

# NycoCard HbA1c fra Nycomed Pharma AS

## Rapport SKUP/1999/3

### Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	2
<b>Planlegging</b> .....	4
<b>Analysemetodene</b> .....	5
<i>NycoCard® HbA1c</i>	
<i>Tina-quant</i>	
<b>Gjennomføring</b> .....	6
<i>Prøvetaking</i>	
<i>Utvelgelse av pasienter</i>	
<i>Innsamling av prøvemateriale</i>	
<i>Utprøving på legekantor</i>	
<i>Produktinformasjon</i>	
<b>Resultater</b> .....	7
<i>Intern kvalitetskontroll, NycoCard® HbA1c</i> .....	7
<i>Presisjon</i> .....	8
<i>Riktighet</i> .....	9
<i>Korrigerering for total Hb</i> .....	18
<i>Påvirkning av hemolyse</i> .....	18
<b>Evaluering av brukervennlighet</b> .....	20
<b>Vedlegg</b> .....	21
<i>Kommentarer fra Nycomed Pharma AS</i>	

## Sammendrag

### *Bakgrunn*

NycoCard® HbA1c er en in vitro hurtigtest for måling av glykosylert hemoglobin i humant fullblod. Det kan benyttes både kapillærblod og venøst blod, med eller uten antikoagulant (EDTA og heparin). Det trengs 5µl blod til analysen, og svaret foreligger i løpet av 3 – 4 minutter. Måleområdet er 3 – 18 % HbA1c.

NycoCard® HbA1c ble relansert på markedet våren 1998, etter å ha gjennomgått en del forandringer og forbedringer.

### *Formål*

- Teste presisjonen på NycoCard® HbA1c under kontrollerte forsøksbetingelser på et klinisk kjemisk laboratorium, samtidig som presisjonen også undersøkes på to laboratorier i primærhelsetjenesten.
- Undersøke riktighet ved sammenligning med en etablert HbA1c-metode.
- Undersøke om HbA1c-resultatet er avhengig av konsentrasjonen av total hemoglobin.
- Undersøke om hemolyse i prøvene påvirker måleresultatet.
- Evaluere systemet med hensyn til brukervennlighet og pålitelighet.

### *Metode*

HbA1c på NycoCard har et prinsipp som er basert på affinitetsbinding. Metoden måler totalt glykohemoglobin, men resultatet angis som HbA1c og tilsvarer DCCT-nivå.

Referansemålingene ble utført på Hitachi 917 fra Boehringer, med en Boehringer metode (kalt Tina-quant) og BM kalibratorer. Fra høsten –98 samsvarer HbA1c-verdier fra Boehringer-metoden med DCCT-nivå.

Innen-serie presisjon ble bestemt vha. 100 venøse prøver analysert i duplikat under kontrollerte forsøksbetingelser på Furst Medisinsk Laboratorium. Prøvene ble reanalysert etter ett døgn for beregning av dag-til-dag presisjon. Målingenes riktighet ble bestemt ved sammenligning med en referansemåling. Ved avvik > 1,5 % HbA1c mellom metodene ble blodprøvene inspisert for hemolyse, og deretter frosset ned for senere analyse av Hb-varianter. Blodprøver med DCCT-fasit fra dr. Cas Weykamp (Queen Beatrix Hospital, Nederland), koordinator for European Reference Laboratory for Glycohemoglobin (ERL), ble analysert i tillegg til pasientprøvene.

Innen-serie presisjon og riktighet ble også bestemt på to legekantor, vha. ca. 40 venøse prøver på hvert sted. De tre utprøvningsstedene fikk tilsendt ekstern kvalitetskontroll fra NOKLUS 08.03.99. Disse kontrollene er også fasitbestemt hos Weykamp. Total Hb i prøvene ble målt på Coulter STKS. Dose-respons-forsøket med hemolyse ble utført ved å blande fullblod og hemolysat til ønskede konsentrasjoner av hemolyse.

Alle målinger på NycoCard HbA1c ble utført med samme lot-nummer av reagenser og testbrikker. De tre Reader II som ble benyttet var samkjørt hos Nycomed før utprøvingen startet.

### *Resultat*

Under kontrollerte forsøksbetingelser er presisjonen (CV) innen-serie i underkant av 2%, og dag-til-dag variasjonen er vel 2%. Resultatet tilfredsstillende et krav om at analytisk upresisjon skal være  $< \frac{1}{2} CV_{\text{intra-individuell}}$ . For HbA1c-verdier  $< 9\%$  gir NycoCard litt høyere verdier enn Tina-quant metoden, og over 9% gir NycoCard lavere verdier enn Tina-quant. Avviket mellom metodene er lite, men signifikant på 5% nivå.

På de to legekantorene er presisjonen innen-serie henholdsvis ca. 2% og ca. 4%. HbA1c-verdiene på legekantorene er for lave i forhold til referansemålingene, og de er også lavere enn NycoCard-resultatene på Fürst. Avviket øker med økende verdi av HbA1c, og er mellom 1 og 2,5 HbA1c % for HbA1c-verdier  $> 9\%$ . Årsaken til at legekantorene får for lave verdier er ikke klar. Det er ikke påvist systematiske brukerfeil på legekantorene, og Readerne som var i bruk var samkjørt hos Nycomed på forhånd.

Det er legekantoret som er kjent med NycoCard fra før som får de beste resultatene. Dette bekrefter at opplæring og oppfølging har stor betydning for analysekvaliteten i primærhelsetjenesten.

### *Evaluerings av brukervennlighet*

NycoCard® HbA1c med Reader II er greit å betjene for trent laboratoriepersonale. Riktig appliseringsteknikk på testbrikken er avgjørende for resultatet. Analysen utføres med kun 5 µl blod. Det har lett for å bli litt søl, fordi det skvetter væske fra korken når reagenskoppen åpnes. Instrumentet har få feilkilder. Feilsøking og vedlikehold er godt forklart i manualen. Det var ingen tekniske problemer med instrumentene i utprøvningsperioden. Det mangler et egnet materiale til intern kvalitetskontroll.

### *Konklusjon*

NycoCard® HbA1c med Reader II egner seg til pasientnær testing av HbA1c, utført av trent laboratoriepersonale. Presisjonen tilfredsstillende analytiske mål for HbA1c-analysen. Under kontrollerte forsøksbetingelser påvises kun mindre avvik fra referansemålingene.

De to utprøvningsstedene i primærhelsetjenesten får lavere verdier enn Tina-quant metoden. For HbA1c-verdier  $> 9\%$  er avviket fra "referansemetoden" for stort, med verdier som ligger mellom 1 og 2,5% HbA1c under referansen.

Det finnes foreløpig ikke et kontrollmateriale som egner seg til intern kvalitetskontroll. Skal riktighet kunne dokumenteres fortløpende, kreves derfor tett oppfølging og kontakt med lokalt klinisk kjemisk laboratorium.

## Planlegging

Etter henvendelse fra Nycomed v/ Marit Åssveen høsten –98, om en utprøving av NycoCard® HbA1c, påtok SKUP seg dette oppdraget i november –98. Utprøvingen skulle følge retningslinjer gitt i boken *Utprøving av analyseinstrumenter*, utgitt på Alma Mater Forlag høsten 1997. Dette innebærer en større utprøving på et klinisk kjemisk laboratorium, og i tillegg en mindre utprøving på minst ett legekantor. Hovedutprøvingen kan utføres på Først medisinsk Laboratorium. I samarbeid med Nycomed, ble også tilleggsundersøkelser for problemstillinger som er spesifikke for HbA1c vurdert. Det var ønskelig at utprøvingen skulle omfatte følgende:

### *Utført på klinisk kjemisk laboratorium*

Innen-serie presisjon  
Dag-til-dag presisjon  
Korrelasjon  
Effekten av hemolyse i blodprøvene  
HbA1c i forhold til total Hb  
Dokumentasjon på NycoCard HbA1c Control  
Evaluering av brukervennlighet og pålitelighet

### *Utført på to legekantor*

Innen-serie presisjon  
Korrelasjon  
Evaluering av brukervennlighet og pålitelighet

For å planlegge utprøvingen og fordele oppgaver, kalte SKUP inn til et møte i Bergen 22. januar. På møtet deltok:

Hilde Myrvold og Pål Rustad, Først med. laboratorium  
Marit Åssveen, produktsjef, Nycomed  
Grete Monsen og Sverre Sandberg, SKUP

På møtet ble vi enige om følgende:

Sverre Sandberg og Grete Monsen har ansvaret for utprøvingen. Hovedutprøvingen utføres av Hilde Myrvold på Først medisinsk Laboratorium. Pål Rustad er rådgiver på statistiske spørsmål. Lise Ørbech, Først med. Laboratorium, peker ut to legekantor som kan delta i utprøvingen. Lise veileder legekantorene og tilrettelegger arbeidet for dem. Nycomed besøker de tre utprøvningsstedene i februar/mars, leverer ut instrument og forbruksvarer, og gir opplæring i bruken av NycoCard HbA1c og Reader II.

Det praktiske arbeidet med utprøvingen skal foregå i perioden mars – april, og bearbeiding av data og skriving av rapport gjøres etter påske. Rapporten diskuteres med Nycomed, og eventuelle endringer og tilføyelser gjøres før utprøvningsoppdraget er ferdig.

Detaljert protokoll for utprøvingen ble skrevet i slutten av januar, og kontrakt om utprøvingen ble undertegnet 11. februar.

Utprøvingen i primærhelsetjenesten gjøres på Gransdalen legesenter og Hegdehaugen legekantor i Oslo. Gransdalen legesenter har tre medarbeidere på laboratoriet, og to av dem deltok i utprøvningsarbeidet. Legesenteret har to legestillinger. Hegdehaugen legekantor har to medarbeidere på laboratoriet, og begge deltok i utprøvingen. Legekantoret har tre legestillinger. Det ene utprøvningsstedet er kjent med NycoCard fra laboratoriets egne rutineanalyser.

## Analysemetodene

### *NycoCard<sup>®</sup> HbA1c*

NycoCard<sup>®</sup> HbA1c er basert på affinitetsbinding. Reagenset inneholder agens som lyserer erytrocyttene og presipiterer hemoglobin spesifikt. Et borsyrekonjugat, koplet til en blå farge, binder cis-diol konfigurasjonen på glykert hemoglobin. Presipitatet evalueres ved å måle blå (glykert hemoglobin) fargeintensitet ved 620 nm og rød (total hemoglobin) fargeintensitet ved 460 nm med Reader II. Systemet måler total mengde glykert hemoglobin, men resultatet angis som HbA1c-verdi. Måleområdet er fra 3 til 18% HbA1c.

Standardiseringen av NycoCard<sup>®</sup> HbA1c er gjort i henhold til European Reference Laboratory for Glycohemoglobin (ERL). Frem til et nytt standardiseringssystem fra IFCC Working Group er tilgjengelig, er NycoCard standardisert mot HbA1c i The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT studien). Fra januar –99 ble standardiseringen av NycoCard justert opp 0,3 – 0,4 % HbA1c for å bedre tilpassingen til DCCT. Utprøvingen er gjort med reagens produsert etter at NycoCard<sup>®</sup> HbA1c ble justert opp.

### *Referansemetoden*

Tina-quant HbA1c er et immunoassay for turbidimetrisk bestemmelse av HbA1c på Boehringers Hitachi-instrumenter. På Først analyseres HbA1c på Hitachi 917. Metoden er standardisert med Boehringer Mannheim (BM) kalibratorer. Fra 01.09.98 startet Boehringer levering av nye HbA1c-reagenser, med en ny standardisering kalt R-02/DCCT. Etter dette skal HbA1c-verdier fra Tina-quant metoden samsvare med DCCT-nivå.

### Analyseprinsipp:

#### *Total hemoglobin*

Blodet forhåndshemolyseres. Hemolysatet tilsettes en fosfatbuffer, og det frigjorte hemoglobinet omdannes til et derivat som måles bikromatisk ved 660/570 nm.

#### *Hemoglobin A1c*

HbA1c i prøven reagerer med et antistoff mot HbA1c (sauenserum) og gir et løselig immunkompleks. Polyhaptent binder overskudd av antistoff og dette komplekset agglutinerer. Agglutinatet måles turbidimetrisk ved 700/340 nm.

## Gjennomføring

### *Prøvetaking og innsamling av prøvemateriale*

Til utprøvingen på Fürst ble det samlet 100 prøver, både fra Fürsts prøvetakingsstasjoner og blant tilsendte prøver. Prøvene ble plukket ut på bakgrunn av HbA1c-verdi etter vanlig analysering i rutinen på Fürst. Dagen etter rutineanalyseringen inngikk de i utprøvingen. Prøvene var da 2 dager gamle. For å redusere antall pipetteringer fra prøvene, og minske faren for forurensning, ble det valgt prøver der det kun var rekvirert HbA1c. Prøvene var tatt venøst med K<sub>3</sub>-EDTA som antikoagulant.

På legekantorene ble prøvene fortrinnsvis tatt av pasienter der det var rekvirert HbA1c. Fürst var behjelpelig med å skaffe noen prøver med høy verdi av HbA1c.

### *Utprøving på Fürst*

Prøvene ble først analysert på ”referansemetoden”. Samme dag ble prøvene analysert i duplikat på NycoCard før reanalysering på ”referansemetoden”. Prøvene ble deretter satt til side til neste dag for ny analysering på Nycocard. Til slutt ble hemoglobin i alle prøvene analysert. Alle analysetrinn på NycoCard-metoden ble standardisert. Stoppeklokke ble benyttet:

1. Felling av hemoglobin.  
Innkubasjon av blod i borsyre var 2 minutter for alle prøvene (oppgitt tid er 2 til 3 minutter).
2. Applisering av prøve.  
Ventetid var 15 sekunder (oppgitt tid er 15 til 20 sekunder).
3. Applisering av vaskeløsning.  
Etter oppgitt ventetid på 1 minutt, ble testresultatet avlest direkte (skal avleses innen 5 minutter).

### *Utprøving på legekantoret*

Marit Åssveen, Nycomed, og Lise Ørbech, Fürst med. Laboratorium, besøkte Gransdalen legesenter 25. februar, og Hegdehaugen legekantor 3. mars. Marit Åssveen ga opplæring i bruken av NycoCard HbA1c og Reader II. Analyseoppskriften ble fulgt på alle punkt, men analysetrinnene ble ikke standardisert som på Fürst. Lise Ørbech instruerte og veiledet medarbeiderne om hvordan arbeidet med utprøvingen skulle foregå, og fulgte opp legekantorene underveis. Etter at prøvene var analysert på legekantoret, ble de sendt til Fürst og analysert i vanlig rutine der, i de fleste tilfeller neste dag.

### *Produktinformasjon*

Under utprøvingen har følgende utstyr og forbruksvarer vært benyttet:

NycoCard<sup>®</sup> HbA1c:

Testkit: 100 27964, med reagens 100 10816, testbrikker 100 14573 og wash solution 100 12019.

NycoCard<sup>®</sup> HbA1c Control (C2): 801090

Control Reconstituting liquid: 805087

Kapillærrør: 021 0532 (og 020 9538 til forsøket med hemolyse)

3 stk. Reader II, med serienumre 14884 (Fürst), 14675 (Gransdalen) og 14886 (Hegdehaugen).

Readerne var samkjørt hos Nycomed før utprøvingen startet.

Tina-quant metoden:

HbA1c kalibrator og reagens fra Roche: 196966

Precinorm HbA1c PNP: 194962 og 196604 (fra 25.03). Precinorm HbA1c PPH: 192705

## Resultater

### *Intern kvalitetskontroll NycoCard® HbA1c*

Det har vært problemer med å finne et tilfredsstillende materiale til intern kvalitetskontroll på NycoCard® HbA1c. Kommersielle, frysetørkede materialer er uegnet pga matrixeffekt.

Hemolysater gir dårligere presisjon enn pasientblod. Nycomed foreslår derfor at fersktappet blod kan være et alternativ som kontrollmateriale. Dette er ikke lett å gjennomføre i legepraksis.

I produktinformasjonen i pakningsvedlegget til NycoCard® HbA1c, anbefales NycoCard HbA1c Control som kontroll på reagensenes stabilitet. Kontrollen er et frysetørket hemolysat, og kan ikke benyttes som riktighetskontroll. Den gir en litt annen felling enn humane blodprøver, noe som fører til at vaskeløsningen trekker litt saktere gjennom membranen på testbrikken.

Variasjoneskoeffisienten kan derfor bli noe høyere enn 5% for kontrollen. For å få mer dokumentasjon på hvordan denne kontrollen fungerer, er den tatt med i utprøvingen, både hos Fürst og på de to legekantorene.

Resultatene er vist i tabell 1.

Rådata, vedlegg I.

Tabell 1. Resultater, Nycocard HbA1c Control

NycoCard HbA1c Control Oppgitt verdi	Analysested	% HbA1c Gjennomsnittsverdi	CV % med 95% konfidensintervall	n
% HbA1c > 10	Fürst	13,0	3,2 (2,5 – 4,4)	27
	Legekantor A	11,8	8,4 (6,3 – 12,4)	19
	Legekantor B	12,6	5,6 (4,5 – 7,5)	30

### *Vurdering*

Oppgitt verdi for NycoCard HbA1c Control er % HbA1c > 10. Kontrollen kan ikke brukes som riktighetskontroll. Analysert under kontrollerte betingelser hos Fürst, er variasjonen på kontrollresultatene i forsøksperioden ikke større enn dag-til-dag variasjonen på pasientprøver på nivå 10,6 % HbA1c. På legekantorene er upresisheten på kontrollresultatene for stor, med en CV på over 5%.

### Presisjon

*Utpøving under kontrollerte forsøksbetingelser. Prøver fra voksne diabetikere*

Innen-serie-presisjon ble beregnet fra 98 pasientprøver målt i duplikat. Prøvene ble reanalysert etter et eller to døgn, og dag-til-dag variasjon ble beregnet. HbA1c-verdiene ble gruppert i 3 nivå, og beregningene ble gjort på hvert nivå. Presisjonen ble også beregnet for alle data samlet. Det ble ikke påvist slengere i datamaterialet.

Resultatene er vist i tabell 2.

Rådata, pasientprøver, vedlegg II.

Tabell 2. Presisjon på NycoCard® HbA1c. Resultater fra Fürst.

Nivå % HbA1c	CV % innen-serie med 95% konfidensintervall	CV % dag-til-dag med 95% konfidensintervall	n
5,6	2,1 (1,7 – 2,8)	2,6 (2,1 – 3,5)	31
7,7	1,5 (1,2 – 2,0)	2,0 (1,6 – 2,6)	34
10,6	1,5 (1,2 – 2,0)	2,1 (1,7 – 2,7)	33
(alle data samlet)	1,7 (1,5 – 2,0)	2,2 (1,9 – 2,6)	98

### Utpøving på to legekantor i primærhelsetjenesten

Innen-serie-presisjonen er beregnet på hvert legekantor fra henholdsvis 52 og 40 pasientprøver målt i duplikat. HbA1c-verdiene ble gruppert i to nivå, og beregningene ble gjort på begge nivå. Det ble ikke påvist slengere i datamaterialet.

Resultatene er vist i tabell 3.

Rådata, pasientprøver, vedlegg III.

Tabell 3. Presisjon på NycoCard® HbA1c. Resultater fra to legekantor (A og B).

Nivå, HbA1c %	Legekantor	CV % innen-serie med 95% konfidensintervall	n
6,3	A	2,0 (1,6 – 2,7)	28
8,7	A	1,8 (1,4 – 2,5)	24
5,5	B	4,4 (3,3 – 6,5)	19
7,8	B	3,3 (2,5 – 4,8)	21

### Vurdering

Et mål for analytisk kvalitet er at en metodes upresisitet bør være mindre enn  $\frac{1}{2} CV_{\text{intraindividuell}}$ . Biologisk variasjon for HbA1c er 4%. Dette medfører at upresisiteten på en HbA1c-metode bør være mindre enn 2%. Målt under kontrollerte betingelser hos Fürst, tilfredsstillende innen-serie presisjonen disse kravene. Dag-til-dag variasjonen er i overkant av 2%.

Legekantor A, som har erfaring med NycoCard fra egne rutineanalyser, reproducerer verdier innen-serie like presist som på Fürst. Legekantor B har noe større variasjon.



## **Riktighet**

### *Referansemåling*

Boehringers Tina-quant metode for måling av HbA1c ble valgt som referansemetode. Metoden er kalibrert til DCCT-nivå. NycoCard® HbA1c er også kalibrert til DCCT-nivå. På Fürst med. Laboratorium analyseres HbA1c med Tina-quant metoden på Hitachi 917. Fürst er et akkreditert laboratorium. De garanterer en dag-til-dag presisjon  $< 3,6\%$  på HbA1c-analysen.

I utprøvsperioden var innen-serie-presisjonen på Tina-quant metoden  $1,8\%$ , beregnet på bakgrunn av pasientprøvene som inngikk i utprøvsperioden. Dag-til-dag variasjonen var ca  $2\%$ , beregnet på bakgrunn av resultatene fra 2 ulike kvalitetskontrollmaterialer. Resultatene fra intern og ekstern kvalitetskontroll var tilfredsstillende under hele utprøvsperioden.

### *Korrelasjon under kontrollerte forsøksbetingelser, vha prøver fra voksne diabetikere.*

Korrelasjonen ble gjort med prøver fra 97 voksne diabetikere (av de opprinnelige 98 prøvene utgikk en pga feilmelding på Hitachi). Gjennomsnittet av duplikatmålingene på NycoCard på Fürst ble sammenlignet med gjennomsnittet av duplikatmålingene på Hitachi 917 (Tina-quant). I den lineære regresjonen ble punkt med residual større enn  $0 \pm 3,5 \cdot SD_{\text{residual}}$  definert som slengere. Faktoren 3,5 er avhengig av signifikansnivå for testen, og antall prøver som inngår i regresjonen. Her er nivå  $5\%$ , antall prøver er 97. Det ble ikke påvist slengere i datasettet.

Rådata, vedlegg II.

### *Sammenligning med "Weykamp-prøver"*

I tillegg til vanlig kvalitetskontroll, ble pasientblod med fasit fra Weykamp analysert flere ganger i løpet av utprøvsperioden, både på Tina-quant metoden og på NycoCard på Fürst.

Ekstern kvalitetskontroll fra NOKLUS ble sendt ut 08.03.99 til primærhelsetjenesten og en del sykehus. Fürst deltar i denne kontrollutsendelsen. NOKLUS-kontrollene er pasientblod med fasit fra Weykamp. Det ble avtalt at det også skulle sendes kontroller til Hilde og de to legekantorene som deltok i utprøvsperioden. NOKLUS-kontrollene ble analysert på "referansemetoden" og på NycoCard på Fürst og på de to legekantorene.

Rådata, Weykampprøver og NOKLUS-kontroller, vedlegg IV.

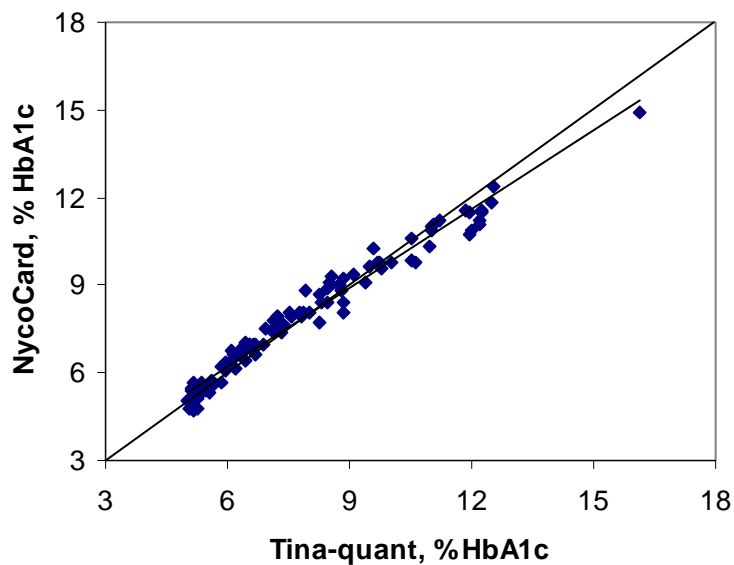
### *Resultater*

Det ble ikke registrert noen prøver med et avvik mellom metodene  $> 1,5\%$  HbA1c. Det ble derfor ikke undersøkt på Hb-varianter i noen av prøvene.

Resultatene av sammenligningen mellom NycoCard® HbA1c og referansemålingene er fremstilt i et spredningsdiagram, figur 1, og i et differanseplott, figur 2.

Resultatene fra lineær regresjon er samlet i tabell 4, og avvik mellom metodene er vist i tabell 5.

Resultatene av sammenligningen med "Weykamp-prøver" er vist i figur 3.



Figur 1. Spredningsdiagram med lineær regresjonslinje og ideel linje. Prøver av 97 diabetikere.

Tabell 4. Lineær regresjon

Regresjonsligning: $y = 0,89x + 0,90$ Determinasjonskoeffisient; $R^2 : 0,97$ Standardfeil $SE_{y/x}$ : 0,383 Antall observasjoner: 97 Antall slengere: 0 Usikkerhet ved beregnet vinkelkoeffisient, $SE_a$ : 0,016 Usikkerhet ved beregnet intercept, $SE_b$ : 0,136 Vinkelkoeffisient a er signifikant $\neq 1$ , $p < 0,001$ Skjæringspunkt b er signifikant $\neq 0$ , $p < 0,001$
--

Tabell 5. Avvik (bias) mellom metodene.

Nivå % HbA1c	NycoCard® HbA1c – referanse Gjennomsnittsdifferanse med 95 % konfidensintervall	SD for differansene	Antall differanser	t-verdi
< 7	0,15 (0,067 - 0,237)	0,27	41	2,02
7 – 9	0,27 (0,124 - 0,416)	0,38	29	2,05
> 9	-0,38 (-0,577 - -0,183)	0,50	27	2,05

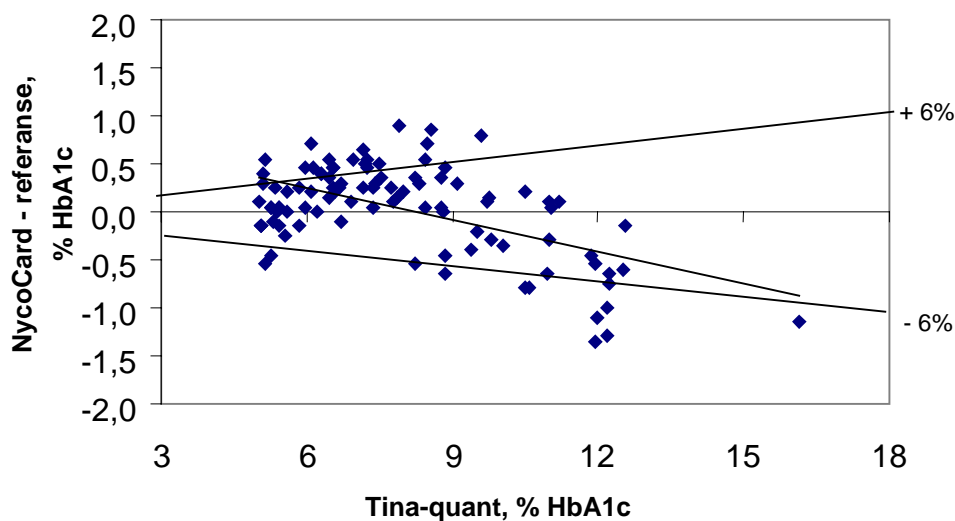
### Vurdering

Den lineære sammenheng mellom metodene er tilfredsstillende ( $R^2 = 0,97$ ). Metodene er ikke helt enige. Regresjonslinjen avviker litt fra den ideelle linjen  $y = x$ . Regresjonslinjens vinkelkoeffisienten er signifikant forskjellig fra 1, og skjæringspunktet med y-aksen er signifikant forskjellig fra 0. HbA1c-verdier opp til ca. 9% blir derfor litt høyere på NycoCard enn på Tina-quant-metoden, mens verdiene på NycoCard blir lavere enn Tina-quant på et HbA1c-nivå  $> 9\%$ .

Det påvises et lite avvik mellom metodene (på 5% signifikansnivå). Med god presisjon på begge metoder, blir standardavviket for differansen mellom metodene lavt, og små avvik påvises som signifikante. Avviket påvises på 3 ulike konsentrasjonsnivå av HbA1c. Gjennomsnittsdifferansen (NycoCard – referanse) er svak positiv for HbA1c-verdier under 7%, litt større for verdier mellom 7 og 9%, og negativ for verdier over 9%. Dette tyder på at sammenhengen mellom metodene ikke er helt lineær. En eventuell ikke-lineær sammenheng sees lettere i et differanseplott enn i korrelasjonsplottet.

### Differanseplott.

Differanseplottet er tegnet med gjennomsnittet av referansemålingene på x-aksen, og med NycoCard minus gjennomsnittet av referansemålingen på Y-aksen. Med referansemålingen på x-aksen (i stedet for gjennomsnittet av de to metodene) får de ulike differanseplottene i utprøvingen felles x-akse, og en sammenligning av resultatene på Fürst og de to legekantorene blir lettere. Grensene i differanseplottet er basert på de to metodenes dag-til-dag presisjon. Det er ikke signifikante forskjeller på upresisiteten på de ulike konsentrasjonsnivå. Dag-til-dag variasjonen for det samlede datamaterialet (98 målinger på Fürst) er 2,2% på NycoCard og 2,0% på referansemetoden. Beregnet CV for differansen mellom de to metodene er 3%, og 95% toleransegrenser for differansene mellom metodene 6%. Det forventes at 95% av punktene skal falle innenfor disse grensene, hvis det ikke er systematisk avvik mellom metodene. Grensene på  $\pm 6\%$  er sammenfallende med skillet mellom "akseptabel" og "dårlig" som benyttes av NOKLUS i bedømmelsen av resultater på ekstern kvalitetskontroll på HbA1c.



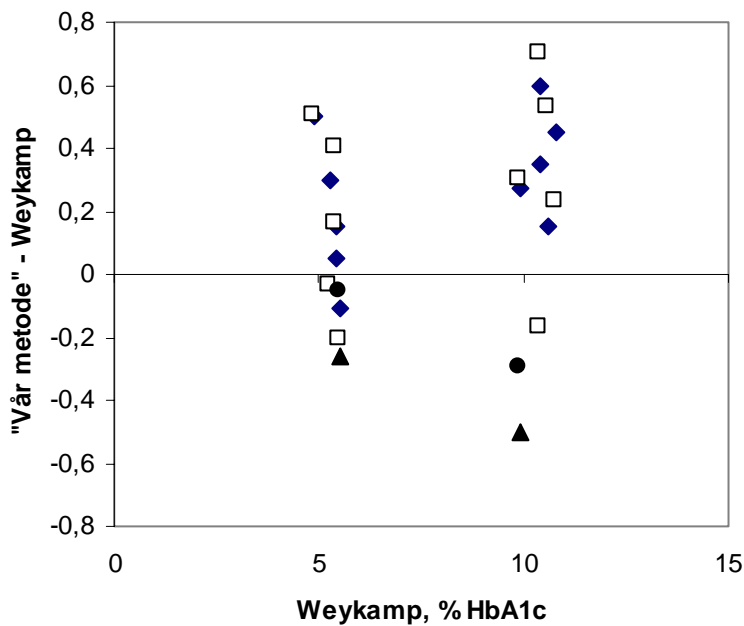
Figur 2. Differanseplott med referansemålingene på X-aksen, og forskjellen mellom NycoCard og referansemålingen på Y-aksen. Prøver av 97 diabetikere.

### Vurdering

Det påvises et systematisk avvik mellom metodene. For verdier  $< 9\%$  HbA1c gir NycoCard høyere verdier enn Tina-quant metoden, og for verdier  $> 9\%$  HbA1c gir NycoCard lavere verdier enn Tina-quant. Vinkelkoeffisienten og skjæringspunktet for en trendlinje gjennom punktene er signifikant forskjellig fra null.

Differanseplottet styrker oppfatningen av en ikke-lineær sammenheng mellom metodene.

### Sammenligning med referansemetode. "Weykamp-prøver"



Figur 3. Differanseplott med "Weykamp-fasit" på X-aksen, og forskjellen mellom "våre metoder" og Weykamp på Y-aksen. Hvert punkt representerer gjennomsnittet av et ulikt antall målinger (se vedlegg IV).

♦ er Tina-quant på Først og □ er NycoCard på Først. ▲ er legekantor A, ● er legekantor B.

### Vurdering

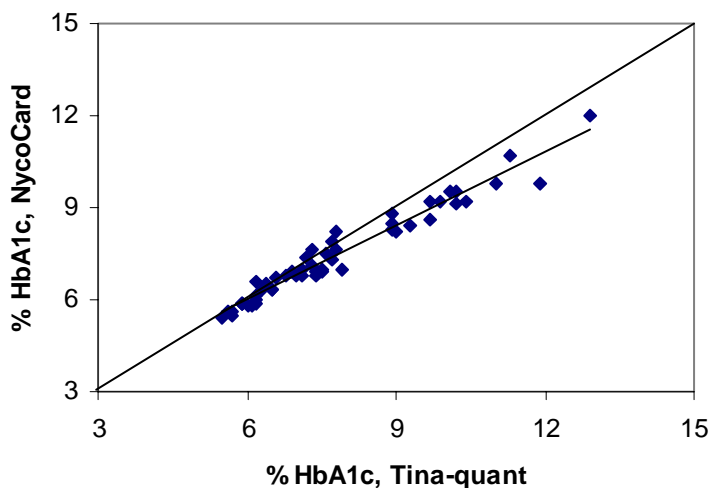
Tina-quant ligger litt for høyt i forhold til Weykamp. NycoCard HbA1c på Først gir omtrent samme resultater på "Weykamp-prøvene" som Tina-quant. De to legekantorene får verdier som både ligger lavere enn NycoCard- og Tina-quant-verdiene fra Først, og lavere enn fasit fra Weykamp.

### Korrelasjon og regresjon på legekantorene

Korrelasjonen ble gjort med henholdsvis 52 og 40 prøver fra voksne diabetikere. 1. måleresultat fra NycoCard® HbA1c på legekantor A og B ble sammenlignet med målingen på Hitachi 917 (Tina-quant). I den lineære regresjonen på legekantor A ble punkt med residual større enn  $0 \pm 3,3 \cdot SD_{\text{residual}}$  definert som slengere. På legekantor B ble punkt med residual større enn  $0 \pm 3,2 \cdot SD_{\text{residual}}$  definert som slengere. Faktorene 3,3 og 3,2 er avhengig av signifikansnivå for testen, og antall prøver som inngår i regresjonen. Her er nivå 5%, antall prøver er 52 og 40. Det ble ikke påvist slengere i de to datasettene.

### Resultater

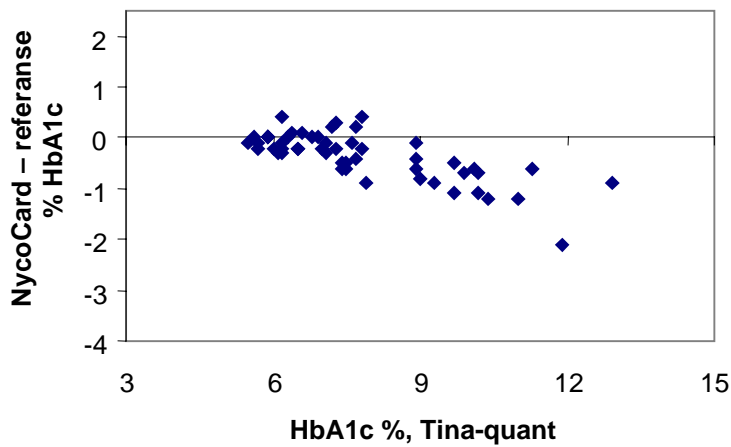
Resultatene av sammenligningen mellom NycoCard® HbA1c på legekantor A og B og referanse-målingene er fremstilt i to spredningsdiagram, figur 4 og 6, og i to differanseplott, figur 5 og 7. Resultatene fra lineær regresjon er samlet i tabell 6 og 7.



Figur 4. Spredningsdiagram med lineær regresjon på legekantor A. Prøver av 52 voksne diabetikere.

Tabell 6. Lineær regresjon, legekantor A

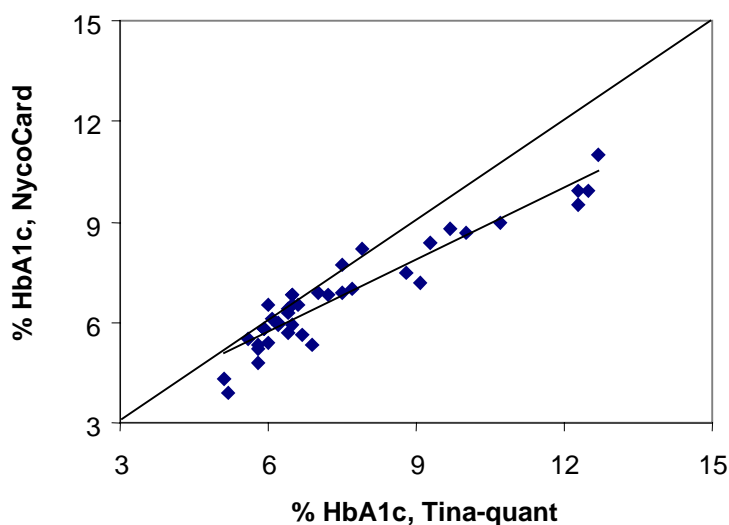
Regresjonsligning: $y = 0,80x + 1,18$ Determinasjonskoeffisient, $R^2$ : 0,96 Standardfeil $SE_{y/x}$ : 0,312 Antall observasjoner: 52 Antall slengere: 0 Usikkerhet ved beregnet vinkelkoeffisient, $SE_a$ : 0,024 Usikkerhet ved beregnet intercept, $SE_b$ : 0,192 Vinkelkoeffisient a er signifikant $\neq 1$ , $p < 0,001$ Skjæringspunkt b er signifikant $\neq 0$ , $p < 0,001$
--



Figur 5. Differanseplott med Tina Quant på X-aksen, og forskjellen mellom NycoCard på Legekantor A og referansemålingene på Y-aksen. Prøver av 52 voksne diabetikere.

### Vurdering

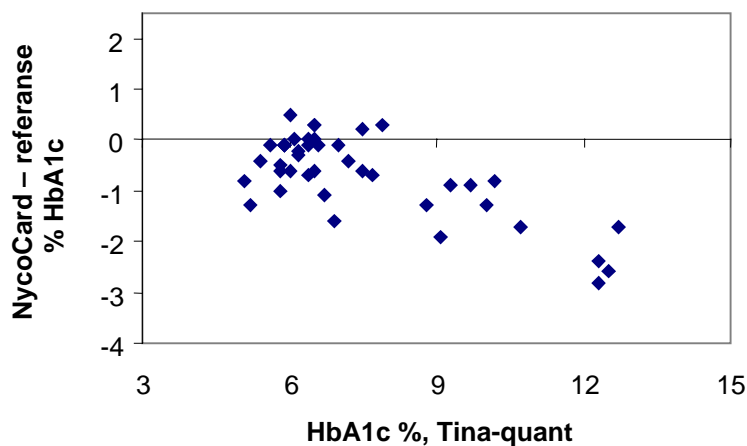
Sammenhengen mellom NycoCard-resultatene på legekantor A og referansemålingene ser tilnærmet lineær ut. Determinasjonskoeffisienten,  $R^2$ , er 0,96, og dette tilsier at den lineære sammenhengen er tilfredsstillende. Legekantoret har ingen målinger av HbA1c lavere enn 5,4%, noe som kan forklare at en eventuell ikke-lineære sammenhengen ikke vises tydeligere her. For HbA1c-verdier mellom 5,5 og ca. 7% samsvarer resultatene fra legekantor A bra med referansemålingene. For HbA1c-verdier over 9%, får legekantor A for lave verdier i forhold til referansemetoden, og lavere enn målinger gjort på NycoCard på Først. En kalibrering av Tina-quant metoden i forhold til "Weykamp-prøvene" ville justert inn noe av dette avviket.



Figur 6. Spredningsdiagram med lineær regresjon på legekantor B. Prøver av 40 voksne diabetikere.

Tabell 7. Lineær regresjon, legekantor B

Regresjonsligning: $y = 0,71x + 1,48$ Determinasjonskoeffisient, $R^2 : 0,89$ Standardfeil $SE_{y/x}$ : 0,549 Antall observasjoner: 40 Antall slengere: 0 Usikkerhet ved beregnet vinkelkoeffisient, $SE_a$ : 0,041 Usikkerhet ved beregnet intercept, $SE_b$ : 0,320 Vinkelkoeffisient a er signifikant $\neq 1$ , $p < 0,001$ Skjæringspunkt b er signifikant $\neq 0$ , $p < 0,001$
--



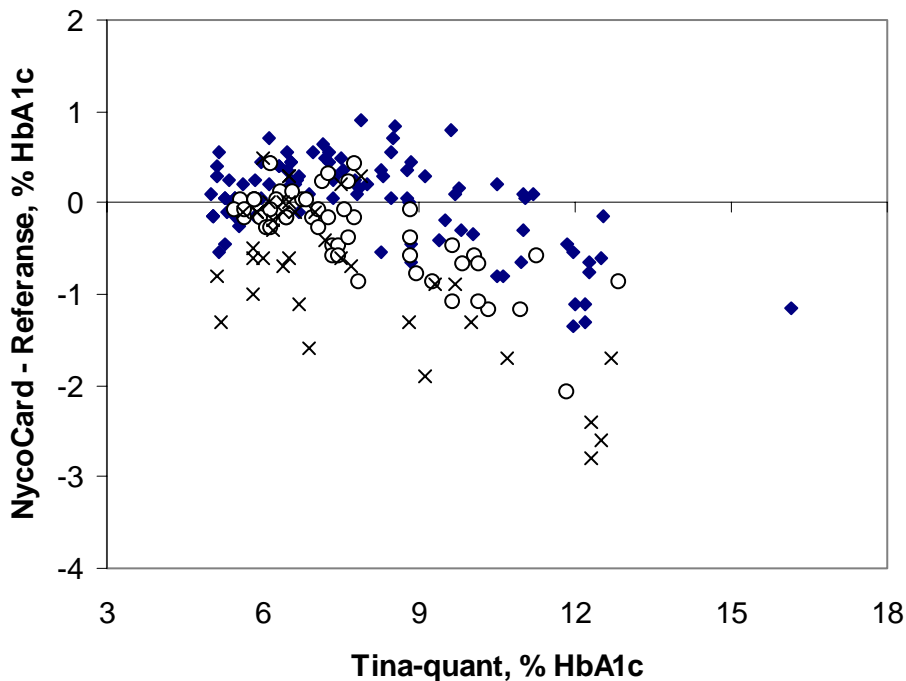
Figur 7. Differanseplott med Tina-quant på X-aksen, og forskjellen mellom NycoCard på Legekantor B og referansemålingene på Y-aksen. Prøver av 40 voksne diabetikere.

### Vurdering

Den lineære sammenhengen mellom NycoCard-resultatene på legekantor B og referansemålingene er ikke tilfredsstillende ( $R^2 = 0,89$ ). Standardfeilen  $SE_{y/x}$  er større enn på de to andre utprøvningsstedene. I differanseplottet fremtrer en mulig ikke-lineær sammenheng mellom metodene.

Legekantor B får for lave verdier på NycoCard HbA1c-målinger  $> 6\%$ . Avviket fra referansemetoden er for stort. En kalibrering av Tina-quant metoden i forhold til ”Weykamp-prøvene” ville justert inn noe av dette avviket. Resultatene på legekantor B er lavere enn målingene på NycoCard på Fürst, og lavere enn resultatene på legekantor A.

Forskjellen mellom NycoCard og Tina-quant på de tre utprøvningsstedene er vist i et differanseplott for hele datamaterialet, figur 8.



Figur 8. Differanseplott med verdiene fra Tina-quant på X-aksen, og forskjellen mellom NycoCard og referansemålingene på Y-aksen.

◆ viser resultater fra NycoCard på Fürst, ○ fra legekantor A og x fra legekantor B.

### Vurdering

Avviket som er påvist mellom Tina-quant metoden og målinger gjort på NycoCard under kontrollerte betingelser hos Fürst er lite. Avviket ville høyst sannsynlig blitt rettet opp ved en justering av Tina-quant i forhold til ”Weykamp-prøvene”.

Legekantorene får verdier som ligger for lavt i forhold til referansemålingene.

De største systematiske forskjellene ligger mellom NycoCard-analysene på de tre utprøvningsstedene. Legekantor A får lavere verdier enn målinger på NycoCard på Fürst. Legekantor B får verdier som ligger enda lavere enn legekantor A.

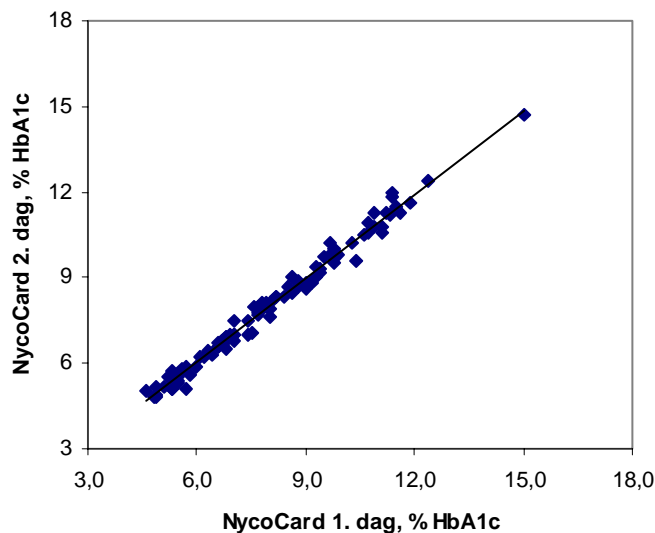
Hva kan være årsaken til at legekantorene får for lave verdier?

- Av feilkilder knyttet til NycoCard-metoden, oppgir Nycomed at for kort inkuberingstid gir for lave verdier. Inkuberingstid skal være fra 2 til 3 minutter. NycoCard HbA1c reagentet er ømfintlig for lys. Utsettes det for sollys vil reagentet over tid deaktiveres og prøveresultatene underestimeres. På Fürst var innkuberingen konsekvent 2 minutter. Medarbeiderne på de to legekantorene har fulgt oppskriften og utført analysene slik de ble opplært til. Det ser ikke ut til at systematiske brukerfeil kan forklare de observerte forskjellene.
- På de to legekantorene ble HbA1c-målingene utført av fire personer. Volum- eller pipetteringsfeil er neppe forklaringen på at de får for lave verdier. HbA1c måles i forhold til total hemoglobin, og dette gjør at metoden er robust med tanke på oppmåling av volumer og pipetteringsteknikk. Luftbobler på testbrikken gir i følge Nycomed for høye verdier.



- De tre utprøvningsstedene har hatt tre forskjellige Reader II i bruk. Dette kan forklare systematiske forskjeller. De tre Readerne som ble brukt i denne utprøvingen var samkjørt hos Nycomed før utprøvingen startet, og er kontrollert på nytt etter utprøvingen. Nycomed har ikke funnet feil ved disse instrumentene.
- Tidsintervallet for analysering har vært forskjellig på de tre utprøvningsstedene. På Fürst ble analyseringen på NycoCard og Tina-quant gjort tilnærmet parallelt, på prøver som var 2 dager gamle. Legekontorene målte HbA1c på Nycocard samme dag som prøven ble tatt. Deretter ble den sendt til Fürst for analyse en til to dager senere. Ser man på regresjonen mellom første måling dag 1 og måling dag 2 på Nycocard hos Fürst (vist i figur 9 og tabell 8), er disse identiske. Hvis det skjer noe med prøven som er årsaken til de systematiske forskjellene, må dette skje umiddelbart etter prøvetaking.

*Holdbarhet av prøvematerialet. Sammenligning av målinger utført dag 1 og dag 2.*



Figur 9. Spredningsdiagram med lineær regresjon for målinger på NycoCard dag 1 og dag 2.

Tabell 8. Lineær regresjon for målinger på NycoCard dag 1 og dag 2.

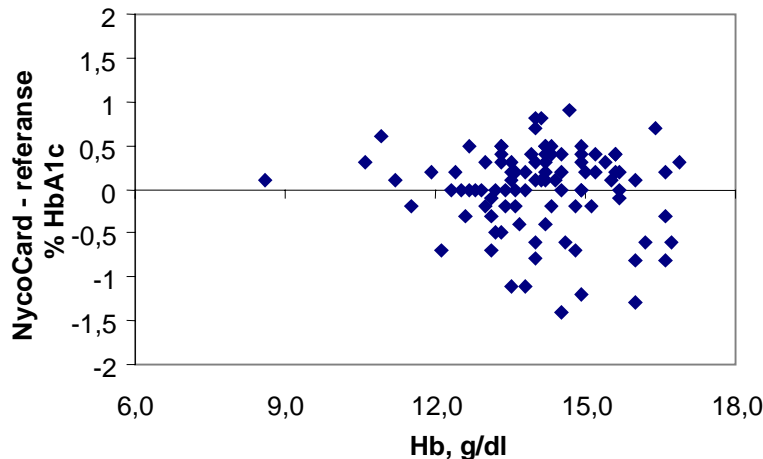
<p>           Regresjonsligning: <math>y = 0,98x + 0,14</math>            Determinasjonskoeffisient, <math>R^2</math>: 0,99            Standardfeil <math>SE_{y/x}</math>: 0,248            Antall observasjoner: 97            Usikkerhet ved beregnet vinkelkoeffisient, <math>SE_a</math>: 0,012            Usikkerhet ved beregnet intercept, <math>SE_b</math>: 0,097            Vinkelkoeffisient <math>a</math> er ikke signifikant <math>\neq 1</math>, <math>0,05 &lt; p\text{-verdi} &lt; 0,1</math>            Skjæringspunkt <math>b</math> er ikke signifikant <math>\neq 0</math>, <math>p\text{-verdi}</math>: 0,11         </p>
---

### ***HbA1c i forhold til total Hb***

NycoCard® Reader II korrigerer for Hb-konsentrasjoner i området 6 – 18 g/dl og gir feilmelding ved for lave og for høye Hb-konsentrasjoner. Hb i prøvene ble målt på Coulter STKS, og HbA1c-resultatene er vurdert i forhold til total Hb i prøvene.

Avvik fra referanse i forhold til Hb er fremstilt i figur 10.

Rådata Hb, vedlegg II.



Figur 10. Differanseplott med Hb-verdi på X-aksen, og forskjellen mellom NycoCard HbA1c og referansemålingene på Y-aksen. Prøver av 97 diabetikere.

### ***Vurdering***

Hb i de aktuelle prøvene ligger i et område mellom 10 og 17 g/dl. Differansene mellom de to metodene fordeler seg jevnt rundt null-linjen. Vinkelkoeffisient og skjæringspunkt for en trendlinje gjennom punktene (ikke inntegnet) er ikke signifikant forskjellig fra null. Det ser dermed ikke ut som om forskjellene som er påvist mellom NycoCard® HbA1c og referansemålingene har sammenheng med Hb i prøvene. NycoCard® Reader II korrigerer korrekt for Hb-konsentrasjoner i området 10 til 17 g/dl.

### ***Påvirkning av hemolyse***

#### ***Bakgrunn for forsøket***

I følge opplysninger fra Nycomed, gir ikke hemolysater tilfredsstillende resultater på NycoCard® HbA1c. Hemolysater er derfor ikke egnet som kvalitetskontrollmateriale. Interne forsøk hos Nycomed har vist at synlig hemolyse gir for lave resultater og større variasjon. Grad av hemolyse som påvirker måleresultatet er ikke kvantitert.

Det skal settes opp forsøk hos Nycomed for å undersøke i hvilken grad svært høye konsentrasjoner av hemolyse (opp til 4 g/dl) påvirker HbA1c-resultatet. I praksis vil hemolyse i en blodprøve gi konsentrasjoner av Hb i plasma mellom 200 og ca. 900 mg/l. Hemolysen blir synlig rundt 300 mg/l. Det var ønskelig å undersøke om slike konsentrasjoner av hemolyse i prøven påvirker måleresultatet. Det er satt opp et dose-respons-forsøk med konsentrasjoner av Hb i plasma fra 125 til 833 mg/l.

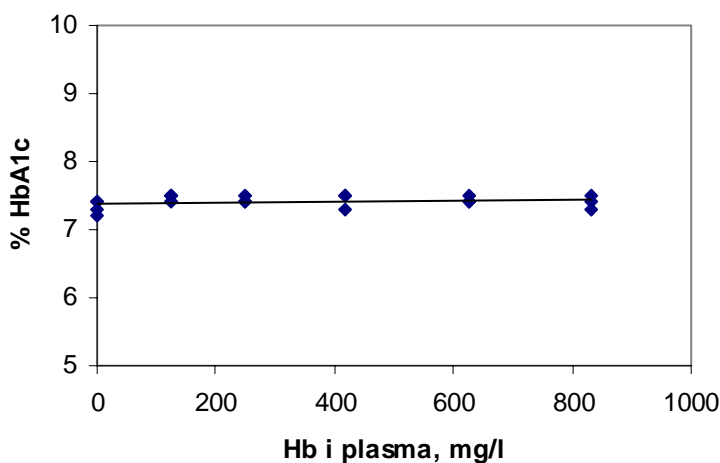
### Forsøksdesign

Forsøket ble utført i en blodprøve med HbA1c på 7,5%, fordi dette er et klinisk avgjørende nivå. Hemolysatet ble fremstilt fra samme blodprøve, ved oppslemming i destillert vann. Hemolysat ble tilsatt til 5 ulike sluttkonsentrasjoner av Hb i plasma, fra 125 til 833 mg/l.

Antall prøver som er nødvendig på hvert nivå av hemolyse er avhengig av metodens presisjon og størrelsen på den effekten vi ønsker å påvise. Klinisk relevant forskjell i HbA1c-verdi antas å være ca. 5%. Forsøket ble satt opp slik at hvis det er mer enn 5% forskjell mellom prøver med og uten hemolyse, vil dette oppdages med mer enn 95% sikkerhet (testens styrke). Signifikansnivå er 5%. Metodens CV på dette nivå av HbA1c er 1,5%. Forsøket kunne derfor settes opp med 3 målinger på hvert nivå.

Påvirkning av hemolyse ble beregnet som forskjellen mellom gjennomsnittene av prøve uten hemolyse (kontrollprøven) og samme prøve tilsatt hemolysat i ulike mengder. Hvis denne forskjellen er  $\approx 0$ , er det ikke påvist effekt av hemolyse.

Resultatene av forsøket er vist i figur 10 og i tabell 8.



Figur 10. Effekt av hemolyse

Tabell 8. Effekt av hemolyse

Hb i plasma mg/l	Gjennomsnittsdifferanse Hemolyseprøve – kontrollprøve % HbA1c	95% konfidensintervall
125	0.14	(- 0.042 – 0.322)
250	0.10	(- 0.082 – 0.282)
417	0.10	(- 0.082 – 0.282)
625	0.10	(- 0.082 – 0.282)
833	0.07	(- 0.112 – 0.252)

### Vurdering:

Forskjellen mellom prøver tilsatt ulik konsentrasjon av hemolyse og kontrollprøven er  $\approx 0$ . Alle konfidensintervallene inneholder verdien 0. Det er ikke påvist at hemolyse i et konsentrasjonsområde av Hb i plasma fra 125 til 833 mg/l påvirker målingen av HbA1c.

## Evaluering

NycoCard Reader II er evaluert etter spørreskjemaene i utprøvningsboken. De viktigste kommentarene er oppsummert her:

### *Utprøving på Først med. lab:*

Positive kommentarer:

- Instrumentet er enkelt å betjene.
- Enkelt vedlikehold. Godt forklart i manualen. Tar liten tid.
- Instrumentet tar liten plass.
- Manualen er oversiktlig og grei.
- Få feilkilder.
- Kort analyseringstid.
- Ferdig opp-pipettert reagens.
- Lite prøvevolum.

Negative kommentarer:

- Det har lett for å skvette litt reagens, reagens/blod når korken taes av.
- Før man har kommet inn i pipetteringsteknikken er det lett å få luftbobler når man appliserer prøveløsning og vaskeløsning på testbrikken.
- Instrumentet har ikke pasient identifikasjon, eller annen nummerering.
- Instrumentet har ikke minnefunksjon.
- Mangler egnet kontrollmateriale for intern kvalitetskontroll

Gode tips:

- Utreneede personer bør øve på pipetteringsteknikken før instrumentet settes i rutine, da det er lett å få luftbobler ved appliseringen på testbrikken.

### *Utprøving på legekantor:*

Positive kommentarer:

- God opplæring fra leverandør.
- Enkelt å håndtere.
- Lite og greit vedlikehold.
- Lett kalibrering.
- Få feilkilder.
- Raske svar.
- Tar liten plass.

Negative kommentarer:

- Instrumentet slår seg av etter analysering.
- Søl fra reagenskopp.

Gode tips:

- Opplæringen bør skje et annet sted enn på legekantoret.

## Vedlegg

### Kommentarer fra Nycomed Pharma AS

#### Intern kvalitetskontroll NycoCard® HbA1c

Ikke alle, men de fleste kommersielle, frysetørkede materialer er uegnet for bruk til affinitetsmetoder pga. matrixeffekt. Det har derfor blitt lagt stor vekt på å finne frem til et kontrollmateriale som fungerer tilfredsstillende i NycoCard® HbA1c. NycoCard® HbA1c Control Abnormal har så langt vist seg å være det beste kontrollmaterialet for NycoCard®HbA1c. Tidligere, når SKUP evalueringen ble utført, ble denne kontrollen kun nivå satt med en nedre grense. På bakgrunn av et omfattende internt dokumentasjonsarbeid har vi fra sommeren 1999 valgt å oppgi en range for denne kontrollen. Rangen er basert på middelverdi  $\pm 3SD$ .

Arbeidet med å finne frem til et bedre kontrollmateriale pågår fortsatt og vi har nå til uttesting en flytende kontroll som har gitt meget lovende resultater i vår forskningsavdeling.

#### Riktighet

NycoCard® HbA1c reagenset er ømfintlig for lys, spesielt sterkt sollys, og skal alltid oppbevares i kjøleskap. Det er ikke nødvendig å equilibrere reagenset til romtemperatur før bruk, det kan benyttes umiddelbart. Dersom reagenset tas ut en stund før bruk må det oppbevares beskyttet mot lys, gjerne i en lukket skuff. Reagens som utsettes for sollys vil over tid deaktivere og prøveresultatet underestimeres. For å beskytte reagenset bedre mot lys har Nycomed sommeren 1999 erstattet de transparente posene reagenset ble oppbevart i med mer lystette aluminiumsposer. Reagenset vil i tillegg om kort tid bli fylt på fargede rør.

#### Brukervennlighet

I evalueringen (side 20) kommenterer både Fürst og legekantorene på reagenssøl fra det prefylte røret. Dette er et problem Nycomed er klar over og som det har vært arbeidet med i en lengre periode. Det er satt ned en prosjektgruppe som i samarbeid med eksterne partnere utvikler et nytt prøvetakingsrør. Det nye prøverøret skal forenkle selve prøvetakingen og samtidig gi rene flater ved prøvetaking og ved uttak for applisering på testbrikken, slik at søl unngås. Utviklingen av dette produktet er i slutfasen (patentsøknad er innlevert). Målet er å ha dette prøverøret inkludert i kittet 3. kvartal 2000 (det tar dessverre lang tid å utvikle og bygge spesialkonstruerte monterings- og fyllelinjer).