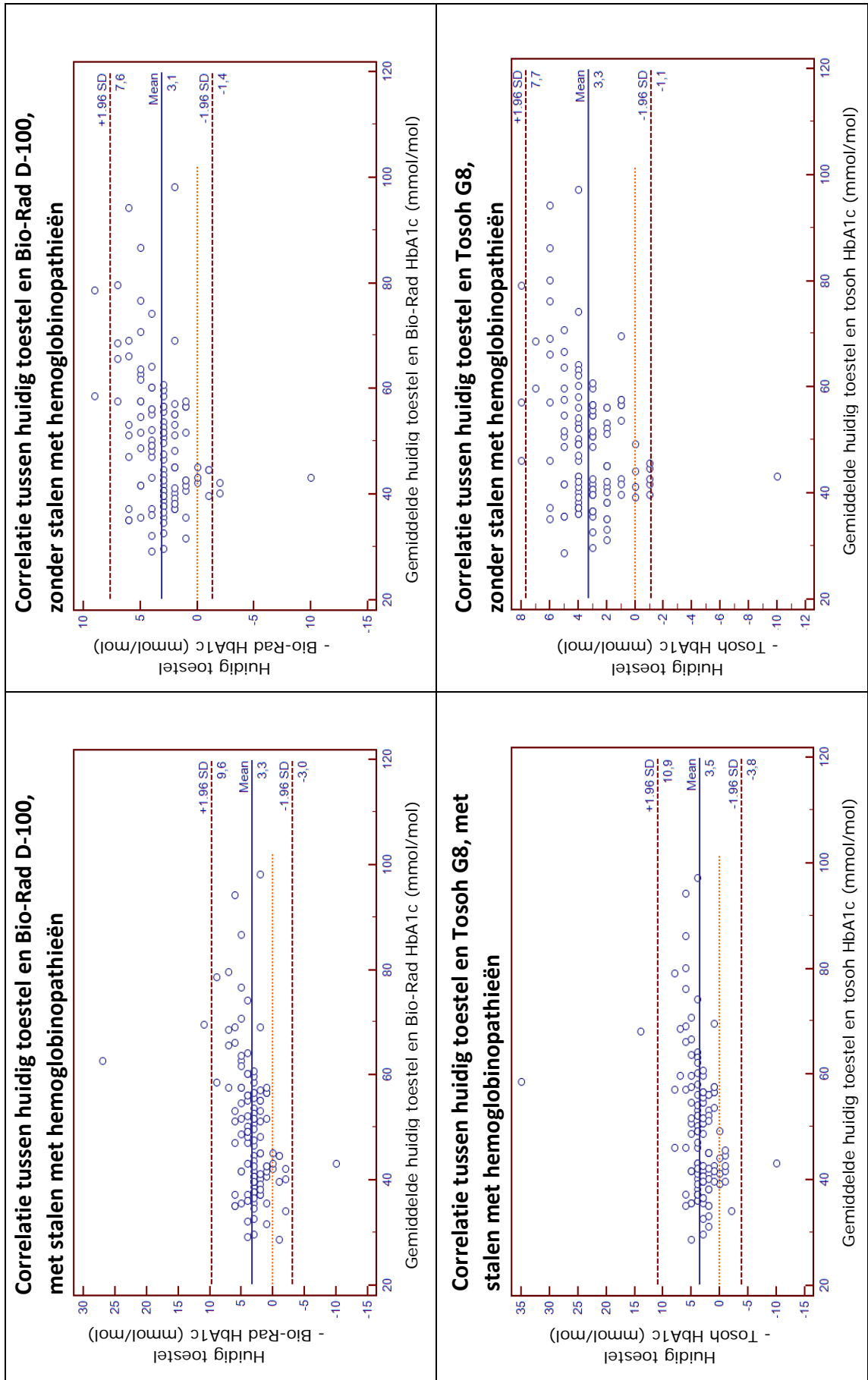
**Correlatie tussen de Capillarys van Sebia en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobinopathieën**

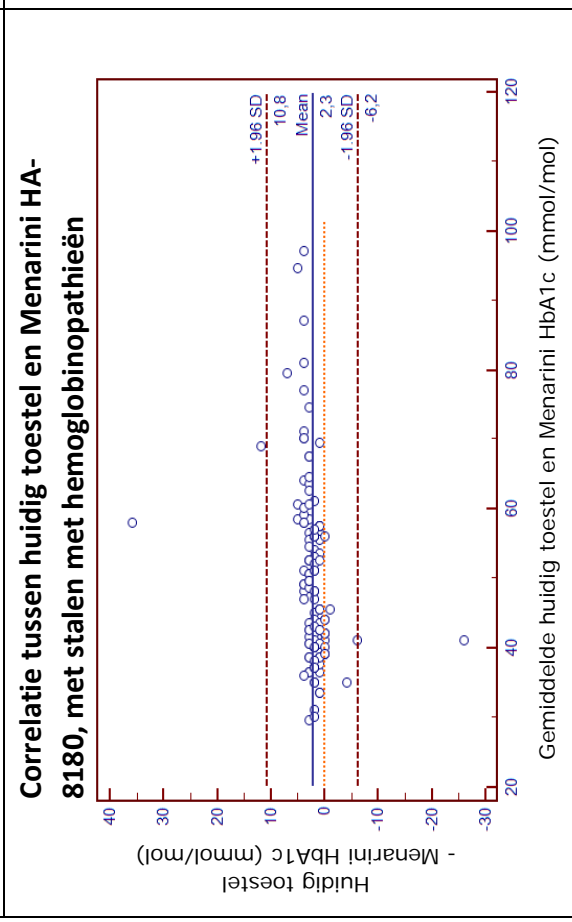
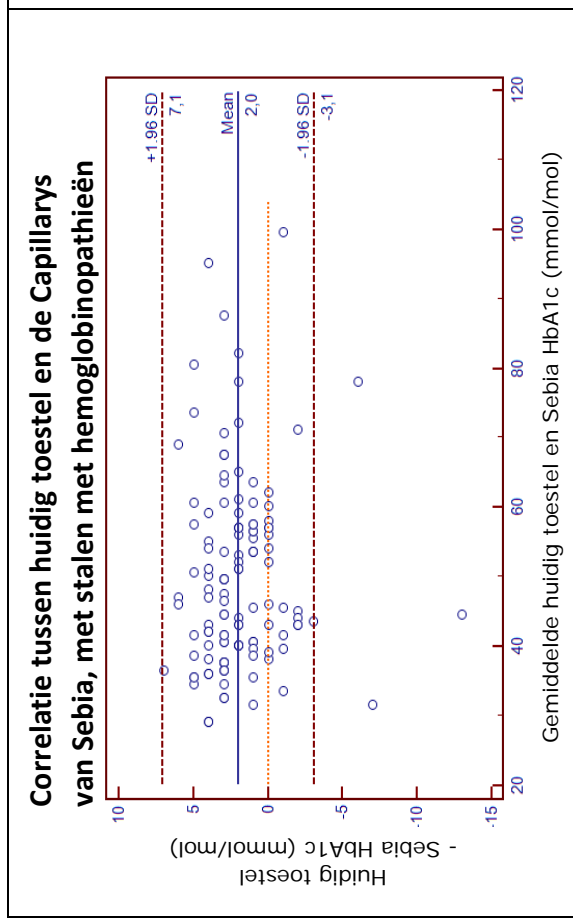
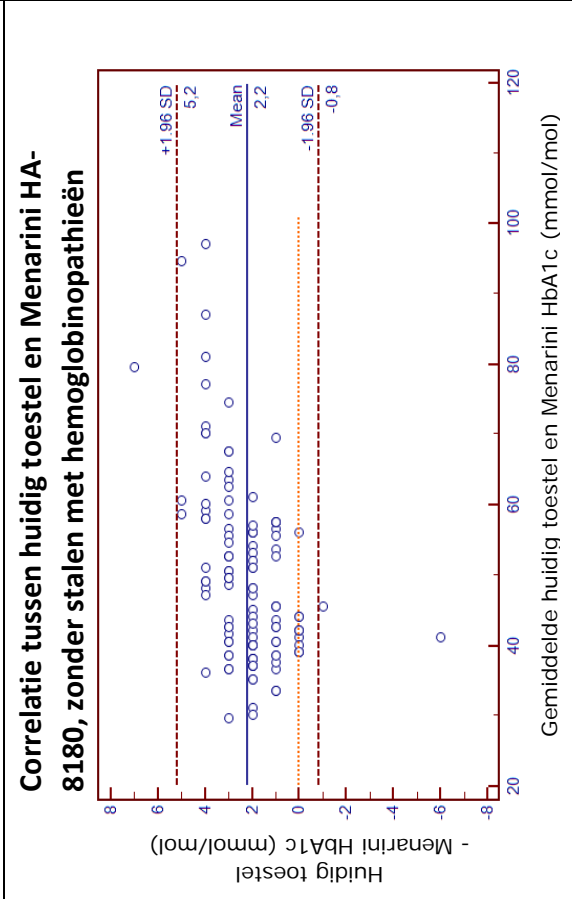
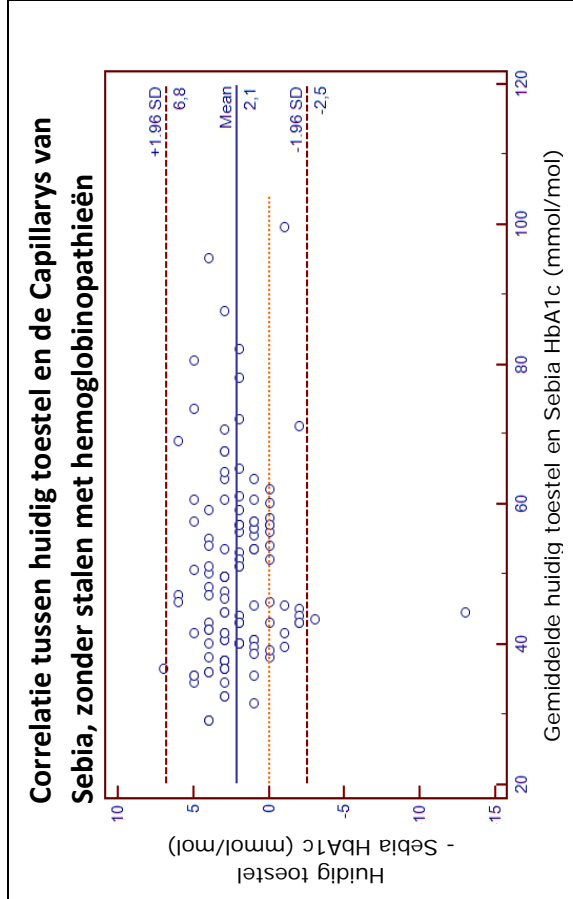


## Bijlage 5: Passing-Bablok regressies: standaardmethode vs. vingerprikmethode

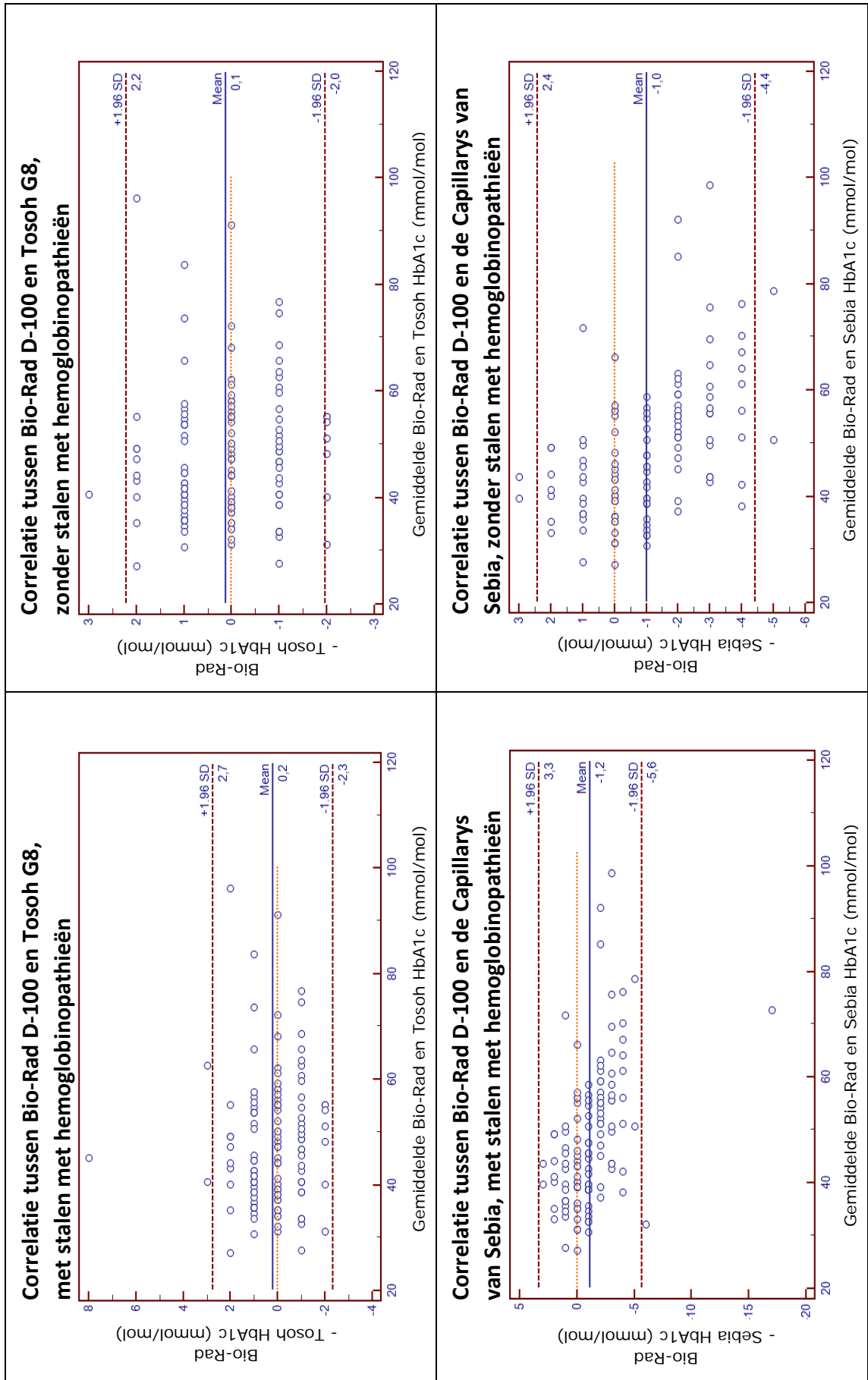


**Bijlage 6: Bland-Altman plot's: comparator toestel ( huidig toestel) vs. nieuwe toestellen**

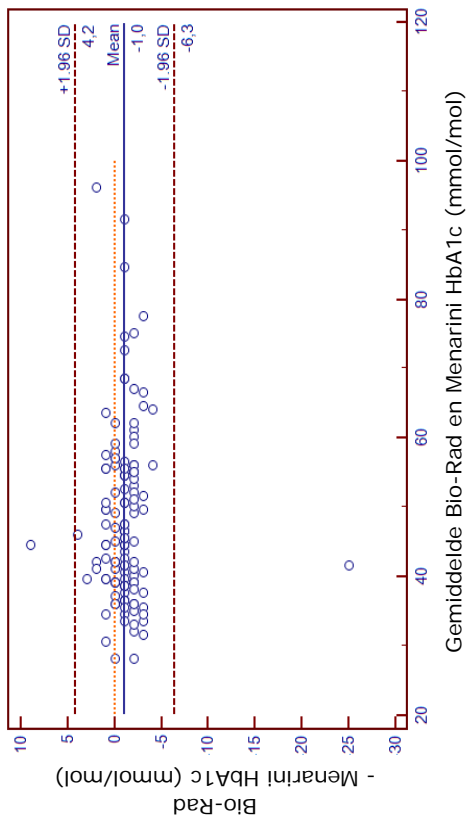




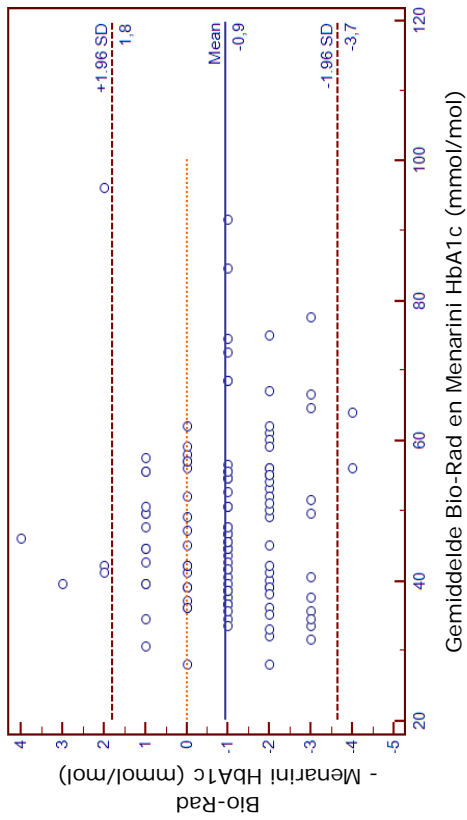
**Bijlage 7: Bland-Altman plot's: correlatie nieuwe toestellen onderling**



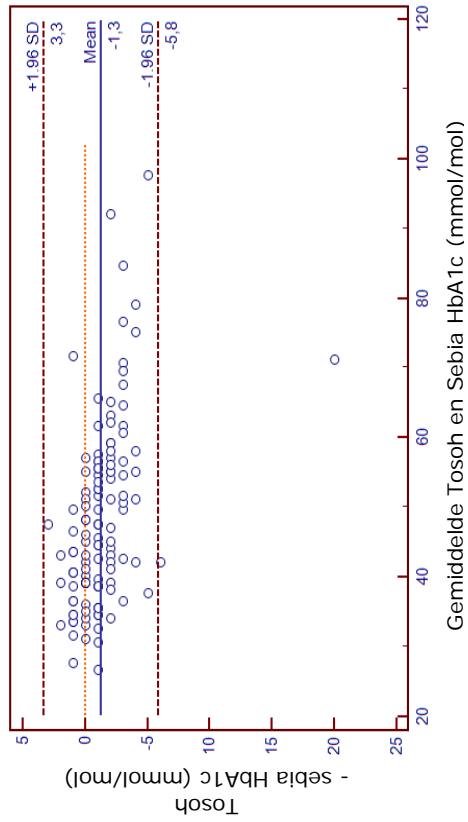
**Correlatie tussen Bio-Rad D-100 en Menarini HA-8180, met stalen met hemoglobopathieën**



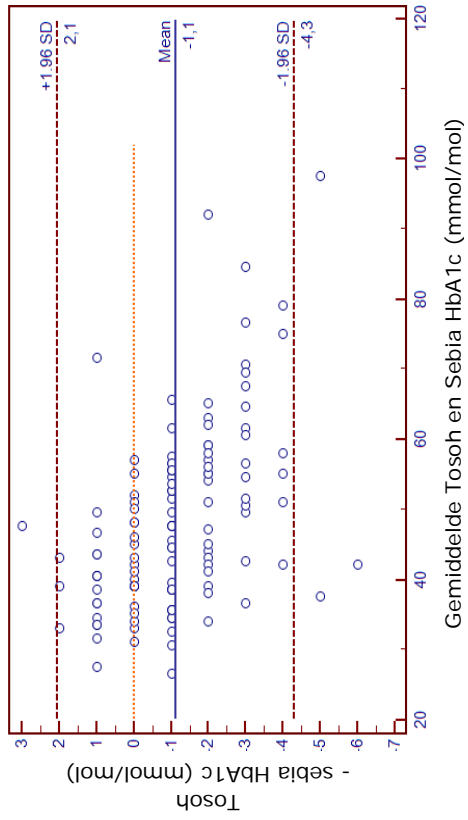
**Correlatie tussen Bio-Rad D-100 en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobopathieën**



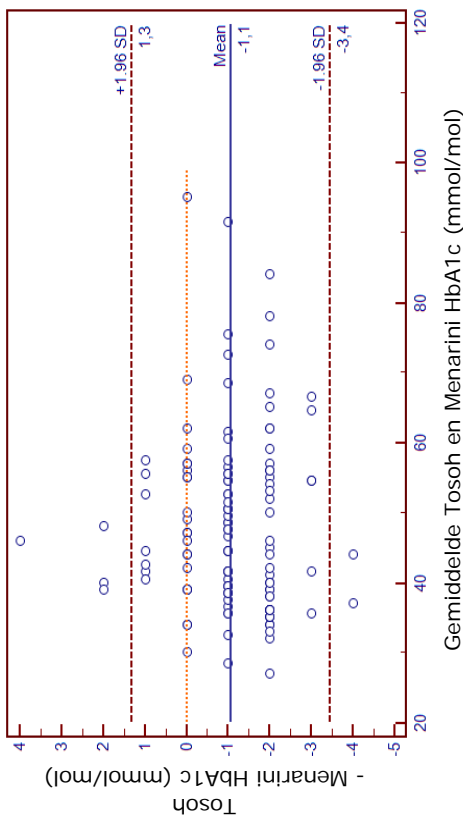
**Correlatie tussen Tosoh G8 en de Capillarys van Sebia, met stalen met hemoglobopathieën**



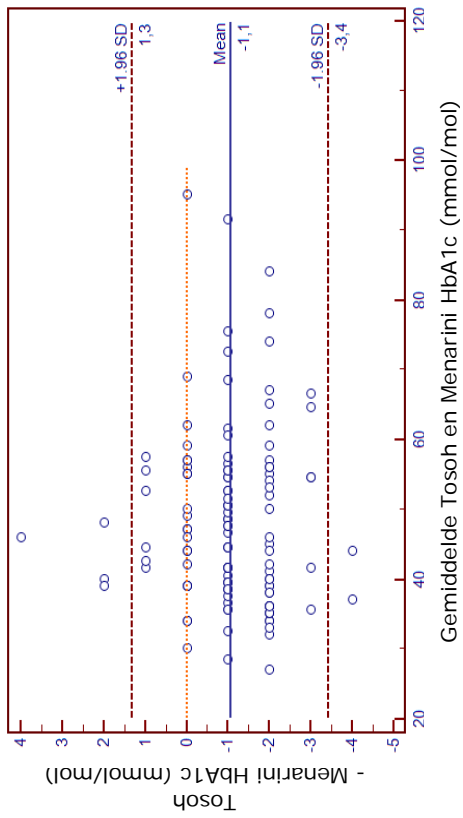
**Correlatie tussen Tosoh G8 en de Capillarys van Sebia, zonder stalen met hemoglobopathieën**



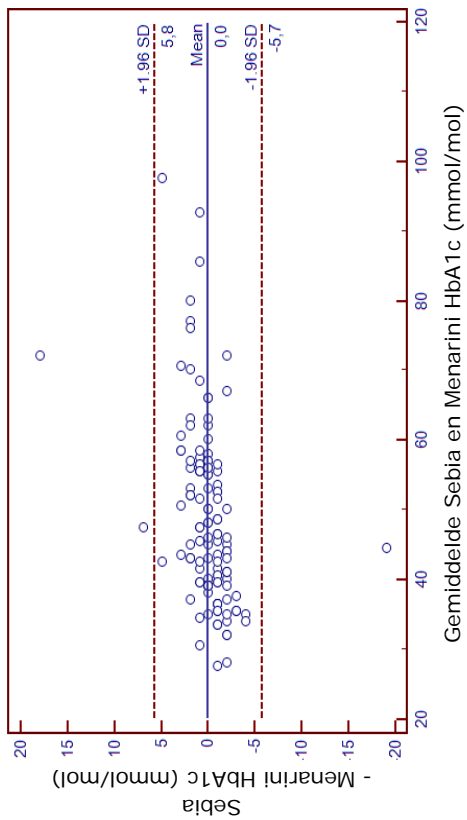
**Correlatie tussen Tosoh G8 en Menarini HA-8180, met stalen met hemoglobinopathieën**



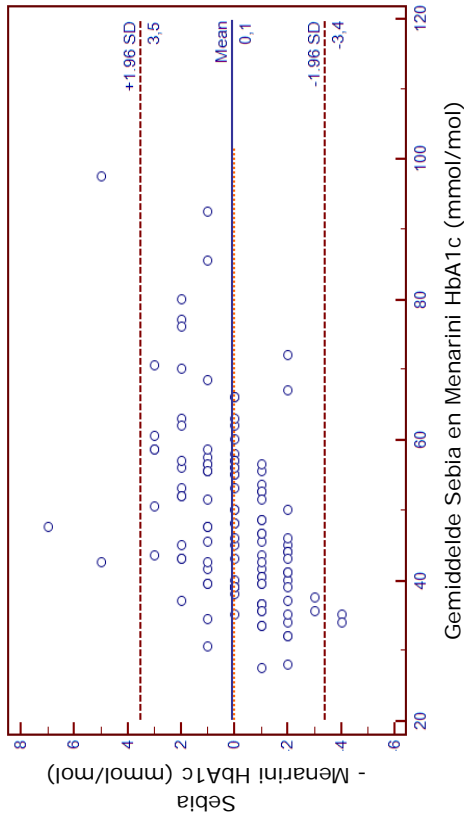
**Correlatie tussen Tosoh G8 en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobinopathieën**



**Correlatie tussen de Capillarys van Sebia en Menarini HA-8180, met stalen met hemoglobinopathieën**



**Correlatie tussen de Capillarys van Sebia en Menarini HA-8180, zonder stalen met hemoglobinopathieën**



## Bijlage 8: Bland-Altman plot's: standaardmethode vs. vingerprikmethode

