مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۲۵/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۸

مقایسه‌ی سه روش مختلف اندازه‌گیری HbA1c با روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

دکتر آذر برادران[۱]، دکتر آزاده کرمی[۲]

مقاله کوتاه

چکیده

مقدمه: شیوع جهانی دیابت شیرین به سرعت در حال افزایش است. اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله، بیشتر HbA1c، اساس ارزیابی بیماران مبتلا به دیابت است. HbA1c برای پایش طولانی مدت کنترل قند خون، تنظیم درمان، ارزیابی کیفیت مراقبت از بیمار و پیش‌گویی خطر ایجاد عوارض به کار می‌رود. از آن جایی که HbA1c روش استاندارد برای کنترل طولانی مدت قند خون در مبتلایان به دیابت است، روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری آن وجود دارد و همه‌ی آزمایشگاه‌ها از روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography یا HPLC) استفاده نمی‌کنند. هدف این مطالعه، مقایسه‌ی سه روش متفاوت با روش HPLC بود تا ببینیم کدام روش، هم‌خوانی و همبستگی قابل قبولی با روش مرجع دارد.

روش‌ها: در این مطالعه، ۵۸ بیمار مبتلا به دیابت مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌ی خون هر بیمار با دستگاه‌های Diazyme (روش آنزیماتیک)، Nycocard (Boronate-affinity binding) و Biosystem (کروماتوگرافی ستونی) برای اندازه‌گیری مقدار HbA1c چک شد و مقدار HbA1c هر دستگاه با جواب Knauer-HPLC مقایسه شد.

یافته‌ها: میانگین فاصله مقادیر در آزمون ANOVA برای Nycocard-HPLC برابر ۱/۸ با انحراف معیار ۱/۰۹، برای Biosystem-HPLC مساوی ۱/۵ با انحراف معیار ۱/۰۸ و برای Diazyme-HPLC برابر ۱/۳ با انحراف معیار ۱/۲ به دست آمد. ضریب همبستگی Pearson بین HPLC و Nycocard مساوی ۰/۷۶، بین Diazyme و HPLC برابر ۰/۷۵ و بین Biosystem و HPLC مساوی ۰/۶۸ به دست آمد. معادله‌ی خط Regression برای هر روش با HPLC نیز به دست آمد.

نتیجه‌گیری: از بین این روش‌ها، Diazyma عملکرد بهتری نسبت به دو روش دیگر داشت و همبستگی بیشتری نشان داد؛ هر چند، جایگزین مطلوبی برای HPLC نیست.

واژگان کلیدی: HbA1c، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، روش آنزیمی، کروماتوگرافی ستونی، دیابت

ارجاع: براداران آذر، کرمی آزاده. **مقایسه‌ی سه روش مختلف اندازه‌گیری HbA1c با روش مرجع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۲۵): ۲۶۶-۲۵۸

مقدمه

اختلالات تنظیم متابولیک همراه دیابت، منجر به تغییرات پاتوفیزیولوژیک ناشی از هیپرگلیسمی در سیستم‌های مختلف بدن می‌شود (۳-۱). از آن جایی که عوارض دیابت شیرین با کنترل قند خون مرتبط است، نرموگلیسمی هدف مطلوب برای بیشتر بیماران

۱- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دستیار، گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر آذر برادران
Email: azarbaradaran@yahoo.com

است (۷-۲). اندازه‌گیری HbA1c استاندارد طلایی برای کنترل طولانی مدت قند خون در افراد مبتلا به دیابت شیرین است (۱۴-۸). روش‌های گوناگونی برای اندازه‌گیری گلیکوهموگلوبین وجود دارد (۱۵) و اختلاف زیادی بین مقادیر گزارش شده از روش‌های مختلف مشاهده می‌شود که مقایسه‌ی نتایج این روش‌ها را مشکل می‌سازد (۱۷-۱۲). به علاوه، روش‌های مختلف تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی نظیر انواع کم خونی، بارداری، اسپلنکتومی، ترانسفوزیون و مصرف دارو (سالسیلات) قرار می‌گیرد (۱۸، ۳، ۱). روش اقتصادی، روشی است که دقیق، سودمند، خودکار و با کاربری آسان باشد (۱۸).

روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC یا High-performance liquid chromatography) به عنوان روش مرجع برای استانداردسازی سایر روش‌های معمول به کار می‌رود و صحت، دقت و پایداری طولانی مدت دارد (۲۰-۱۹)؛ ضمن این که مشخص شده است، کالیبراسیون بر اساس روش HPLC، قابلیت مقایسه‌ی بین روش‌های مختلف را افزایش می‌دهد (۲۱-۱۸).

بسیاری از متخصصین، از عدم هم‌خوانی جواب‌های HbA1c به دست آمده از روش‌های مختلف با وضعیت بیماران و تفاوت قابل توجه برخی از آن‌ها با مقادیر روش مرجع (HPLC) ناراضی هستند (۲۸-۲۲). از طرفی، دستگاه HPLC گران است، کار کردن با آن، مشکل و وقت‌گیر می‌باشد و پرسنل کارآزموده می‌طلبد؛ تهیه‌ی آن برای همه‌ی آزمایشگاه‌ها مقرون به صرفه نیست و از طرفی بیماران مبتلا به دیابت نیاز به چک مداوم HbA1c دارند و بسیاری از آن‌ها قادر به پرداخت هزینه‌ی انجام آزمایش به روش HPLC نیستند.

در این مطالعه، تصمیم گرفتیم تا اندازه‌گیری HbA1c با دستگاه‌های Diazyme (روش آنزیماتیک)، Nycocar (Boronate-affinity binding) و Biosystem (کروماتوگرافی ستونی) را با روش HPLC مقایسه کنیم تا ببینیم، جواب‌های کدام روش هم‌خوانی و همبستگی بیشتری با جواب‌های HPLC دارد، تا به عنوان روش جایگزین در آزمایشگاه‌های بالینی مورد استفاده قرار گیرد.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، تحلیلی از نوع همبستگی و آینده‌نگر بود. نمونه‌گیری به صورت آسان (Simple sampling) بر روی افراد مبتلا به دیابت مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان الزهرای (س) اصفهان در سال ۱۳۸۹، بر اساس یک پرسشنامه و فرم رضایت‌نامه صورت گرفت. معیارهای خروج از مطالعه شامل بارداری، سابقه‌ی اسپلنکتومی (برداشت طحال)، هرگونه کم خونی، انتقال خون طی ۳ ماه گذشته و مصرف داروهای سالسیلات بود. در نهایت، ۵۸ بیمار مبتلا به دیابت (۳۱ نفر زن و ۲۷ نفر مرد) انتخاب شدند.

پس از خون‌گیری وریدی از هر بیمار (ناشتا) به میزان ۸ سی‌سی، خون در لوله‌های حاوی ماده‌ی ضد انعقاد Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) جمع‌آوری شد. ۶ سی‌سی از خون جهت اندازه‌گیری HbA1c با دستگاه‌های Diazyme، Nycocard و Biosystem به بخش فنی آزمایشگاه بیمارستان الزهرا (س) فرستاده شد و مابقی، پس از جمع‌آوری، در یخچال نگهداری شد. سپس، درون ظرف مخصوص

حمل نمونه و Ice-bag، به آزمایشگاهی دیگر جهت اندازه‌گیری با HPLC فرستاده شد. پس از کالیبره کردن هر دستگاه و دادن نمونه‌های کنترل کیفی به آن، در شرایط یکسان، میزان HbA1c خون بیماران توسط هر دستگاه، جداگانه اندازه‌گیری گردید. میزان خطای کلی مجاز ما برای هر روش، ۴ درصد بود که زیر میزان مجاز (۴/۳ درصد) بر اساس نظریه Biological variation می‌باشد (۲۲).

جهت مقایسه‌ی میانگین فاصله‌ی مقادیر به دست آمده از هر سه روش با مقادیر HPLC، از آزمون آنالیز واریانس و برای بررسی همبستگی بین مقادیر به دست آمده از هر سه روش با مقادیر HPLC، از آزمون همبستگی Pearson و آنالیز Regression استفاده شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵/۵ (version 15.5, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.

در ادامه توضیحاتی در مورد دستگاه‌های مورد استفاده در این مطالعه ارایه می‌شود.

Knauer-HPLC: ساخت شرکت Advanced scientific instruments آلمان، دستگاهی است که بر پایه‌ی کروماتوگرافی تمایلی با کارایی بالا ساخته شده است. نمونه‌ی مورد نیاز ۴ میکرولیتر خون کامل است که پس از افزودن محلول لیز، سانتریفیوژ انجام گرفته، مایع رویی برای تزریق به داخل دستگاه به کار می‌رود. انجام هر آزمون، حدود ۳۰ دقیقه طول می‌کشد و پرسنل کارآزموده می‌طلبد.

Nycocard: دستگاهی کوچک با یک کیت و Nycocard reader است و اساس تست، Boronate-affinity binding می‌باشد. نمونه‌ی خون کامل، طبق دستور کیت با معرف‌ها ترکیب و محصول نهایی بر روی یک Test device ریخته می‌شود. سپس محلول شستشو اضافه و در نهایت، با استفاده از Nycocard reader نتیجه خوانده می‌شود. کار کردن با آن راحت است و زمان هر تست، ۱۰ دقیقه می‌باشد.

Biosystem: یک کیت که محتوی ستون‌های کروماتوگرافی به همراه معرف‌ها می‌باشد و در دمای اتاق باید استفاده شود، اساس تست کروماتوگرافی تعویض یونی- اسپکتروفتومتری است. طبق دستور کیت، معرف‌ها به همراه یک ستون برای هر نمونه به کار برده می‌شود و در انتها، مایع شسته شده از ستون که جزء HbA1c است، جمع‌آوری می‌گردد. در لوله‌ی آزمایش دیگری، همولیزات و یک معرف را ترکیب می‌شود تا هموگلوبین تام به دست آید. سپس، جذب نوری هر دو با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. این روش، بسیار وقت گیر است (حدود یک ساعت)، شرایط دمایی باید رعایت شود و دقت فراوان در انجام آن لازم است.

Diazyme: کیت حاوی معرف‌ها و بافرها بوده، برای استفاده در اتوآنالیزرها ساخته شده است و اساس تست، واکنش‌های آنزیمی می‌باشد. خون کامل طبق دستور کیت، با محلول لیز مخلوط شده، پس از مدت کوتاه در اتوآنالیزر قرار می‌گیرد و جذب نوری نمونه، با اتوآنالیزر در طول موج ۴۳۰ نانومتر محاسبه می‌شود. نتیجه به صورت مستقیم و با درصد بیان می‌گردد. این تست بسیار راحت و کار کردن با آن آسان است و زمان انجام هر تست، ۱۵ دقیقه می‌باشد.

لازم به ذکر است که هر ۴ روش مورد استفاده در این تحقیق، قابل رد یابی (Traceable) به

استانداردهای DCCT/NGSP می‌باشد.

یافته‌ها

مقادیر HbA1c به دست آمده از هر ۴ روش، شامل حداقل، حداکثر، میانگین و انحراف معیار، در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول ۱. مقادیر HbA1c به دست آمده از روش‌های مختلف

روش اندازه‌گیری	مقدار HbA1c	
	میانگین ± انحراف معیار	حداکثر - حداقل
HPLC	۵/۸ ± ۱/۴	۳/۴-۱۰/۸
Nycocard	۷/۶ ± ۱/۸	۵/۳-۱۴/۴
Biosystem	۷/۲ ± ۱/۸	۵/۰۱-۱۴/۳
Diazyme	۷/۰ ± ۲/۱	۴/۹-۱۶/۲

HPLC: High-performance liquid chromatography

از بین روش‌های انجام شده میانگین مقادیر حاصل از Diazyme به میانگین HPLC نزدیک‌تر بود. با محاسبه‌ی قدر مطلق اختلاف مقادیر موازی حاصل از هر روش با مقادیر حاصل از روش HPLC، و میانگین آن را محاسبه شد که برای HPLC و Nycocard برابر ۱/۱ ± ۱/۸، برای HPLC و Biosystem معادل ۱/۱ ± ۱/۵ و برای HPLC و Diazyme مساوی ۱/۲ ± ۱/۳ بود. آزمون آنالیز واریانس با مشاهدات تکراری نشان داد که سه میانگین با هم اختلاف آماری معنی‌دار دارند ($P < ۰/۰۰۱$). کم‌ترین میانگین مربوط به HPLC و Diazyme بود؛ به این معنی که، مقادیر موازی حاصل از Diazyme نسبت به دو روش دیگر به HPLC نزدیک‌تر بوده است.

آزمون همبستگی Pearson نشان داد که بین مقادیر HbA1c به دست آمده از هر روش، با مقادیر حاصل از روش HPLC رابطه‌ی خطی معنی‌داری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$). پارامترهای Regression خطی به دست آمده از هر روش نسبت به HPLC نیز همراه با مقدار r محاسبه شده در جدول شماره‌ی ۲ آورده شده است؛ ملاحظه می‌شود که ضریب همبستگی Pearson (r) بین HPLC و Nycocard بیش از دو روش دیگر به عدد ۱ نزدیک می‌باشد. این امر، نشان از همبستگی قوی‌تر بین این دو روش نسبت به روش‌های دیگر است. نمودار Regression خطی نیز در شکل شماره‌ی ۱ به تصویر کشیده شده است.

بحث

طبق آمار، جمعیت مبتلا به دیابت روز به روز در حال افزایش است. عوارض میکروواسکولر دیابت شامل نفروپاتی، نوروپاتی و رتینوپاتی، بار عظیمی را بر فرد و سیستم بهداشتی تحمیل می‌کند (۲۵-۲۳). ایجاد این عوارض با قند خون بالای طولانی مدت در بیماران مرتبط است و HbA1c نمایانگر تاریخچه‌ی قند خون طی ۳-۲ ماه گذشته می‌باشد. اندازه‌گیری Hb گلیکولیزه روش استاندارد برای بررسی طولانی مدت کنترل طبیعی در بیماران است (۲۸-۲۵، ۱۲، ۲) و اندازه‌گیری مقادیر حقیقی و درست آن با روش‌های آزمایشگاهی، جهت پی‌گیری و درمان بیماران بسیار حایز اهمیت می‌باشد.

برای مقایسه‌ی مقادیر HbA1c، باید نتایج روش‌های مختلف قابل مقایسه باشد (۱۲، ۲). از آن جایی که استفاده از روش مرجع (HPLC) برای همه‌ی آزمایشگاه‌های بالینی مقرون به صرفه نیست، لزوم یافتن روش‌های جایگزین که جواب‌هایشان تا حد

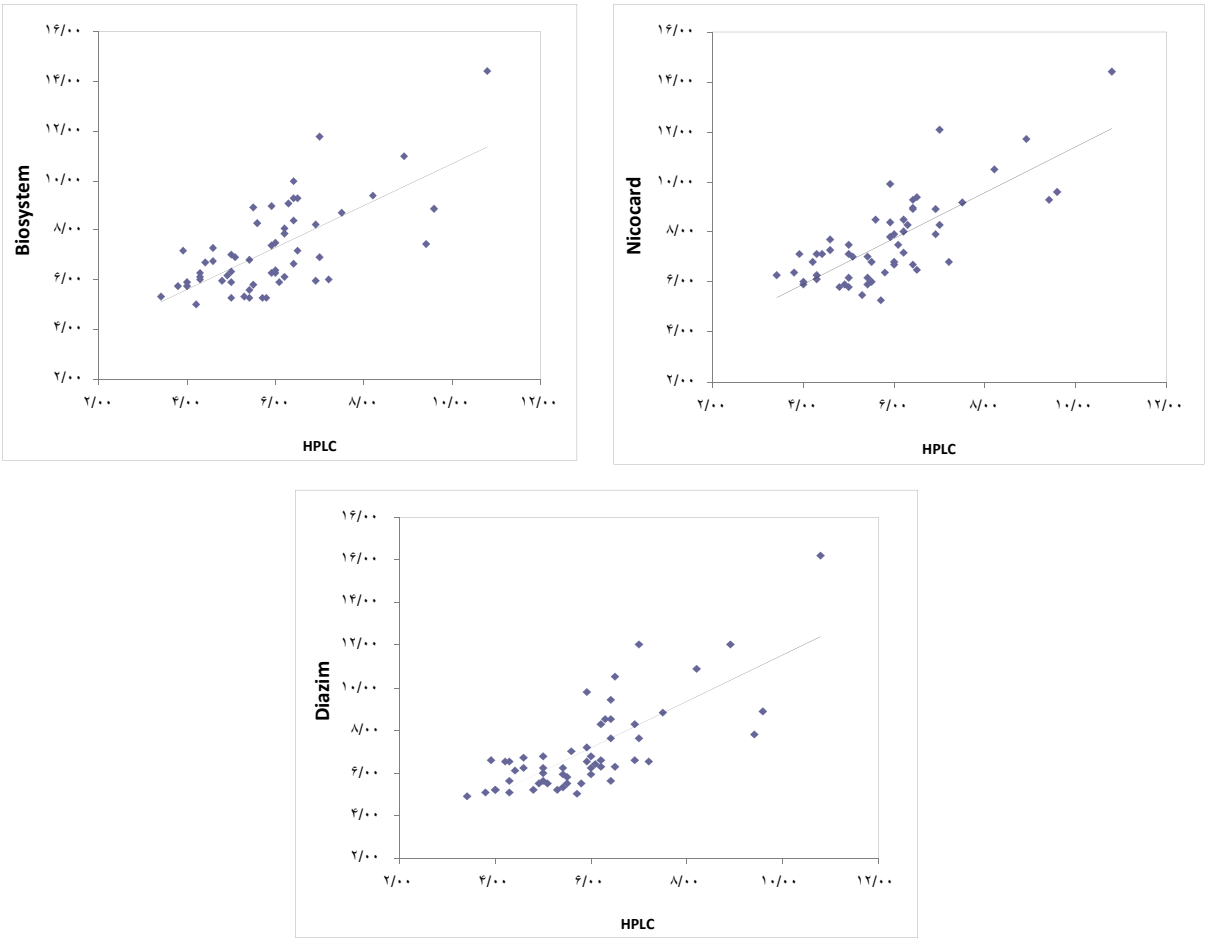
امکان به جواب‌های HPLC نزدیک بوده، همبستگی قوی با آن داشته باشد، مشخص می‌شود. مطالعات متعددی نیز در این زمینه صورت گرفته است.

در مطالعه‌ی Halwachs-Baumann و همکاران، مقایسه‌ای بین روش‌های Roche immunoassay، Variant HPLC و Hi-auto A1C analyze system با روش مرجع Diamat HPLC صورت گرفت که روش Roche immunoassay نزدیک‌ترین میانگین رابه میانگین روش مرجع داشت. ضریب همبستگی هر کدام از روش‌ها با روش مرجع، به ترتیب ۰/۹۷۰، ۰/۹۷۷ و ۰/۹۷۲ بود که هر سه، هم‌خوانی خوبی با روش مرجع نشان داد (۲۹).

جدول ۲. پارامترهای Regression خطی برای y = ax + b و ضریب همبستگی Pearson برای مقایسه‌ی روش‌های اندازه‌گیری HbA1c

y	x	A (شیب خط)	B (عرض از مبدأ)	ضریب همبستگی (r)
Nycocard	HPLC	۰/۹۰۸	۲/۳۱۶	۰/۷۶
Biosystem	HPLC	۰/۸۳۶	۲/۲۹۵	۰/۶۸
Diazyme	HPLC	۱/۰۸۱	۰/۶۸۵	۰/۷۵

HPLC: High-performance liquid chromatography



شکل ۱. نمودار مقایسه‌ی نتایج اندازه‌گیری HbA1c، که توسط سه روش جدید (محور y) در مقابل Knauer-HPLC (محور x) به دست آمده است.

HPLC: High-performance liquid chromatography

در بررسی Turpeinen و همکاران نیز سه دستگاه با یکدیگر مقایسه شد. ضریب همبستگی Pearson بین PolyCAT A (یک HPLC بر اساس کروماتوگرافی ستونی) و Diamat (یک اتوآنالیزر بر اساس کروماتوگرافی تعویض یونی) برابر با ۰/۹۰ ± ۰/۳۰ بود؛ ضریب همبستگی بین PolyCAT A, IMX (بر اساس Boronate-affinity binding) نیز مساوی ۰/۸۵ ± ۰/۰۴ به دست آمد. در این مطالعه، محدودیت‌های Diamat به عنوان یک روش مرجع آشکار شد و محققان متوجه شدند که در شیفت ازیک روش به روش دیگر، احتمال ایجاد مشکلات جدی در پی‌گیری بالینی وجود دارد (۳۰).

Hawkins نیز ۴ روش Point of care را با روش Roche tinaqant مقایسه کرد و ضریب همبستگی Pearson را برای هر ۴ روش Nycocard، DCA 2000، D55 و Diastat بیش از ۰/۹ به دست آورد. از بین این روش‌ها، Diastat و DCA2000 بهترین عملکرد و هم‌خوانی را با روش مرجع نشان دادند و او نتیجه گرفت که این دو روش، جایگزین مناسبی برای یکدیگر و همچنین برای Roche می‌باشند (۳۱). در هیچ کدام از مطالعات بررسی شده، میانگین فاصله‌ی مقادیر هر روش با روش مرجع ارزیابی نشده است (۴۰-۲۹).

در مطالعه‌ی ما، ضریب همبستگی روش‌های Nycocard و HPLC برابر ۰/۷۶ و ضریب همبستگی روش‌های Diazyme و HPLC مساوی ۰/۷۵ برآورد شد ولی در کل، Diazyme عملکرد بهتری نسبت به Nycocard و Biosystem داشت؛ چرا که، میانگین مقادیر آن به میانگین مقادیر HPLC نزدیک‌تر بود و همچنین، نسبت به دو روش دیگر، کم‌ترین میانگین فاصله‌ی مقادیر را با روش HPLC داشت. با این حال، این روش نیز به حد کافی، مطلوب نیست و نمی‌تواند جایگزین روش HPLC باشد؛ چرا که، ضریب همبستگی Pearson این روش با HPLC (۰/۷۵) فاصله‌ی زیادی تا عدد یک دارد و همبستگی آن، عالی نیست.

برای هر سه روش، معادله‌ی Regression خطی به دست آمد که می‌تواند، برای تبدیل مقادیر به دست آمده از هر روش به مقادیر HPLC به کار رود. توصیه می‌شود، مطالعات بیشتری با حجم نمونه‌ی بیشتر و بر روی روش‌ها و دستگاه‌های رایج دیگر در آزمایشگاه بالینی صورت گیرد تا در رفع معضلات موجود در پی‌گیری و درمان بیماران مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح پژوهشی و به صورت پایان‌نامه‌ی دستیاری، در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شده است.

References

1. Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. J Renal Inj Prev 2013; 2(2): 59-62.
2. Syed IA. Glycated haemoglobin; past, present, and future are we ready for the change. J Pak Med Assoc 2011; 61(4): 383-8.
3. Baradaran A. Lipoprotein(a), type 2 diabetes and nephropathy; the mystery continues. J Nephropathol 2012; 1(3): 126-9.
4. Nazar CMJ. Mechanism of hypertension in diabetic nephropathy. J Nephropharmacol 2014; 3(2): 49-55.

5. Beladi-Mousavi SS, Bashardoust B, Nasri H, Ahmadi A, Tolou-Ghamari Z, Hajian S, et al. The theme of the world diabetes day 2014; healthy living and diabetes; a nephrology view point. J Nephropharmacol 2014; 3(2): 43-5.
6. Assadi F. The epidemic of pediatric chronic kidney disease: the danger of skepticism. J Nephropathol 2012; 1(2): 61-4.
7. Rafieian-Kopaei M, Baradaran A. On the occasion of world diabetes day 2105; act today to change tomorrow. J Renal Endocrinol 2015; 1: e02.
8. Ardalan MR, Sanadgol H, Nasri H, Baradaran A, Tamadon MR, Rafieian-Kopaei R. Vitamin D therapy in diabetic kidney disease; current knowledge on a public health problem. J Parathy Dis 2014; 2(1):15-7.
9. Nasri H. Comment on: Serum cholesterol and LDL-C in association with level of diastolic blood pressure in type 2 diabetic patients. J Renal Inj Prev 2012; 1(1): 13-4.
10. Hajivandi A, Amiri M. World Kidney Day 2014: Kidney disease and elderly. J Parathyr Dis 2014; 2(1):3-4.
11. Nasri H, Yazdani M. The relationship between serum LDL-cholesterol, HDL-cholesterol and systolic blood pressure in patients with type 2 diabetes. Kardiol Pol 2006; 64(12): 1364-8.
12. Bryskiewicz ME, Majkowska L. Glycated hemoglobin (HbA1c) as a standard diagnostic criterium for diabetes? Pol Merkur Lekarski 2011; 30(176): 150-4. [In Polish].
13. Nasri H. Association of serum lipoprotein (a) with hypertension in diabetic patients. Saudi J Kidney Dis Transpl 2008; 19(3): 420-7.
14. Bryskiewicz ME, Majkowska L. Aspects of the standardization of glycated hemoglobin (HbA1c) measurement. Pol Merkur Lekarski 2011; 30(176): 155-9. [In Polish].
15. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. Clin Chem Lab Med 2002; 40(1): 78-89.
16. Gaborit B, Nicolay A, Valero R, Begu A, Badens C, Bellanne-Chantelot C, et al. Comparison of performances of various HbA1c methods in Haemoglobin Camperdown variant detection: consequences in diabetes management. Clin Chim Acta 2009; 403(1-2): 262-3.
17. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, Fujimoto EK, Mallia AK, Smith PK, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. Clin Chem 1982; 28(10): 2088-94.
18. John WG. Glycated haemoglobin analyses--assessment of within- and between-laboratory performance in a large UK region. Ann Clin Biochem 1987; 24 (Pt 5): 453-60.
19. Bodor GS, Little RR, Garrett N, Brown W, Goldstein DE, Nahm MH. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. Clin Chem 1992; 38(12): 2414-8.
20. Reinauer H. Biochemistry of protein glycation in diabetes mellitus. Klin Lab 1993; 39: 984-7.
21. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, Little R, England J, Peterson CM. What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. Clin Chem 1998; 44(9): 1951-8.
22. Roberts NB, Amara AB, Morris M, Green BN. Long-term evaluation of electrospray ionization mass spectrometric analysis of glycated hemoglobin. Clin Chem 2001; 47(2): 316-21.
23. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. Clin Chem 1994; 40(1): 138-44.
24. Westgard J. Desirable biological variation database specifications [Online]. [cited 2014]; Available from: URL:http://www.westgard.com/biodatabase1.htm.
25. Nasri H, Baradaran A. Association of serum lipoprotein (a) with ultrasonographically determined early atherosclerotic changes in the carotid and femoral arteries in kidney transplanted patients. Transplant Proc 2004; 36(9): 2683-6.
26. Nasri H, Baradaran A. Correlation of serum magnesium with dyslipidemia in maintenance hemodialysis patients. Acta Medica (Hradec Kralove) 2004; 47(4): 263-5.
27. Nasri H, Shirzad H. Toxicity and safety of medicinal plants. J HerbMed Plarmacol 2013; 2(2): 21-2.
28. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Protective effects of herbal antioxidants on diabetic kidney disease. J Res Med Sci 2014; 19(1): 82-3.
29. Halwachs-Baumann G, Katzensteiner S, Schnedl W, Purstner P, Pieber T, Wilders-Truschnig M. Comparative evaluation of three assay systems for automated determination of hemoglobin A1c. Clin Chem 1997; 43(3): 511-7.
30. Turpeinen U, Karjalainen U, Stenman UH. Three assays for glycohemoglobin compared. Clin Chem 1995; 41(2): 191-5.
31. Hawkins RC. Comparison of four point-of-care

HbA1c analytical systems against central laboratory analysis. Singapore Med J 2003; 44(1): 8-11.
32. Goldberg RB, Mather K. Targeting the consequences of the metabolic syndrome in the Diabetes Prevention Program. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012; 32(9): 2077-90.
33. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. Int J Prev Med 2014; 5(8): 927-46.
34. Nasri H, Ardalan MR, Rafieian-Kopaei M. On the occasion of world hypertension day 2014: A nephrology point of view. J Res Med Sci 2014; 19(9): 911-2.
35. Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Metformin: Current knowledge. J Res Med Sci 2014; 19(7): 658-64.
36. Hoelzel W, Miedema K. Development of a reference system for the international standardization of HbA1c/glycohemoglobin determinations. J Int Fed Clin Chem 1996; 8(2): 62-7.
37. Nasri H, Kheiri S. Effects of diabetes mellitus, age, and duration of dialysis on parathormone in chronic hemodialysis patients. Saudi J Kidney Dis Transpl 2008; 19(4): 608-13.
38. Nasri H, Baradaran HR. Lipids in association with serum magnesium in diabetes mellitus patients. Bratisl Lek Listy 2008; 109(7): 302-6.
39. Baradaran A, Behradmanesh S, Nasri H. Association of body mass index and serum vitamin D level in healthy Iranian adolescents. Endokrynol Pol 2012; 63(1): 29-33.
40. Nasri H. World kidney day 2013: acute kidney injury; a public health aware. Iran J Public Health 2013; 42(3): 338-40.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 12.01.2015
Vol. 33, No. 325, 1st Week, May 2015
Accepted: 19.03.2015

Comparing Three Methods of HbA1c Measurement with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Azar Baradaran MD[1], Azadeh Karami MD[2]

Short Communication

Abstract

Background: The global prevalence of diabetes mellitus is increasing rapidly. Measurement of glycated hemoglobin, predominantly HbA1c, is fundamental to the management of patients with diabetes. HbA1c is used to monitor long-term glycemic control, adjust therapy, assess the quality of diabetes care and predict the risk for the development of complications. While HbA1c is the standard indicator for long-term glycemic control in diabetes, there are different methods for measurement of HbA1c and all laboratories do not use the reference method of high-performance liquid chromatography (HPLC). This study aimed to compare three different methods of measuring HbA1c with HPLC to find out which method have acceptable concordance and correlation with the reference method.

Methods: 58 patients with diabetes mellitus were assessed. Blood sample of each patient was checked via Diazyme (enzymatic assay), Nycocard (boronate-affinity binding) and Biosystem (microcalumn chromatography). The values of HbA1c in each method were compared with the Knauer-HPLC results.

Findings: The mean (SD) of differential values between each method and HPLC in ANOVA test was 1.8 (1.1) for Nycocard-HPLC, 1.5 (1.1) for Biosystem-HPLC, and 1.3 (1.2) for Diazyme-HPLC. Pearson's correlation coefficient was 0.76 between Nycocard and HPLC, 0.75 between Diazyme and HPLC and 0.68 between Biosystem and HPLC. With HPLC linear regression parameters were also determined for each method.

Conclusion: Diazyme had a better performance and showed a greater concordance with HPLC among others; although it was not an ideal alternative for HPLC.

Keywords: HbA1c, High-performance liquid chromatography (HPLC), Enzymatic assay, Column chromatograghy, Diabetes mellitus

Citation: Baradaran A, Karami A. **Comparing Three Methods of HbA1c Measurement with High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).** J Isfahan Med Sch 2015; 33(325): 258-66

1- Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Resident, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Azar Baradaran MD, Email: azarbaradaran@yahoo.com