



Høgskulen på Vestlandet

BIO160 Bacheloroppgave og Plakat Gruppe B - Bioingeniør

BIO160

Predefinert informasjon

Startdato:	24-03-2021 12:43	Termin:	2021 VÅR
Sluttdato:	26-03-2021 12:00	Vurderingsform:	Bestått/ikke bestått
Eksamensform:	Bacheloroppgave (skriftlig i gruppe)		
Flowkode:	203 BIO160 1 O 2021 VÅR		
Intern sensor:	Irene Nyggård		
Intern sensor:	Astrid-Mette Husøy		

Deltaker

Naun:	Oliwia Slusarczyk
Kandidatnr.:	239
HVL-id:	580695@hvl.no

Informasjon fra deltaker

Egenerklæring *: Ja
**Inneholder besvarelsen
konfidensielt
materiale?:** Nei
**Jeg bekrefter at jeg har
registrert
oppgavetittelen på
norsk og engelsk i
StudentWeb og vet at
denne vil stå på
vitnemålet mitt *:**

Gruppe

Gruppenavn: B2
Gruppenummer: 5
**Andre medlemmer i
gruppen:** Madeleine Ranke, Marthe Østebø

Jeg godkjenner avtalen om publisering av bacheloroppgaven min *

Ja

Er bacheloroppgaven skrevet som del av et større forskningsprosjekt ved HVL? *

Nei

Er bacheloroppgaven skrevet ved bedrift/virksomhet i næringsliv eller offentlig sektor? *

Ja, Seksjon for porfyrianalyser, MBF, HUS

BACHELOROPPGAVE

Holdbarhet av HbA1c i romtemperatur ved bruk av
ionebytterkromatografi

HbA1c stability in room temperature using ion-
exchange chromatography

Madeleine Ranke, Oliwia Slusarczyk og Marthe Østebø

Bioingeniør – bachelor
Institutt for sikkerheit, kjemi- og bioingeniørfag

Veiledere:

Irene Nygård, Astrid-Mette Husøy, Alexander Blø og Berit Brendehaug

26.03.2021

Sammendrag

Formål: Undersøke om holdbarheten til HbA1c i romtemperatur kan økes fra fire dager til fem eller seks dager når prøvene analyseres i EDTA-blod ved ionebytterkromatografi (Bio-Rad D-100™).

Materiale og metode: 90 prøver med ulike HbA1c nivå ble oppbevart i romtemperatur (dag 0, 4, 5 og 6) før de ble lagret ved $< -80^{\circ}\text{C}$. Prøvene ble tint og analysert samtidig på Bio-Rad D-100™ (Bio-Rad). Holdbarheten (Batch-metoden) ble vurdert i forhold til biologisk variasjon, hvor kravene til tillatt bias og tillatt totalfeil var henholdsvis 2,45 % og 7,4 %. Statistisk signifikans ble vurdert vha. Bland-Altman plott, regresjonsanalyse og paret t-test. Kromatogrammene ble vurdert for å sikre at kvaliteten til enkeltprøver var god nok.

Resultat: Batch-metoden viste at gjennomsnittsverdiene og konfidensintervallene for de ulike oppbevaringstidene ligger innenfor tillatt bias (2,45%) og alle enkeltmålingene ligger innenfor tillatt totalfeil (7,4%). Dette indikerer at HbA1c er stabilt i opptil seks dager i romtemperatur når det analyseres ved ionebytterkromatografi. Bland-Altman plottene viste negativ bias for dag 5 og 6 for alle nivå av HbA1c. Regresjonsanalyse og paret t-test påviste statistisk signifikant forskjell mellom de ulike oppbevaringstidene.

Konklusjon: Batch-metoden setter grenser til tillatt bias og tillatt totalfeil ut ifra biologisk variasjon, og statistiske beregninger har grenser satt ut ifra datamaterialet og gjeldende statistiske regler. HbA1c verdiene synker ved oppbevaring i romtemperatur. Likevel indikerer både Batch metoden og statistiske beregninger at holdbarheten til HbA1c i romtemperatur kan økes fra 4 dager opp til 6 dager når HbA1c analyseres ved ionebytterkromatografi (Bio-Rad D-100).

Nøkkelord: HbA1c, holdbarhet i romtemperatur, ionebytterkromatografi, diabetes, EDTA-blod

Abstract

Purpose: To examine whether the stability of HbA1c in room temperature can be increased from four days to five or six days when the samples are analyzed in EDTA blood using ion-exchange chromatography (Bio-Rad D100™).

Material and method: 90 samples with different HbA1c levels were stored at room temperature (days 0, 4, 5 and 6) before being stored at $< -80^{\circ}\text{C}$. The samples were thawed and analyzed on Bio-Rad D-100™ (Bio-Rad) on the same day. The durability (Batch method) was assessed in relation to biological variation, where the requirements for permissible bias and permissible total error were 2,45 % and 7,4 %, respectively. Statistical significance was assessed using Bland-Altman plot, regression analysis and paired t-test. The chromatograms were evaluated to ensure that the quality of the individual samples was good enough.

Result: The Batch method showed that the average values and confidence intervals for the different storage times are within the permissible bias (2,45 %) and all the individual measurements are within the permissible total error (7,4 %). This indicates that HbA1c is stable for up to six days at room temperature when analyzed by ion-exchange chromatography. The Bland-Altman plots showed negative bias for days 5 and 6 for all levels of HbA1c. Regression analysis and paired t-test demonstrated statistically significant difference between the different storage times.

Conclusion: The Batch method sets limits for permissible bias and permissible total errors based on biological variation, and statistical calculations have limits based on the data material and current statistical rules. HbA1c values decrease when stored at room temperature. Nevertheless, both the Batch method and statistical calculations indicate that the stability of HbA1c at room temperature can be increased from 4 days up to 6 days when analyzed using ion-exchange chromatography (Bio-Rad D-100).

Keywords: HbA1c, stability in room temperature, ion-exchange chromatography, diabetes, EDTA blood

Forord

Bachelorprosjektet er utført i samarbeid med laboratoriet for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF) på Haukeland Universitetssjukehus og Høgskulen på Vestlandet. Analysearbeidet ble utført i samarbeid med Seksjon for porfyrianalyser ved MBF. Arbeidet med prosjektet har vært krevende, men også veldig lærerikt og givende.

Vi vil rette en stor takk til våre eksterne veiledere, Spesialbioingeniør/Førstemanuensis Astrid-Mette Husøy, Seksjonsleder/Bioingeniør Alexander og Nestleder/Fagbioingeniør Berit Brendehaug Blø for deres engasjement og hjelp med både innsamling og analysering av prøvemateriale. En stor takk må også rettes til vår interne veileder Høgskolelektor/Bioingeniør Irene Nygård som har bidratt med god veiledning, nyttige innspill, refleksjon og engasjement. Vi vil også takke Høgskolelektor/Bioingeniør Turid Aarhus Braseth for gode samtaler gjennom prosessveiledninger. Takk til alle som stilte som deltakere i dette prosjektet.

Sist, men ikke minst, en stor takk til familie, venner, partnere og hverandre som har holdt ut i denne perioden. Det er ikke alltid like lett å skrive en bacheloroppgave under en pandemi.

Bergen 26.03.21

Madeleine Ranke

Madeleine Ranke

Oliwia Slusarczyk

Oliwia Slusarczyk

Marthe Østebø

Marthe Østebø

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	6
2	Teori	7
2.1	<i>Diabetes mellitus</i>	7
2.1.1	Diagnostiske kriterier for diabetes	8
2.2	<i>HbA1c</i>	9
2.2.1	Analysemetoder av HbA1c	10
2.2.2	Preanalytiske forhold ved måling av HbA1c	10
2.2.3	Holdbarhet og tidligere holdbarhetsstudier	11
2.2.4	Interferens	13
2.2.5	Standardisering av HbA1c analysen	14
2.2.6	Referanseintervall	14
2.2.7	Analytisk og biologisk variasjon	15
2.3	<i>Utforming og kvalitetskrav for holdbarhetsstudier</i>	17
2.3.1	Batch-metoden	17
3	Material og metode	19
3.1	<i>Instrument og reagenser</i>	19
3.2	<i>Annet utstyr</i>	20
3.3	<i>Utvalg</i>	20
3.4	<i>Prøvehåndtering</i>	21
3.5	<i>Instrument og analyseprinsipp</i>	21
3.5.1	HPLC	21
3.5.2	D100™-system	22
3.5.3	Analyseprinsipp D-100™	23
3.6	<i>Statistiske beregninger</i>	25
3.7	<i>Batchmetoden – kvalitetskrav</i>	25
3.8	<i>Parametriske statistiske metoder</i>	27
3.8.1	Normalfordeling	27
3.8.2	Bland-Altman plott	27
3.8.3	Regresjonsanalyse	27
3.8.4	Paret t-test	28
3.9	<i>Etiske betraktninger</i>	28
4	Resultat	29
4.1	<i>Kvalitetskontroller og kromatogram</i>	30
4.2	<i>Presentasjon av rådata</i>	31
4.3	<i>Holdbarhet av HbA1c ved Batchmetoden</i>	33
4.4	<i>Statistiske vurderinger</i>	37
4.4.1	Bland Altman plott	38
4.4.2	Regresjonsanalyse	40
4.4.3	Paret t-test	42

5	Diskusjon.....	43
5.1	<i>Vurdering av holdbarheten – Batch metoden</i>	<i>44</i>
5.2	<i>Statistiske beregninger for vurdering av holdbarhet</i>	<i>45</i>
5.3	<i>Begrensninger ved studien</i>	<i>47</i>
6	Konklusjon	48
7	Definisjoner og forkortelser	49
8	Referanser.....	50
9	Vedlegg	53

1 Innledning

Diabetes mellitus (DM) er en gruppe hyppig forekommende sykdommer i den norske befolkningen, og karakteriseres av høy blodglukose over tid. DM kan gi en rekke senkomplikasjoner som svekker livskvalitet til pasienten, blant annet hjerte-karsykdommer og nyresykdom (Helsedirektoratet, 2020).

DM diagnostiseres og overvåkes blant annet ved å måle glykert hemoglobin, HbA1c. Verdien av HbA1c i EDTA-blod angir forholdet mellom konsentrasjonen av glykert hemoglobin og konsentrasjonen av hemoglobin i prøven (Vikøren, Berg & Berg, 2014). HbA1c er et uttrykk for gjennomsnitt glukosenivå i plasma over en periode på 8-12 uker, basert på erytrocyttens levetid på 120 dager. Mengden HbA1c vil også kunne bli påvirket ved endret omsetning av erytrocytter (Nasjonal selskap for medisinsk biokjemi, 2020).

Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF) ved Haukeland Universitetssjukehus (HUS) bruker i dag instrumentene Bio-Rad D-100 til analyse av HbA1c. Før instrumentene ble tatt i bruk i rutinen ble det gjort en metodevalidering hvor definerte kvalitetskrav måtte oppfylles for å sikre god analysekvalitet. Et av kvalitetsmålene var å utvide holdbarheten fra fire dager i romtemperatur, som var etablert på den forrige metoden (Variant II Turbo), til fem dager. Et enkelt holdbarhetsforsøk i valideringsperioden ga ikke gode nok data til å kunne utvide holdbarheten. Ved oppbevaring utover fire dager må prøvene fryses ned på -80 °C eller kaldere, prøvene er da holdbare i inntil 2 år.

Det har vært ønskelig å gjennomføre et nytt og mer omfattende holdbarhetsforsøk da dårlig definerte holdbarhetsbetingelser kan føre til store feil i analyseresultatene, noe som kan være uheldig for pasientbehandlingen. Holdbarhetsstudier gjennomføres derfor blant annet for å optimalisere prøvehåndtering, og av økonomiske hensyn (Noklus, 2015).

Målsetningen med dette prosjektet er derfor å undersøke om holdbarheten til HbA1c i EDTA-blod kan utvides. Holdbarheten kartlegges ved å oppbevare prøvene i romtemperatur i fire, fem og seks dager for så å fryses ved -80 °C. Dersom prøvene kan oppbevares i fem eller seks dager ved romtemperatur, vil dette friggi ressurser og kan forenkle prøvehåndtering ved lengre perioder uten ordinær drift som langhelger og helligdager. Holdbarheten til HbA1c vil bli undersøkt i materiale fra friske personer og pasienter med kjent diabetes. Studien vil bli utført i henhold til Noklus sine standarder for holdbarhetsstudier, Batch-metoden.

Problemstillingen for denne oppgaven er følgende:

- *Kan holdbarheten til HbA1c i romtemperatur utvides fra 4 dager til 5 eller 6 dager?*

2 Teori

2.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) karakteriseres av hyperglykemi som følge av manglende insulinproduksjon og/eller manglende insulineffekt. Den kroniske hyperglykemitilstanden som finner sted hos pasienter med diabetes kan gi senskader som langvarig skade, dysfunksjon eller svikt i ulike organer, spesielt øyne, nyrer, nerver, hjerte og blodårer (American Diabetes Association, 2014, 2021).

Verdens helseorganisasjon (WHO) reviderte i 2019 klassifikasjon av diabetes og nedsatt glukosetoleranse. Diabetes klassifiseres etter årsaken til sykdommen, og graden av glukoseintoleranse, som strekker seg fra normal glukoseregulering til diabetes hvor pasienten trenger insulintilførsel for å overleve (Hagve & Berg, 2019, s. 357; World Health Organization, 2019). De to hovedtypene av DM er diabetes type 1 (DM1) og diabetes type 2 (DM2).

DM1 skyldes utilstrekkelig produksjon av insulin i bukspyttkjertelen, og rundt 5-10% av alle diabetikere har DM1. Årsaken til insulinmangel er en autoimmun tilstand hvor insulinproduserende celler ødelegges av kroppens eget immunsystem. DM1 karakteriseres i tillegg med tilstedeværelse av såkalte islet autoantistoffer og autoantistoffer. Pasienter med DM1 er avhengig av å få tilført insulin for å overleve (American Diabetes Association, 2021; Hagve & Berg, 2019, s. 358).

DM2 oppstår hyppigere enn type 1, og det anslås at ca. 90-95% av alle diabetikere har type 2. Sykdommen er mest vanlig hos middelaldrende og eldre personer, og kjennetegnes av insulinresistens eller relativ mangel av insulin (American Diabetes Association, 2021; Hagve & Berg, 2019, s. 358-359). Behandling av DM2 baserer seg på livsstilsendringer, kosthold og medisiner (Bertelsen, 2011, s. 186).

- Plasma-glukose $\geq 11,1$ mmol/L to timer etter en oral glukosetoleranse test.

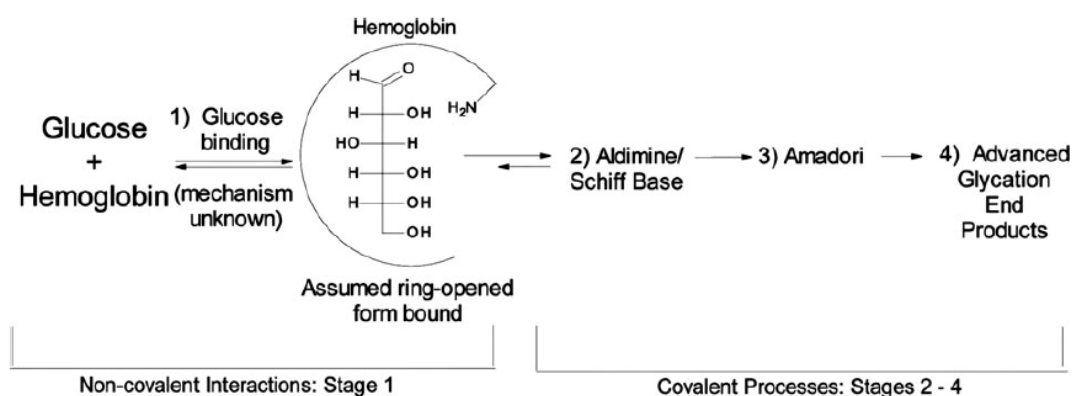
Helsedirektoratet anbefaler i dag at HbA1c brukes som primært diagnostikum for diabetes (Helsedirektoratet, 2020).

Hos enkelte pasienter kan DM1 utvikle seg så raskt at HbA1c ikke har økt svarende til den akutte økningen i plasma-glukose. I slike tilfeller stilles diagnosen diabetes basert på symptomer på hyperglykemi, to uavhengige blodprøver som viser plasma-glukose over 7,0mmol/L, og en plasma-glukose på 11,1 mmol/L etter oral glukosetoleransetest. HbA1c kan ikke benyttes til å diagnostisere svangerskapsdiabetes (Helsedirektoratet, 2020).

2.2 HbA1c

Glykert hemoglobin, HbA1c, kalles også for langtidsglukose og benyttes til både diagnostikk og oppfølging av diabetes (Vikøren et al., 2014; Witczak & Haugen, 2014). Når glukose bindes til aminosyren valin i hemoglobinets β -kjede kalles dette HbA1c. Reaksjonen som fører til at glukose «hektes på» hemoglobinmolekylet kalles for glykering og foregår i hele erythrocyttens levetid. Glykeringen er ikke-enzymatisk, irreversibel og konsentrasjonsavhengig. Graden av glykering øker med økende glukosemengde i blodet (Nasjonal selskap for medisinsk biokjemi, 2020; Vikøren et al., 2014; Witczak & Haugen, 2014).

Glykeringen består av fire trinn og er illustrert i figuren under. Det første trinnet i prosessen er dannelse av en reversibel, ikke-kovalent binding mellom glukose og hemoglobin. Resultatet av hele prosessen er dannelse av HbA1c (Clark, Santin, Bryant, Holman & Rodnick, 2013).



Figur 1. Glykering av HbA1c vist i 4 stegs, ikke-enzymatisk reaksjon. (Clark et al., 2013).

2.2.1 Analysemetoder av HbA1c

Analysemetoder for bestemmelse av HbA1c er basert på separasjon av hemoglobinfraksjoner og kjemiske reaksjoner. Separasjonsmetodene baserer seg på at glykert hemoglobin og ikke-glykert hemoglobin (Hb) har ulike kjemiske egenskaper, noe som gjør det mulig å separere dem fra hverandre og kvantifisere HbA1c. Dette separasjonsprinsippet benyttes blant annet i ionebytterkromatografi, kapillærelektroforese og affinitetskromatografi (Weykamp, 2013).

Kjemiske metoder for analyse av HbA1c måler HbA1c konsentrasjonen basert på en spesifikk kjemisk reaksjon med valin i hemoglobinetts β -kjede. Total hemoglobinkonsentrasjon blir målt parallelt. For å beregne HbA1c konsentrasjonen trengs det altså to uavhengige tester, Hb måling og HbA1c. Dette konseptet benyttes blant annet i immunoassay og enzymassay (Weykamp, 2013).

HbA1c konsentrasjonen er en langtidsparameter, og det er dermed svært viktig for klinikerne med en testmetode som gir reproducerbare resultater over en lang tidsperiode. HbA1c måles hyppig på medisinske laboratorier, noe som krever at måleinstrumentene er effektive og robuste, kan analysere mange prøver samtidig, og ikke minst er kostnadseffektive i drift. Den valgte analysemetoden bør også passe inn i laboratoriestrukturen hvor prøvene skal analyseres – den kan enten være integrert i et generelt kjemisk analyseinstrument, eller et eget, frittstående instrument (Weykamp, John & Mosca, 2009).

2.2.2 Preanalytiske forhold ved måling av HbA1c

Blodprøven for analysen HbA1c tas enten kapillært eller venøst, og kan tas når som helst på døgnet uten pasientforberedelser. En forutsetning for å kunne bruke HbA1c diagnostisk er at pasientens HbA1c-svar i stor grad samsvarer med gjennomsnittlig plasma-glukose. Ved endret omsetning av erytrocytter, blant annet ved jernmangelanemi, hemolytisk anemi og transfusjoner, kan det oppstå manglende samsvar mellom HbA1c resultat og pasientens grad av glykemi (Vikøren et al., 2014).

HbA1c påvirkes i tillegg av en rekke andre genetiske, hematologiske og sykdomsrelaterte faktorer. Pasienter med kronisk leversvikt, blødninger, hemolytisk anemi og pasienter som behandles med jerntilskudd, vitamin B12 tilskudd eller tar høye doser av aspirin, vitamin C og E vil ofte ha lavere HbA1c enn det man skulle forventet ut ifra p-glukose. Økt HbA1c kan ses

ved blant annet alkoholisme, kronisk nyresvikt, B12-mangel eller jernmangelanemi (Gallagher, Le Roith & Bloomgarden, 2009; Vikøren et al., 2014).

Alder og etnisitet kan påvirke på HbA1c-konsentrasjonen. Det er kjent at HbA1c øker med økende alder, rundt 1 mmol/mol for hvert tiår og det er beskrevet noen etniske forskjeller. For eksempel sees det høyere HbA1c konsentrasjoner hos afrikanere enn hos kaukasier (Weykamp, 2013).

2.2.3 Holdbarhet og tidligere holdbarhetsstudier

Med mindre noe annet er spesifisert, er EDTA-blod førstevalget for HbA1c analyser. Stabiliteten til prøvematerialet er metodespesifikk. High-performance liquid chromatography (HPLC) metoder er generelt mer følsomme for gamle prøver, mens det kan være problematisk for enkelte pasientnære instrumenter å analysere lett hemolyserte prøver. Boronat-affinitets HPLC metoder viser bedre stabilitet enn HPLC metoder. Dette skyldes at ved bruk av HPLC metoder kan enkelte hemoglobinvarianter har ulik ladning, noe som kan påvirke separasjonen av komponentene i kromatogrammet (Rohlfing, Hanson, Tennill & Little, 2012; Weykamp, 2013).

EDTA-blod er generelt holdbart i opp mot en uke i 2-8°C, mens blodet lagret i -70°C eller lavere kan holde seg stabilt i opp mot ett år (Rohlfing et al., 2012; Weykamp, 2013). Eksponering for temperaturer høyere enn romtemperatur bør generelt unngås uavhengig av metode. Den foretrukne temperaturen for ionebyttermetoder er 4 grader, som holder prøvene stabile i 14-21 dager. Ved -20°C kan prøvene holde seg stabile i 4-10 dager (Rohlfing et al., 2012).

Det er tidligere blitt utført holdbarhetsstudier av HbA1c. En studie gjennomført av Rohlfing et al. i 2012 ble HbA1c holdbarheten i EDTA-blod undersøkt på fem ulike instrumenter. Instrumentene som ble brukt var Tosoh G7 og G8 samt Bio-Rad Variant II™, hvor alle tre benytter HPLC som analyseprinsipp, Siemens DCA 2000 + som benytter immunoassay og Trinity Biotech Ultra² som benytter boronat-affinitets HPLC. Fem EDTA-blodprøver med ulike HbA1c verdier ble analysert med alle instrumentene på dag 0, og deretter ble de lagret ved 6 ulike temperaturer (-70°C, -20°C, 4°C, romtemperatur, 30°C og 37°C). Videre ble prøvene analysert med ulike intervaller frem til dag 84. Akseptgrenser ble satt til gjennomsnittsverdi ±3 standardavvik (SD) av målingene på de 12 ulike dagene lagret i -70°C som ble analysert på

samme dag som prøvene oppbevart i andre temperaturer. I tilfeller hvor $\pm 3SD$ var mindre enn $\pm 0,2\%$ av HbA1c, ble gjennomsnitt $\pm 0,2\%$ HbA1c brukt for å definere akseptansen. Holdbarheten ble godkjent ved gitt temperatur dersom resultatene av alle fem nivåene av HbA1c prøver lå innenfor akseptgrensene på gitt dag. Resultatet av studien viste at Siemens DCA 2000+ viste best holdbarhet ved -20°C og ved romtemperatur, mens Trinity Biotech Ultra² viste best holdbarhet ved 4°C . Ingen av metodene viste god nok holdbarhet ved 30°C eller 37°C i mer enn 3 dager (Rohlfing et al., 2012).

En annen studie ble gjennomført av Niazipour et al i 2019. 40 ferske EDTA-blodprøver med ulike nivåer av HbA1c ble lagret i ulike temperaturer (-20°C , 4°C og 25°C) og analysert på dag 0, 7, 14 og 21 ved hjelp av Cobas Integra 400 (immunologisk metode). Resultatene viste at HbA1c-verdien ved første måling var usignifikant høyere enn resultatene av prøvene lagret i -20°C og 4°C , men sammenlignet med resultatene av prøvene lagret i 25°C var første måling signifikant høyere. Studien konkluderte med at lagring av prøver i kjøleskap eller fryser er nødvendig ved måling av HbA1c på Cobas Integra 400 for å unngå negativ innvirkning på holdbarheten av prøvene (Niazipour et al., 2019).

Det ble også utført en holdbarhetsstudie av HbA1c ved Avdeling for medisinsk biokjemi i Ålesund i 2019, og formålet var å sjekke holdbarheten på HbA1c i romtemperatur. Det ble benyttet EDTA-blod som ble analysert ved hjelp av Bio-Rad D-100 (ionebytterkromatografi). Studien konkluderte med at HbA1c i EDTA-blod analysert på Bio-Rad D-100 har en holdbarhet på 4 dager i romtemperatur (Noklus, u.d.).

En gjennomgang av analyseinformasjon ved norske laboratorier viser imidlertid at det er ulike holdbarhetsgrenser satt for analytten HbA1c ved de norske sykehusene i dag. Dette er vist i tabell 2.

Tabell 2. Holdbarhet til HbA1c i romtemperatur ved noen norske sykehus (Helse Bergen, 2020; Helse Stavanger, 2020; Oslo Universitetssykehus, 2020a; St. Olavs Hospital, u.d.; Universitetssykehuset Nord-Norge, 2020).

Sykehus	Metode	Holdbarhet i romtemperatur
Haukeland Universitetssjukehus (HUS) MBF seksjonen	HPLC (Bio-Rad D-100)	4 dager
Oslo Universitetssykehus (OUS) MBK Rikshospitalet	Kapillærelektroforese (Capillarys 2 Flex Piercing)	4 dager
Oslo Universitetssykehus MBK Ullevål	HPLC (Bio-Rad D-100)	5 dager
Oslo Universitetssykehus MBK Aker	HPLC (Tosoh G8)	6 dager
Oslo Universitetssykehus, Pasientnæranalysering	Immunoassay (DCA Vantage)	7 dager
Stavanger Universitetssjukehus	HPLC (Bio-Rad Variant II Turbo)	1 dag
Universitetssykehuset Nord-Norge	Kapillærelektroforese (Capillarys 3 Tera)	5 dager
St. Olavs Hospital Universitetssykehuset i Trondheim	HPLC (Tosoh Automated Glycohemoglobin Analyzer HLC-723G8)	4 dager

2.2.4 Interferens

De vanligste kildene til interferens ved analyse av HbA1c er hemoglobinvarianter og forhøyete verdier av føtalt hemoglobin (HbF). Strukturelle hemoglobinvarianter har punktmutasjoner i proteinkjeder, og det er i dag blitt identifisert over 900 ulike varianter. De vanligste hemoglobinvariantene er HbS, HbC, HbE og HbD. Interferensen fra disse hemoglobinvariantene er imidlertid både variant- og metodespesifikk (National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP), 2019; Weykamp, 2013).

2.2.5 Standardisering av HbA1c analysen

For kliniske laboratorier er det viktig å kunne produsere reproducerbare resultater, uavhengig av hvilken metode som blir brukt. På grunn av dette ble HbA1c analysen standardisert for å sikre at resultatene kan sammenlignes uavhengig av analysemetode og analysested (Schwettmann, Berg & Sandberg, 2018; Weykamp, 2013).

Standardiseringen av HbA1c analysen ble gjennomført av International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) i 2007 og resulterte i et internasjonalt referansesystem for HbA1c. Referansesystemet baserer seg på en definitiv metode og en entydig definert molekylform av HbA1c. De ulike analysemetodene ble sammenlignet med referansemetoden gjennom et sporbarhetshierarki. Dette førte til at analyseresultatene ble sporbare til en internasjonal standard (Schwettmann et al., 2018; Weykamp, 2013).

I en konsensusrapport fra 2007 ble IFCC sammen med International Diabetes Federation (IDF), European Association for the Study of Diabetes (EASD) og American Diabetes Association (ADA) enige om at alle måle metodene for HbA1c skulle være sporbare til IFCC-referansemetode, og at svaret skal utgis med SI-enheten som mmol glykert hemoglobin per mol hemoglobin (mmol/mol). Endringen i enhet ble innført i Norge i 2018. Tidligere ble svarene utgitt i % basert på en tidligere standardisering gjennomført i 1993 av National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). Det ble utarbeidet en masterligning som viser sammenheng mellom NGSP-standardisering (%) og IFCC-standardisering (mmol/mol):

$$HbA1c_{NGSP}[\%] = 0,09148 \times HbA1c_{IFCC}[mmol/mol] + 2,152$$

$$HbA1c_{IFCC}[mmol/mol] = 10,931 \times (HbA1c_{NGSP}[\%] - 2,152)$$

(Weykamp, 2013)

2.2.6 Referanseintervall

Ulike analysemetoder medfører ulike referanseområder. I Helse Bergen har MBF valgt å ikke benytte seg av referanseområde, men opererer heller med beslutningsgrense på HbA1c ≥ 48 mmol/mol for å stille diagnosen diabetes (Helse Bergen, 2020).

Anbefalt behandlingsmål for pasientene er individuelt, men DM bør holdes innen følgende grenser:

- Ved DM1 og DM2 anbefales HbA1c verdier omkring 53 mmol/mol for å sikre god livskvalitet.
- Hos pasienter med nyoppdaget diabetes eller pasienter i ung alder, anbefales HbA1c verdier omkring 48 mmol/mol.
- Hos personer med for lavt blodsukker, personer som har hatt diabetes lenge eller som har andre alvorlige sykdommer, anbefales en HbA1c på mellom 53-64 mmol/L.

(Helsedirektoratet, 2012; Nasjonal selskap for medisinsk biokjemi, 2020).

2.2.7 Analytisk og biologisk variasjon

Alle analysemetoder har en viss grad av usikkerhet, som beskrives ved metodens analytiske variasjon. Bidrag til analytisk variasjon inndeles i tilfeldige feil og systematiske feil, hvor den systematiske feilen bør være tilnærmet lik null. Tilfeldige feil er feil som påvirker resultatet i ulike retninger. Disse feilene kan ikke elimineres helt fra analyseprosessen, men bør reduseres og holdes under kontroll. Tilfeldige feil kan tallfestes ved å måle spredningen, i form av standardavvik (SD) eller variasjonskoeffisient (CV) rundt gjennomsnittet til en prøve eller kontroll. Systematiske feil (bias) påvirker resultatet i en retning og analysesvaret blir enten for høyt eller for lavt. Konstante systematiske feil gir feilmåling i en bestemt størrelse, mens proporsjonale systematiske feil vil øke eller avta i forhold til mengden analytt. Totalfeil (TE) er kombinasjonen av systematiske og tilfeldige feil der begge typer feil drar i samme retning (Bolann & Åsberg, 2020).

$$bias\% = \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} * 100\% \quad (1)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$CV\% = \frac{SD}{\bar{x}} * 100\% \quad (3)$$

$$TE_a = bias + 1,65 S_a \quad (4)$$

(Bolann & Åsberg, 2020; Helbæk, 2001)

Noen analytter viser varierende konsentrasjoner avhengig av alder, og det er da nødvendig å sette referansegrenser på bakgrunn av dette. Analytter kan i tillegg gjennomgå biologiske sykluser i løpet av døgn, måneder eller år, eller de kan gjennomgå tilfeldige variasjoner. Den biologiske variasjon kan inndeles i intra-individuell (CV_i) og inter-individuell (CV_g) biologisk variasjon. Intra-individuell variasjon vil si den variasjonen som oppstår naturlig over tid hos enkeltpersoner. Inter-individuell variasjon er variasjonen i analyttkonsentrasjon mellom friske enkeltindivider, og det er denne som setter grunnlaget for referansegrensene (Fraser, 2001).

Ulike kilder oppgir ulik biologisk variasjon for HbA1c. Tabell 3 viser data hentet fra Westgard sin biologiske variasjonsdatabase og European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) sin biologiske variasjonsdatabase.

Tabell 3. Biologisk variasjon for HbA1c. Tabellen viser analytisk variasjon (CV), totalfeil (TE) og Riktighet (bias) for HbA1c oppgitt av henholdsvis Helsedirektoratet, Westgard og EFLM (EFLM, u.d; Westgard QC, u.d.).

	Analytisk variasjon (CV)	Totalfeil (TE)	Riktighet (bias)
Westgard	0,9 %	3,0 %	1,5 %
EFLM	0,8 %	3,1 %	1,8 %

Helsedirektoratet stiller også krav til CV og TE for HbA1c. Disse er basert på kvalitetskrav som er i tråd med ekstern kvalitetsvurdering (EKV). For HbA1c oppgir Helsedirektoratet en $CV \leq 3\%$ og tillatt $TE = 7,4\%$ (Helsedirektoratet, 2020). På bakgrunn av opplysningene fra Helsedirektoratet kan tillatt bias beregnes på følgende måte ved hjelp av formel 4:

$$bias = 7,4\% + 1,65 * 3,0\% = 2,45\%$$

2.3 Utforming og kvalitetskrav for holdbarhetsstudier

For å kunne gi et analysesvar som er representativt for pasientens tilstand, må analyttkonsentrasjonen ikke ha gjennomgått en klinisk signifikant endring fra prøvetakingstidspunktet til analysetidspunktet (Åsberg, Solem & Mikkelsen, 2011). Analyseresultatet må ikke endres så mye at det i praksis påvirker hvilken diagnose som settes, eller behandlingsforløpet.

Nasjonalt prosjekt for standardisering av holdbarhetsforsøk var et samarbeid mellom Norsk Klinisk-kjemisk Kvalitetssikring (NKK), Bioingeniørfaglig Institutt (BFI) og Norsk selskap for medisinsk biokjemi (NSMB), og førte til utarbeidelsen av en protokoll for holdbarhetsforsøk i Norge (Noklus, 2015). Her anbefales det at gjennomsnittskonsentrasjonen av analytten ikke skal endres mer enn utgangskonsentrasjonen \pm tillatt bias, og at enkeltprøvers konsentrasjon ikke skal endres mer enn utgangsverdi \pm tillatt totalfeil. Som tidligere forklart er bias et mål på systematisk feil der alle måleresultatene trekkes i en bestemt retning fra den sanne verdien. Tillatt totalfeil er den største systematiske og tilfeldige feilen som kombinert kan tillates i et prøveresultat før det må regnes som uriktig (Bolann & Åsberg, 2020).

To metoder anbefales for gjennomføring av holdbarhetsforsøk: Batch-metoden eller Buksemetoden (Noklus, 2015). Ved Buksemetoden brukes prøver fra rutinen og analyseres på randomiserte dager og tidspunkt. Denne metoden brukes dersom det ikke er dokumentert at prøvematerialet kan oppbevares ved spesielle betingelser, som f.eks. frysing.

2.3.1 Batch-metoden

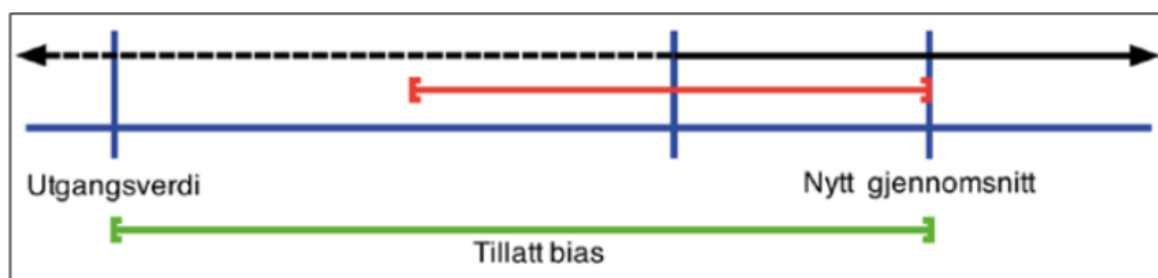
Batchmetoden brukes når prøvematerialet kan deles inn i ulike grupper etter oppbevaringsbetingelser, og det er holdbart ved f.eks. nedfrysing. Prøvematerialet oppbevares ved ulike betingelser. Disse kan være tid mellom prøvetaking og analysering, oppbevaring ved ulike temperaturer, ulike transportforhold, eller tining av prøvene i flere sykluser. Prøvene fryses etter at de bestemte betingelsene for hver enkelt gruppe har blitt oppfylt.

Ulike konsentrasjoner av prøvematerialet bør inngå i forsøket for å kunne teste holdbarheten for hele måleområdet. For å unngå dag-til-dag-variasjon tines og analyseres alle prøvene samtidig. Utgangsverdien settes som 100 %, og prosentmessig endring i de påfølgende prøvene regnes ut.

90 % konfidensintervall regnes ut for gjennomsnittet av hver av gruppene med ulike oppbevaringsbetingelser. Dette gjøres for å lage et estimat av det sanne gjennomsnittet (Noklus, 2015).

$$\text{konfidensintervall for gjennomsnittet} = \bar{x} \pm t_{n-1} \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

(Bolann & Åsberg, 2020)



Figur 2. Ved oppbevaring av analytten under bestemte betingelser kan endringer i gjennomsnittskonsentrasjonen oppstå. Den blå akse viser en verdiskala. Tillatt bias (grønn akse) er like stort som avviket mellom gjennomsnittene. 90 % konfidensintervall for en enkelt gjennomsnittsverdi vises vha. den røde linjen. Beliggenheten til 95 % av de høyeste gjennomsnittsverdiene vises ved den heltrukne, svarte pilen, mens de 5 % laveste gjennomsnittsverdiene vises ved den stiplede pilen. Her går høyre ende på konfidensintervallet opp til grensen for tillatt bias, og en alarm om dårlig holdbarhet ville blitt utløst. Dersom verdien hadde vært i området for den stiplede pilen, ville ingen alarm blitt utløst. Når gjennomsnittsavviket er likt tillatt bias er det derfor 5 % sannsynlighet for at en alarm uriktig ikke utløses (Åsberg et al., 2011).

Ved sammenligning av grensene for konfidensintervallet med akseptområdet ($100 \% \pm$ tillatt bias) kan man få et inntrykk av holdbarheten til komponenten som måles. Dersom hele konfidensintervallet ligger innenfor akseptområdet, er det minst 95 % sikkert at den sanne gjennomsnittlige endringen ikke overstiger tillatt bias. Hvis konfidensintervallet ligger utenfor akseptområdet kan det konkluderes med at prøvematerialet ikke er holdbart, og det er minst 95 % sikkert at den sanne gjennomsnittlige endringen er større enn tillatt bias. Dersom en eller begge akseptgrensene krysses av konfidensintervallet kan man ikke si nok om kvaliteten på prøvematerialet, og det må eventuelt analyseres flere prøver.

Enkeltmålinger må også ligge innenfor akseptområdet ($100 \% \pm$ tillatt totalfeil). For hver av oppbevaringstidene skal 95 % av verdiene ligge innenfor grensene for tillatt totalfeil. Rådata må også vurderes for å undersøke om det kan foreligge enkeltfeil i prøverekken fra en person. For å kunne konkludere med at prøvematerialet er holdbart, må både kriteriene for gjennomsnittsverdien og enkeltverdier må være oppfylt.

Ved å analysere mange prøver vil 90 % konfidensintervallet rundt gjennomsnittet bli smalere, og sannsynligheten for å komme frem til feil konklusjon minsker. Antallet prøver bør ikke være lavere enn 20. Forsøket bør utvides for å snevre inn 90 % konfidensintervallet dersom 90 % konfidensintervallet krysser en av akseptgrensene, eller mer enn 1 av 20 enkeltverdier overskrider tillatt totalfeil (Noklus, 2015).

3 Material og metode

3.1 Instrument og reagenser

I dette holdbarhetsforsøket ble det brukt følgende instrument for analysering av HbA_{1c}:

- Bio-Rad D-100™ Hemoglobin Testing System, Serienummer DT9A140901 (Bio-Rad, California, USA)
 - D-100 HbA_{1c} analytical cartridge (LOT nr.: 90095AZ)
 - Prefilter (LOT# 90270BC)
- Reagenser
 - Buffer A (LOT# 64371042)
Succinate/natrium perchlorat buffer med <0,1% natriumazid
 - Buffer B (LOT# 64332768)
Succinate/natrium perchlorat buffer med <0,1% natriumazid
 - Vaskebuffer (LOT# 64357943)
inneholder deionisert vann med <0,1 % natriumazid som konserveringsmiddel
- Kontroll (Bio-Rad Lypocheck Diabetes Controls)
 - Bio-Rad Level 1, lavt nivå (34,1 mmol/mol [32,3-35,9 mmol/mol]) (LOT# 34001)
 - Bio-Rad Level 2, høyt nivå (84,0 mmol/mol [81,4-86,6 mmol/mol]) (LOT# 34002)

- Pasientkontroll, cut-off nivå (50,7 mmol/mol [48,7-52,7 mmol/mol]) (Laget av Seksjon for porfyrianalyser, LOT# 100920)
- D-100 HbA1c Calibrator Pack (LOT# 64362067, Bio-Rad, USA)

3.2 Annet utstyr

- Utstyr til blodprøvetaking
 - Elipse Kanyle 21Gx1" (LOT# 0133833, BD Plymouth, Storbritannia)
 - EDTA-rør (Vacuette®Tube 2mL, LOT# A20023FM, Greiner Bio-One, Østerrike)
- Rør uten tilsetning (Vacuette ®Tube, LOT# B40013FM, Greiner Bio-One, Østerrike)
- Panasonic ultradypfryser, -80°C (Panasonic, Japan)
- Sanyo ultradypfryser, -86 °C (Sanyo, Japan)

3.3 Utvalg

Målsetningen var å samle inn fire EDTA-rør (2 mL) med blod fra totalt 90 personer, hvorav rundt 30 hadde lave HbA1c-verdier (<40 mmol/mol), rundt 30 var i cut-off nivå (fra 40-50 mmol/mol) og rundt 30 hadde høye verdier (≥ 51 mmol/mol).

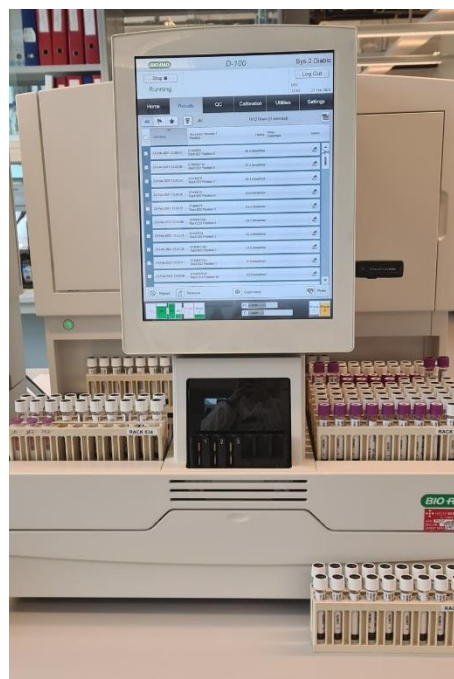
1. For å få frivillige deltakere ble det lagt ut en kunngjøring på Canvas (læringsplattform på HVL) for å rekruttere studenter til å gi blod (vedlegg 1). Det ble samlet inn 19 prøver i normalt nivå og 1 prøve i høyt nivå.
2. Det ble også forsøkt å samle inn blodprøver av diabetes pasienter på poliklinikken ved Haukeland Universitetssykehus (n=4), samt blant ansatte på laboratoriene (normalt nivå, n=10) (se informasjonsskriv).
3. I samarbeid med Seksjon for porfyrianalyser på MBF ble det samlet inn rutine pasientprøver med HbA1c verdier i normalt nivå (n=1) cut-off nivå (n=30) og høyt nivå (n=25).

Etter sortering av analyseresultater viste det seg at det ble samlet 33 prøver i normalt nivå, 27 prøver i cut-off nivå, og 30 prøver i høyt nivå.

3.4 Prøvehåndtering

Blodprøvene ble tappet på fire EDTA-rør, hvor det ene røret ble fryst ned på dag 0, samtidig som de gjenværende rørene ble oppbevart i romtemperatur (ca. 24°C) og deretter lagret ved -80°C etter henholdsvis 4, 5 og 6 dager. Prøvematerialet fra de utvalgte rutineprøvene ble fordelt på fire tomme rør uten tilsetning og behandlet på samme måte som øvrige prøvene.

Alle prøvene ble oppbevart ved -80°C eller kjøligere i ca. 2 uker, og analysert samlet for å unngå dag til dag variasjon. Prøvene ble analysert av personalet på Seksjon for porfyrianalyser på Bio-Rad D-100™. Det ble analysert kontroller (en kontroll i hvert nivå) ved oppstart og på hver 60. prøve gjennom hele analyseserien.



Figur 3. Bio-Rad D-100 ble brukt for å analysere HbA1c i totalt 360 prøver med ulike nivåer (lav, cut-off og høy).

3.5 Instrument og analyseprinsipp

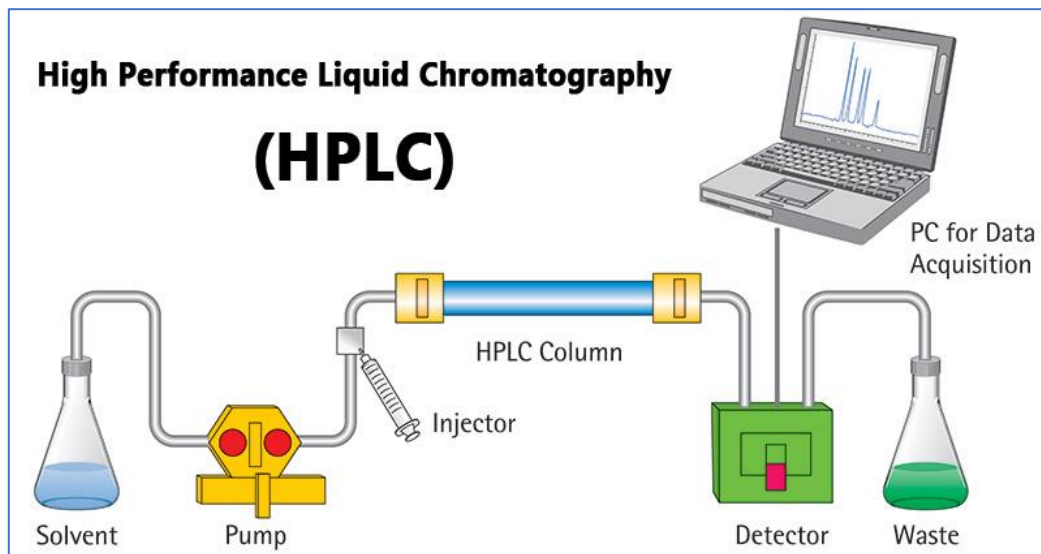
3.5.1 HPLC

HPLC (High-performance liquid chromatography) er en væskechromatografi som benyttes til analyse av mindre molekyler, f.eks. peptider og aminosyrer. HPLC-instrument består av følgende deler:

1. Kolonne: Stasjonærfasen er laget av et absorberende materiale med veldig liten partikkelstørrelse. Stasjonærfasens kjemiske oppbygning varierer avhengig av HPLC-metoden.
2. Den mobile fasen kan være polar (ved bruk av revers fase HPLC) eller ikke-polar avhengig hva som skal analyseres. Den mobile fasen pumpes inn i kolonnen ved hjelp av en høy trykkpumpe. Prøvemateriale injiseres og komponentene i prøven vil vandre gjennom

kolonnen sammen med mobile fasen. Komponentene vil interagere med stasjonær fase i ulik grad. Dermed vil komponentene vandre gjennom kolonnen og elueres med ulik hastighet.

3. Detektoren registrerer når de ulike komponentene i prøven elueres ut gjennom den stasjonære fasen og retensjonstiden beregnes. Programmet i detektoren genererer et kromatogram (Harris, 2016, s. 667-669).



Figur 4. Forenklet oppsett av HPLC (Aryal, 2018).

Ionebytterkromatografi baseres på tiltrekningen mellom løsemiddelioner og ladete områder på den stasjonære fasen. Den stasjonære fasen består av et uløselig, polymert material. Dette materialet inneholder ioniske grupper, som er knyttet til ioner med motsatt ladning (også kalt motioner) på grunn av den elektrostatiske tiltrekningen mellom dem. Slike motioner kan byttes ut med andre ioner fra enten mobilfase eller prøve.

I en kationbytter brukes det kation som ionebytter. Denne har en negativ ladet overflate og benyttes til å separere kationer, ved at overflaten binder positiv ladete motioner. I en anionbytter brukes det anioner som ionebytter. Denne brukes til å separere anioner. (Harris, 2016, s. 714).

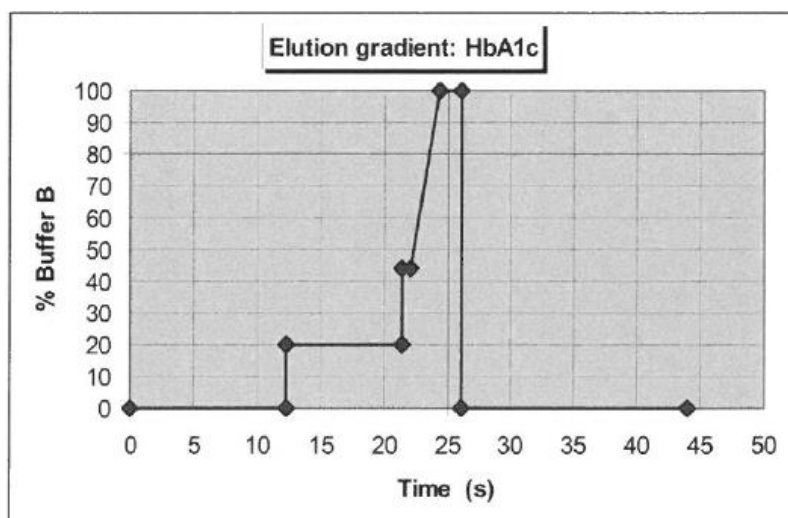
3.5.2 D100™-system

Bio-Rad D-100™ systemet er en automatisert analysator. Instrumentet benytter kromatografi basert på kationbytterkolonne i analyse av HbA1c. Instrumentet bruker 45

sekunder per prøve og kan prosessere opp til 80 prøver på en time. Dermed er dette instrumentet godt egnet for større laboratorier (Bio-Rad, u.d.-a).

3.5.3 Analyseprinsipp D-100™

D-100™ bruker en gradient separasjons metode for å eluere ulike hemoglobin derivater fra den stasjonære fasen ved ulike tidspunkt. Dette gjennomføres ved å gradvis øke ionestyrken av den mobile fasen (Bio-Rad, u.d.-a).

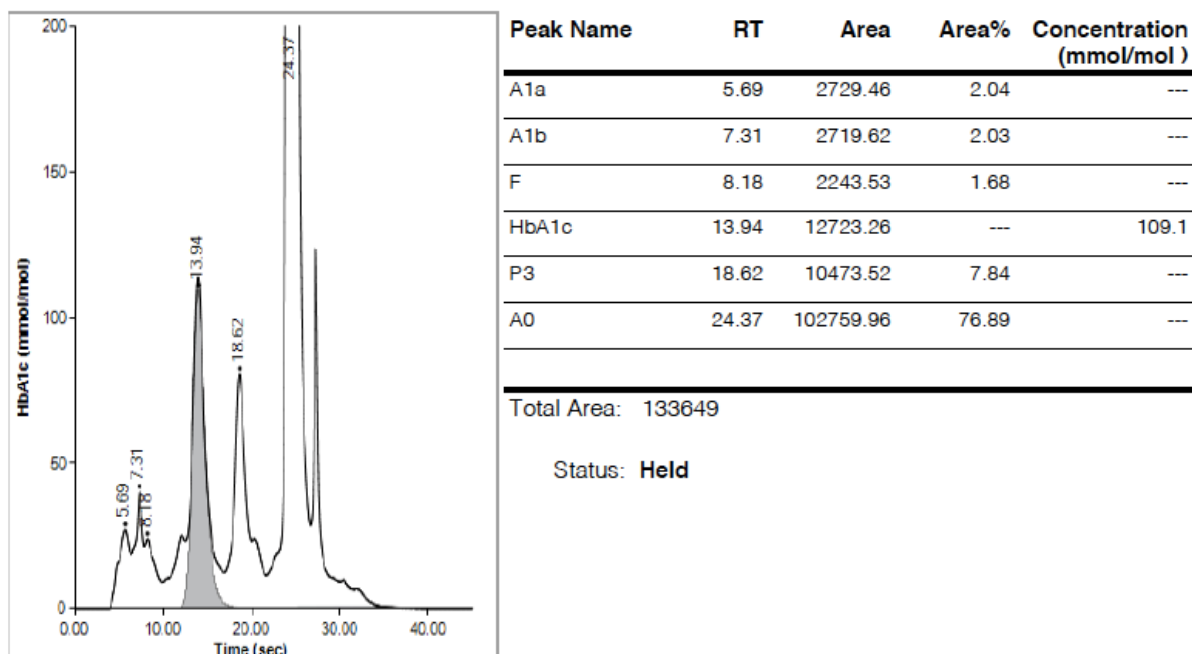


Figur 5. Eluerings gradient til D-11 systemet. På x-aksen er det tid i sekunder og på y-aksen er % Buffer B. Hb1Ac elueres etter ca. 14 sekunder (Bio-Rad, u.d.-a).

Den stasjonære fasen er en kolonne som består av resin (laget syntetisk). Kolonnen er et rettlinjert kalibrert rør. Resinet i kolonnen er plassert mellom to porøse plater i hver ende. D.100 systemet bruker to buffere (buffer A og buffer B) som mobilfase. Buffer B har en høyere elueringsstyrke enn buffer A (Bio-Rad, u.d.-a).

EDTA-prøvene blir automatisk hemolysert og fortynnet i instrumentet, og blir deretter overført til stasjonærfasen med en 100% buffer A mobilfase. Prefilteret fanger opp eventuelle urenheter som f.eks. små koagler eller rusk fra prøven. Konsentrasjonen av buffer B økes og dermed økes elueringsstyrken i den mobile fasen. Hemoglobin fraksjonene elueres ut i følgende rekkefølge: A1a/A1b, F, LA1c, HbA1c, P3 og A0. Retensjonstiden vil totalt være ca. 30 sekunder. En detektor måler prøvens absorpsjon ved 415 nm. Hemoglobin fraksjonene identifiseres og retensjonstid, toppareal og relativt areal blir behandlet i programvaren til

instrumentet. Alle toppene som blir identifisert som måleanalytter blir kalibrert før generering av prøverapporten (Bio-Rad, u.d.-c).



Figur 6. Eksempel på kromatogram med tabell over de ulike retensjonstidene, areal og areal%, samt konsentrasjon av HbA1c.

Det gjøres en helhetsvurdering av kromatogrammene, hvor både P3-toppen og andre topper inngår, samt totalareal, separasjon og eventuelle interfererende topper. P3 topp sitt areal skal være under 10%, og arealet vil øke ved oppbevaring av prøvematerialet (Gupta, Thalquotra & Rao, 2016). Tabellen i figur 6 viser et areal for P3-toopen på 7,84 %, som er innenfor kravet. I tillegg er det viktig å sjekke om total arealet ligger innenfor grensen (50.000-350.000 enheter). Generelt sees det også på at toppene av de ulike komponentene er godt separert. De resterende toppene representerer ulike fraksjoner som blir eluert ut. A1a og A1b toppen representerer henholdsvis hemoglobin A1a og hemoglobin A1b. Topp F representerer føtalt hemoglobin, HbA1c toppen representerer HbA1c og ukjent topp viser udefinerte Hb varianter som finnes i prøven. A0 toppen representerer hemoglobin A. I enkelte prøver forekommer også LA1c topp som representerer labilt A1c, men kan ikke observeres i kromatogrammet i figur 6.

3.5.3.1 Begrensninger med metoden

Hemoglobinvarianter kan påvirke HbA1c-analysen. I utgangspunktet vil de vanligste heterozygote hemoglobinvariantene (HbAS, HbAC, HbAD og HbAE) ikke interferere. Men i

homozygote og dobbelt-heterozygote hemoglobinvarianter (bl.a. SS, CC og SC) vil det ikke være noe HbA til stede, som fører til at det heller ikke vil kunne dannes HbA1c som kan måles (Bio-Rad, u.d.-b).

3.5.3.2 Interfererende substanser

Hemoglobin F med konsentrasjon under 30 % interferer ikke med analysen. Men hver prøve med en HbF konsentrasjon over 5 % skal mistenkes for å ha hemoglobinopati. Labil A1c (angitt med glukosekonsentrasjoner opptil 1200 mg/dL) interferer ikke med analysen. Karbamylert hemoglobin eller acetylt hemoglobin interferer ikke med analysen ved fysiologiske forekommende konsentrasjoner. Legemidler ved terapeutiske konsentrasjoner interferer ikke med analysen (Bio-Rad, u.d.-b).

Tabell 4. Endogene stoffer som ikke påvirker analysen opptil de angitte konsentrasjonene (Bio-Rad, u.d.-b)

Endogent stoff	Konsentrasjon
Lipemi (Intralipid®)	60 g/L
Konjugert bilirubin	712 µmol/L
Ukonjugert bilirubin	1026 µmol/L
Glukose	111 mmol/L
Reuma-faktor	750 kIU/L
Totale proteiner	210 g/L

3.6 Statistiske beregninger

Databehandlingen er todelt:

1. Bruk av batchmetoden – holdbarhetsstudier (Noklus, 2015)
2. Bruk av parametriske statistiske metoder

3.7 Batchmetoden – kvalitetskrav

Analysekvalitetskrav skal bestemmes ut ifra hvordan analysen skal brukes i pasientarbeid. Som et minimum bør krav til impresisjon og bias fastlegges for analysene og deretter oppdateres ved nye valideringer. Det er viktig at det angis hvordan kravene som blir brukt er fastlagt (Oslo Universitetssykehus, 2020b).

Innen laboratoriemedisin er det i senere år arbeidet internasjonalt for å sette kvalitetsspesifikasjoner som sikrer god analysekvalitet og riktig bruk av analyseresultater. I

2014 var det en kongress i Milano i regi av European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Det ble enighet om følgende modell i prioritert rekkefølge:

- Modell 1: Basert på studier av klinisk utfall
 - Modellen baserer seg på studier som viser hvordan analysekvaliteten vil påvirke det kliniske utfallet ved bruk av analysen, for eksempel hvordan mindre strenge krav kan føre til høyere måleusikkerhet og påvirkning av diagnostikken.
- Modell 2: Basert på biologisk variasjon
 - Modellen baserer seg på at stor biologisk variasjon fører til at det ikke er nødvendig med høye krav til analytisk presisjon og riktighet. Den kan dermed benyttes på de fleste analytter hvor det finnes data over biologisk variasjon.
- Modell 3: Basert på «state of the art» det vil si det beste man med nåværende teknikk klarer å oppnå. Eventuelt krav som er satt av autoritative organisasjoner eller faggrupper
 - Modellen brukes når modell 1 og 2 ikke er aktuelle, og baserer seg på den beste analysekvaliteten som kan oppnås med den analysemetodikken som er tilgjengelig på nåværende tidspunkt.

(Panteghini et al., 2017)

Modell 1 benyttes på HbA1c i dag og gir krav til at analysekvaliteten for metoden ikke skal ha en større relativ total feil (TE) ved 58,5 mmol/mol på $\pm 9,4\%$ (Panteghini et al., 2017). Her oppgis ikke de ulike bidragene til analytisk variasjon.

Ved bruk av modell 2 og biologisk variasjon fra ulike biologiske databaser, vist i tabell 3, ville imidlertid ført til svært snevre kvalitetsgrenser. Det ble derfor besluttet etter råd fra Seksjon for porfyrianalyser å bruke modell 3 ved fastsettelse av mål for analysekvalitet i dette prosjektet. Helsedirektoratet har satt følgende kvalitetskrav til HbA1c analysen dersom den skal benyttes til å stille diabetesdiagnose. Metodens totalfeil må ikke overskride 7,4 % og metodens CV må være mindre enn eller lik 3 %. Dette kravet samsvarer med de akseptgrensene som brukes ved ekstern kvalitetsvurdering.

3.8 Parametriske statistiske metoder

3.8.1 Normalfordeling

For å kunne vurdere om data var normalfordelt, ble det utarbeidet histogrammer for å fremstille fordelingen av verdiene i datasettet grafisk. Det ble laget 3 histogrammer, henholdsvis for differansen mellom HbA1c målingene på dag 0-4, dag 0-5 og dag 0-6. Dette for å kunne vurdere om data kunne bli ansett som normalfordelt, eller tilnærmet normalfordelt.

3.8.2 Bland-Altman plott

Bland Altman plott brukes for å undersøke forholdet mellom to metoder eller analyseserier og kan brukes til å identifisere systematiske forskjeller mellom to metoder. Disse kan være konstant eller konsentrasjonsavhengige avvik. Akseptable grenser, samsvarsgrenser, defineres på forhånd ved å bruke gjennomsnittet og standardavvikene for differansene til de to målingene. Dette brukes i et spredningsdiagram der y-aksen viser gjennomsnittet av målingene og x-aksen viser differansen mellom målingene. Bruk av Bland Altman plott forutsetter at dataene er normalfordelt, og det bør utføres en test for dette (Giavarrina, 2015). Samsvarsgrenser, *limits of agreement* (LOA), ble beregnet ut ifra standardavviket for differansen mellom henholdsvis dag 0-4, dag 0-5 og dag 0-6. For å beregne LOA ble følgende formel brukt:

$$\text{gjennomsnittsdifferansen} \pm 1,96 \text{ standardavviket for differansen} \quad (6)$$

For 95% av målingene vil forskjellen mellom målingene ligge innenfor området for LOA. Samsvarsgrensene avhenger av både systematiske forskjeller og metodenes upresisjon. (Bolann & Åsberg, 2020, s. 96)

3.8.3 Regresjonsanalyse

Regresjonsanalyse ble så gjennomført for å beskrive den gjennomsnittlige sammenhengen mellom de korresponderende måleresultatene for dag 0-4, dag 0-5 og dag 0-6. Det ble utført lineær regresjon (minste kvadrats metode) og sammenhengen mellom de to datasettene er vist med regresjonslinjen. Denne er beskrevet med likningen for den rette linjen $y=ax+b$, hvor a beskriver stigningstallet og b beskriver skjæringspunktet med y-aksen. Statistisk signifikant

forskjell ($a \neq 1$ og $b \neq 0$) kan begrunnes utfra om tilhørende konfidensintervall for a og b omfatter henholdsvis tallet 1 og 0. Korrelasjonsfaktoren forteller grad av samvariasjon mellom de to datasettene. Likhetslinjen ($y = x$) eller egalitetslinje er ment som et visuelt hjelpemiddel til å tolke grad av samsvar i datasettet.

3.8.4 Paret t-test

Tosidig, paret t-test ble utført for å undersøke om det er statistisk signifikant forskjell på HbA1c verdiene mellom dagene. For denne testen ble hypotesene satt som følger:

H_0 : Det er ingen signifikant forskjell mellom dagene.

H_1 : Det er signifikant forskjell mellom dagene.

Paret t-test brukes dersom dataene som testes mot hverandre kommer fra den samme måleserien eller datasettet, og er en test for å sjekke om det er statistisk signifikant forskjell mellom to grupper/ måleserier. Differansene i datasettet må være tilnærmet normalfordelt og gjennomsnittsdifferansen må være tilnærmet konstant. Ved paret t-test beregnes t observert vha. følgende formel:

$$t_{obs} = |\bar{x}_d| \frac{\sqrt{n}}{s_d} \quad (7)$$

Dersom verdien til t_{krit} overstiger verdien til t_{obs} , er det ingen signifikant forskjell mellom måleseriene. P-verdi beregnet ved hjelp av paret t-test testes normalt på 5% signifikansnivå. Dette innebærer at p-verdier $> 0,05$ påviser statistisk signifikant forskjell, mens p-verdier $> 0,05$ påviser at det ikke er statistisk signifikant forskjell (Helbæk, 2001).

3.9 Etiske betraktninger

Dette prosjektet er et kvalitetssikringsprosjekt. Kvalitetssikring defineres som: «prosjekter, undersøkelser, evalueringer o.l. som har som formål å kontrollere at diagnostikk og behandling faktisk gir de intenderte resultater» (Fellesorganet for REK, 2011, s. 1). Kvalitetssikring faller dermed utenfor helseforskning som defineres som «virksomhet som utføres med vitenskapelig metodikk for å skaffe til veie ny kunnskap om helse og sykdom». (Fellesorganet for REK, 2011, s. 1). På grunn av dette er det derfor ikke nødvendig å fremlegge

prosjektet for Regional Etisk Komité (REK). I forkant av prosjektet ble det imidlertid sendt søknad til Personvernombudet for å forsikre seg om at studien følger personvernreglementet.

Det ble ikke samlet inn personopplysninger om deltakere, og deltakeres identitet holdes dermed anonymt. Det er ingen mulighet å spore prøvene tilbake til de frivillige deltakere. På grunn av dette var det ikke nødvendig å søke om godkjenning fra Norsk Senter for Forskningsdata (NSD) som driver med dataforvaltning i forskningssektoren (Norsk Senter for Forskningsdata, u.d.).

Som en del av oppgaven er det nødvendig å få tak i tilstrekkelig med biologisk materiale, i dette tilfelle blod. Ifølge Helseforskningsloven, §22 skal forskning som involverer mennesker ha en grundig vurdering av risiko og belastning for deltakeren (Helseforskningsloven, 2008). I dette tilfelle ble det tappet 8 mL EDTA-blod fra frivillige, og ble ikke sett på som belastende. Materialet ble destruert etter analysering.

Deltakere i prosjektet fikk informasjon i form av et informasjonsskriv (vedlegg 2), og ga muntlig samtykke til å delta. Dette ble sett på som informert samtykke. Informasjonsskrivet inneholdt imidlertid ingen informasjon om at deltakeren kan trekke seg fra studiet. Dette ble begrunnet i at prøvene ikke ble ID-markert. For prøvene som ble hentet inn internt fra MBF vises det til §20 i helseforskningsloven hvor det kommer frem at allerede innhentet biologisk materiale kan brukes til kvalitetssikring, uten samtykke fra pasienten (Helseforskningsloven, 2008).

4 Resultat

Hensikten med dette studiet var å undersøke om holdbarheten til HbA1c i romtemperatur kan utvides fra 4 til 5 eller 6 dager. Det ble samlet inn blodprøver fra total 90 ulike individer, med 33 prøver i lavt nivå (<40 mmol/mol), 27 prøver i cut-off nivå (40 mmol/mol – 50 mmol/mol) og 30 prøver i høyt nivå (≥ 51 mmol/mol).

Blodprøvene ble fordelt og oppbevart i henholdsvis 4, 5 og 6 dager i romtemperatur (24°C) og deretter fryst ved -80°C eller kaldere. Prøvene ble deretter tint og analysert på Bio-Rad D-100 (Diablo) på samme dag for å minimere dag til dag variasjon. Totalt ble 360 blodprøver analysert. Tabell over resultatene er vist i vedlegg 3.

4.1 Kvalitetskontroller og kromatogram

Det ble brukt tre ulike kontroller for lavt, cut-off og høyt nivå. Kontrollen for cut-off nivå ble laget av pasientprøver av Seksjon for porfyrianalyser. Kontrollene ble analysert for hver 60. prøve.

Tabell 5. Tabellen oppsummerer gjennomsnitt, standardavvik og CV for HbA1c kontroller. Alle kontrollene er analysert på Bio-Rad D-100 (Diablo) i perioden 1.02.2021-26.02.2021.

	Lot nr.	n	Gjennomsnitt (mmol/mol)	SD (mmol/mol)	CV%
HbA1c Lypocheck Level 1 (32,3-35,9 mmol/mol)	34001	191	33,5	0,70	2,09
HbA1c Lypocheck Level 2 (81,4-86,6 mmol)	34002	191	83,9	1,20	1,43
Pasientkontroll (48,7-52,7 mmol/mol)	100920	191	51,1	0,50	0,98

Alle kontrollene i denne perioden hadde verdier som var innenfor $\pm 2SD$ og $\pm 3SD$. Presisjonen for kontrollene er generelt god, og ligger innenfor tillatt CV% (3%).

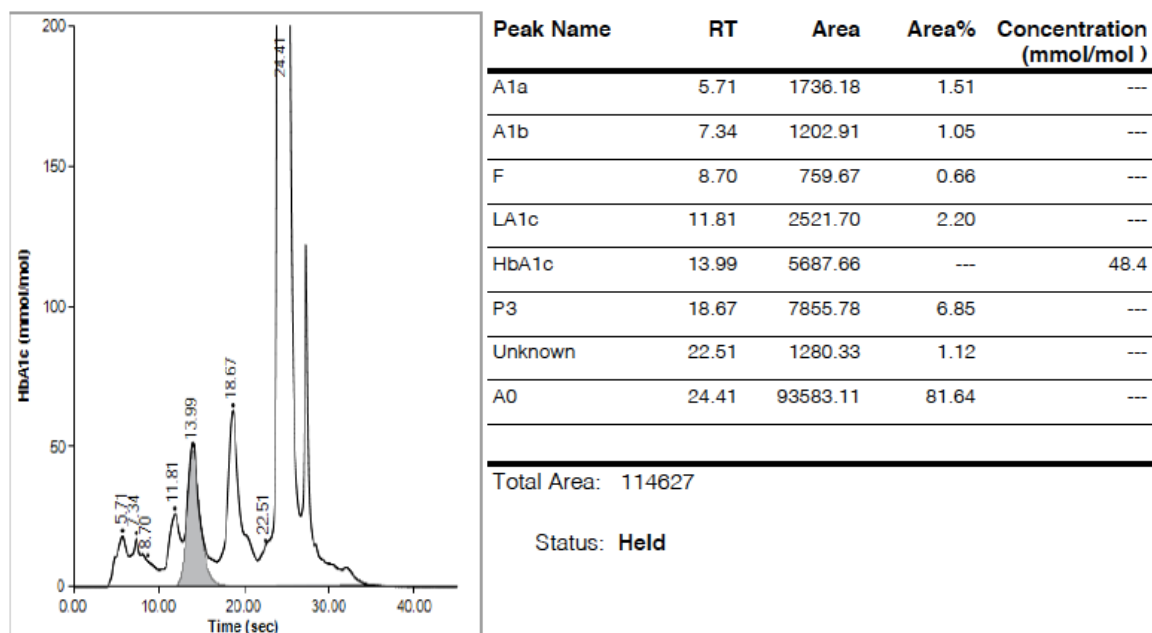
Tabell 6. Tabellen oppsummerer gjennomsnitt og standardavvik for HbA1c kontroller målt 23.02.2021. Alle kontrollene er analysert på Bio-Rad D-100 (Diablo).

	Lot nr	n	Gjennomsnitt (mmol/mol)	SD (mmol/mol)
HbA1c Lypocheck Level 1 (32,3-35,9 mmol/mol)	34001	7	34,1	0,9
Hba1c Lypocheck Level 2 (81,4-86,6 mmol)	34002	7	84,0	1,3
Pasientkontroll (48,7-52,7 mmol/mol)	100920	7	50,7	1,0

Alle kontrollene var akseptable. Grafer for kontrollene er vist i vedlegg 4.

Alle 360 kromatogrammene ble godkjent i forhold til kvalitetskravene. Et eksempel på kromatogram med tilhørende kromatogramverdier er vist i figur 7. Kromatogrammet viser at

Hb-derivatene er godt separert. Kromatogrammet viser en P3 topp på 6,85 areal%, noe som er innenfor grensen på 10 %, og retensjonstiden er 13,99 sekunder for HbA1c. Et utvalg av de resterende kromatogrammene er vist i vedlegg 5. For alle kromatogrammene observeres det at alle toppene er godt adskilt. Likevel ses det at kromatogrammene til prøvene med høyest HbA1c verdi har en større stigning på P3-toppen enn de med lavere verdi, noe som er forventet.

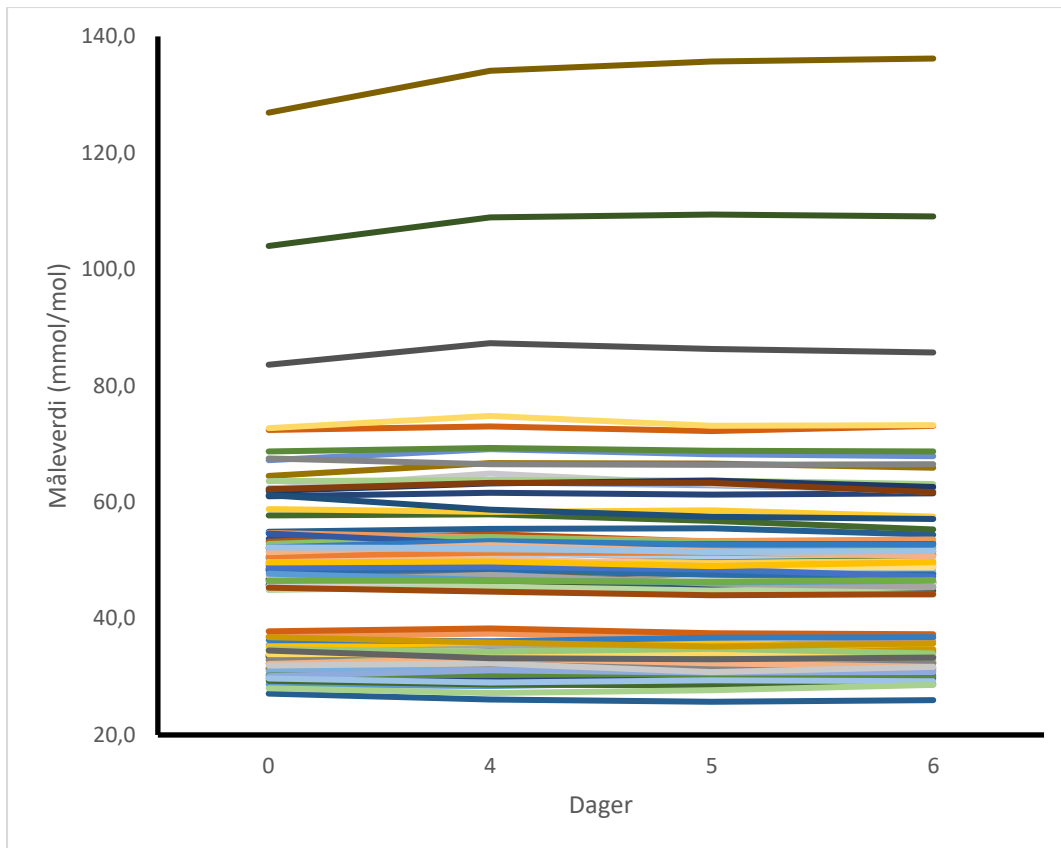


Figur 7. Eksempel på kromatogram med tabell over retensjonstid, areal og areal%, samt konsentrasjon for HbA1c.

4.2 Presentasjon av rådata

Alle resultater for analyserte prøver ble lagt inn i linjediagram, hvor utviklingen for hver enkelt prøve kan sees i forhold til tid. Det ble laget et linjediagram for alle nivåene samlet (n=90) (figur 8), samt nivåinndelte linjediagram (vedlegg 6).

Linjediagrammet viser HbA1c verdien for de ulike prøvene, gitt i mmol/mol på y-aksen, og hvor lenge prøvene var oppbevart i romtemperatur langs x-aksen. Hver enkelt linje illustrerer én enkel prøve over en tidsperiode fra dag 0 til dag 6.



Figur 8. Linjediagram for alle HbA1c målinger målt etter oppbevaring i romtemperatur (24°C) på dag 0, dag 4, dag 5 og dag 6 analysert på Bio-Rad D-100 (Diablo). Hver linje representerer verdiene for hver enkel prøve.

Figur 8 viser at HbA1c verdiene er stabile, det er lite forandring og relativt flate kurver. Samme resultat observeres for nivåinndelte plott tilgjengelig i vedlegg 6. Tre av prøvene med konsentrasjon henholdsvis 83,6 mmol/mol, 104 mmol/mol og 126,9 mmol/mol i den høye populasjonen var svært høye verdier i forhold til de resterende prøvene. Disse vurderes derfor til å ikke tilhøre populasjonen, og ble derfor ikke tatt med i videre betraktning.

Tabell 7 viser at gjennomsnittskonsentrasjonen synker fra dag 0 til dag 6 for lavt og cut-off nivå, mens for høyt nivå øker gjennomsnittskonsentrasjonen fra dag 0 til dag 4 før den igjen synker.

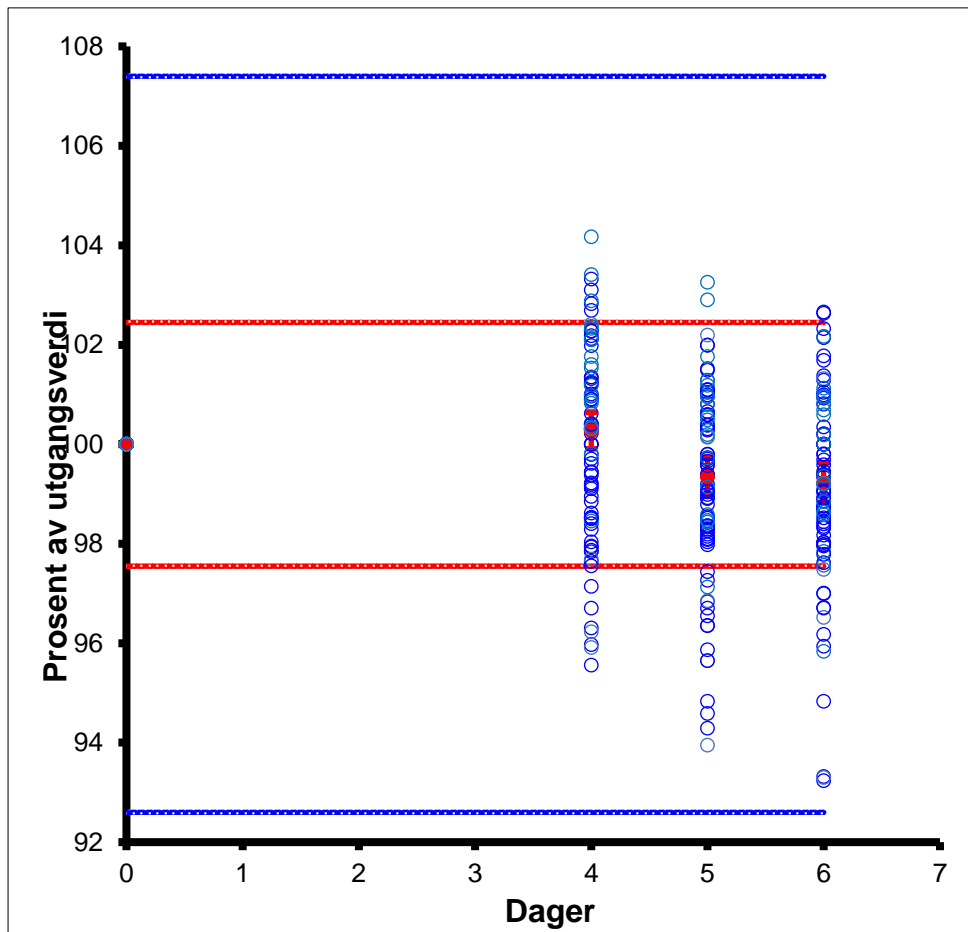
Tabell 7. Oversikt over rådata for lav, cut-off og høyt nivå av HbA1c målt på dag 0, 4, 5 og 6. De tre prøvene med svært høy konsentrasjon av HbA1c er ikke tatt med i denne tabellen. Tabellen viser gjennomsnittskonsentrasjon for prøver målt på henholdsvis dag 0, 4, 5 og 6 sammen med 95% konfidensintervall samt konsentrasjonsområde for målingene fra de respektive dagene.

Lavt nivå				
	Dag 0	Dag 4	Dag 5	Dag 6
Gjennomsnitt konsentrasjon \pm 95 KI (mmol/mol)	32,5 \pm 0,76	32,4 \pm 0,81	32,2 \pm 0,79	32,3 \pm 0,76
Konsentrasjonsområde (mmol/mol)	27,1 – 37,8	26,1 – 38,3	25,7 – 37,5	26,0 – 37,3
Antall prøver	33			
Cut-off nivå				
	Dag 0	Dag 4	Dag 5	Dag 6
Gjennomsnitt konsentrasjon \pm 95 KI (mmol/mol)	48,1 \pm 0,56	48,1 \pm 0,66	47,5 \pm 0,62	47,4 \pm 0,64
Konsentrasjonsområde (mmol/mol)	44,9 – 50,7	44,6 – 51,5	44,0 – 51,3	44,1 – 51,0
Antall prøver	27			
Høyt nivå				
	Dag 0	Dag 4	Dag 5	Dag 6
Gjennomsnitt konsentrasjon \pm 95 KI (mmol/mol)	59,2 \pm 2,0	59,7 \pm 2,1	59,1 \pm 2,12	58,7 \pm 2,13
Konsentrasjonsområde (mmol/mol)	51,4 – 72,7	51,2 – 74,8	50,7 – 73,1	50,7 – 73,2
Antall prøver	27			

4.3 Holdbarhet av HbA1c ved Batchmetoden

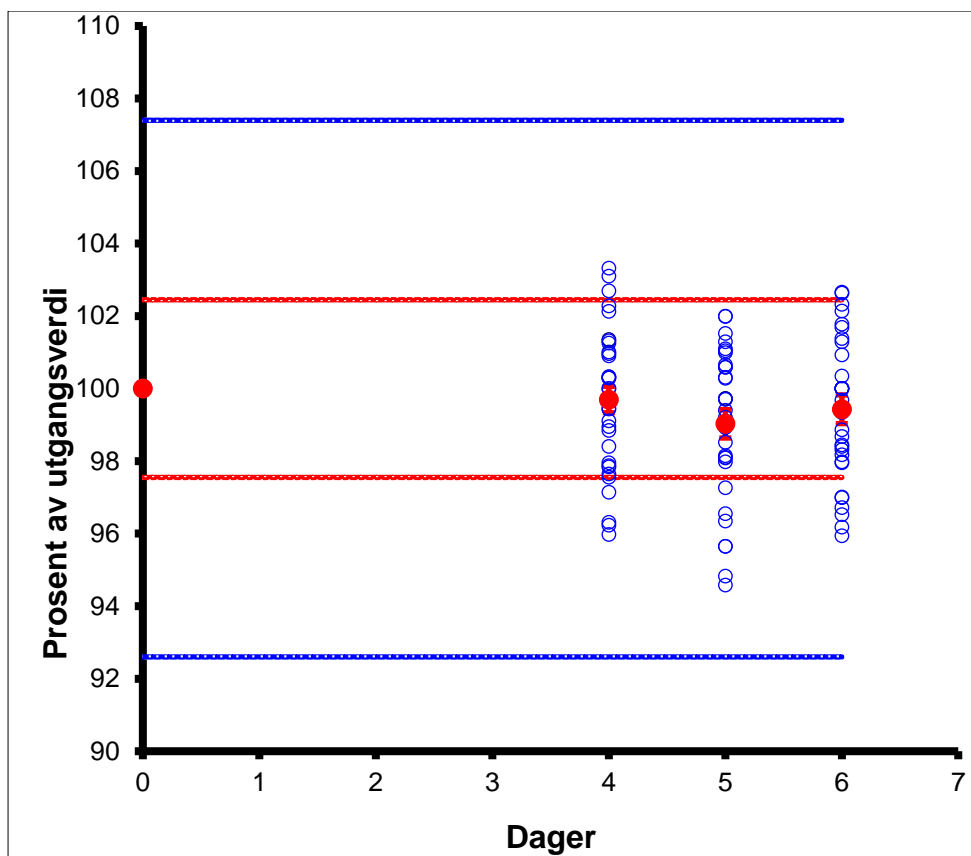
Det ble laget plott for holdbarhet av HbA1c i relativ verdi (%) for lavt nivå, cut-off og høyt nivå av HbA1c samt et plott for alle nivåene samlet. Plottene for HbA1c er vist i figur 9-12. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt, i prosent av utgangsverdi. De loddrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias. De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt totalfeil. Tid i dager er plottet langs x-aksen, mens prosent av utgangsverdi på y-aksen.

Når et plott som viser holdbarhet vurderes, foreligger det to krav. Det ene kravet er at for hver oppbevaringstid skal 95% av verdiene ligge innenfor grensene for tillatt totalfeil, og det andre kravet er at gjennomsnitt og 90% konfidensintervall skal ligge innenfor grenser for tillatt bias. (Noklus, 2015)



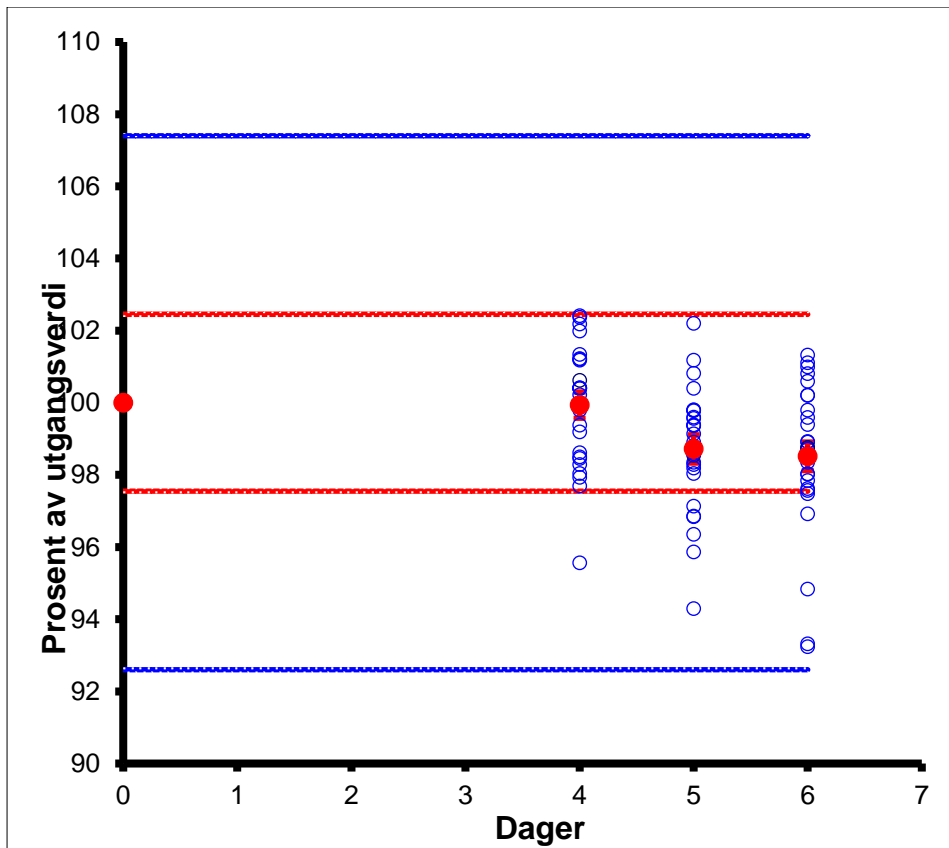
Figur 9. Holdbarhet av HbA1c for lavt, cut-off og høyt nivå. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt som prosent av utgangsverdi. De lodrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias (2,45%). De blå punktene markere enkeltverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt TE (7,4%).

Plottet i figur 9 viser en sammenstilling av alle målingene unntatt de tre høyeste målingene som ble fjernet. Gjennomsnittspunktene for samtlige dager ligger innenfor tillatt bias, men det sees en synkende tendens for dag 5 og 6. Gjennomsnittspunktene ligger innenfor tillatt bias (2,45 %), men det sees en synkende tendens for dag 5 og dag 6. Alle enkeltverdiene ligger innenfor grenser for tillatt totalfeil (7,4 %). Det er ellers god spredning på enkeltverdiene.



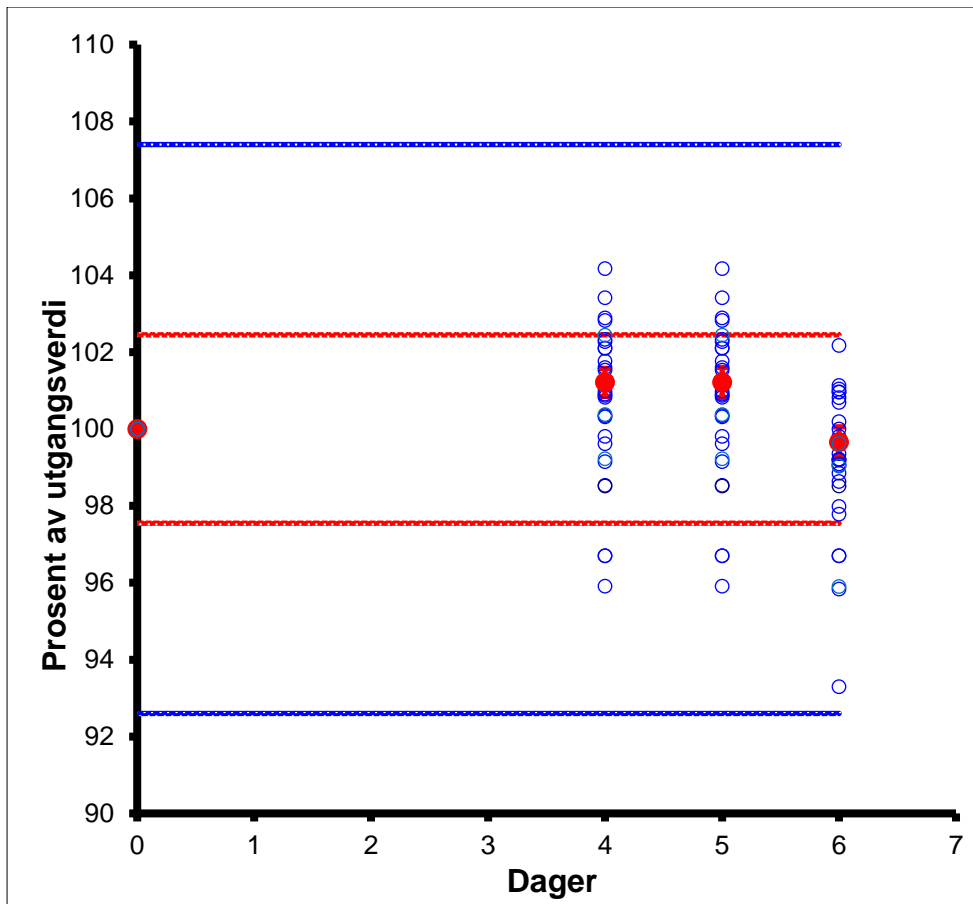
Figur 10. Holdbarhet av HbA1c i lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol). De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt som prosent av utgangsverdi. De loddrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias (2,45%). De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt TE (7,4%).

Plottet for holdbarhet av HbA1c i lavt nivå (figur 10) viser at gjennomsnitt for HbA1c verdiene på hvert tidspunkt (de røde punktene) ligger innenfor tillatt bias (2,45 %). Enkeltverdier i prosent av utgangsverdi (blå punkter) ligger innenfor tillatt totalfeil (7,4 %). Det observeres omtrent lik spredning fra nullverdien på de ulike dagene, men resultatene fra dag 5 viser en tendens til å synke mot den nedre grensen for tillatt totalfeil.



Figur 11. Holdbarhet av HbA1c i cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol). De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt som prosent av utgangsverdi. De lodrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias (2,45%). De blå punktene markere enkeltverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt TE (7,4%).

Plottet for holdbarhet av HbA1c i cut-off nivå viser at alle gjennomsnittsverdiene for HbA1c er innenfor tillatt bias (2,45 %), noe som tyder på at ikke er systematiske feil i datasettet. Ingen av enkeltverdiene ligger utenfor tillatt totalfeil (7,4 %). Det er omtrent lik spredning fra nullverdien, men det observeres at gjennomsnittsverdiene har en tendens til lavere verdier dag 5-6.



Figur 12. Holdbarhet av HbA1c i høyt nivå (51,4-72,7 mmol/mol) av HbA1c. De røde punktene viser gjennomsnitt for hvert tidspunkt som prosent av utgangsverdi. De lodrette intervallene er 90% konfidensintervall for gjennomsnittene, og området mellom de røde linjene er tillatt bias (2,45%). De blå punktene markerer enkeltverdier i prosent av utgangsverdi, og området mellom de blå linjene er tillatt TE (7,4%).

Plottet for høye HbA1c nivåer viser at alle gjennomsnittsverdiene er innenfor tillatt bias. På dette plottet er de tre høyeste rådataverdiene utelukket. Gjennomsnittspunktene for dag 4 og 5 ligger noe høyere enn nullverdien, mens gjennomsnittspunktet for dag 6 viser en tendens til å synke mot lavere grense for tillatt bias. Ingen av enkeltmålingene ligger utenfor grenser for tillatt totalfeil.

4.4 Statistiske vurderinger

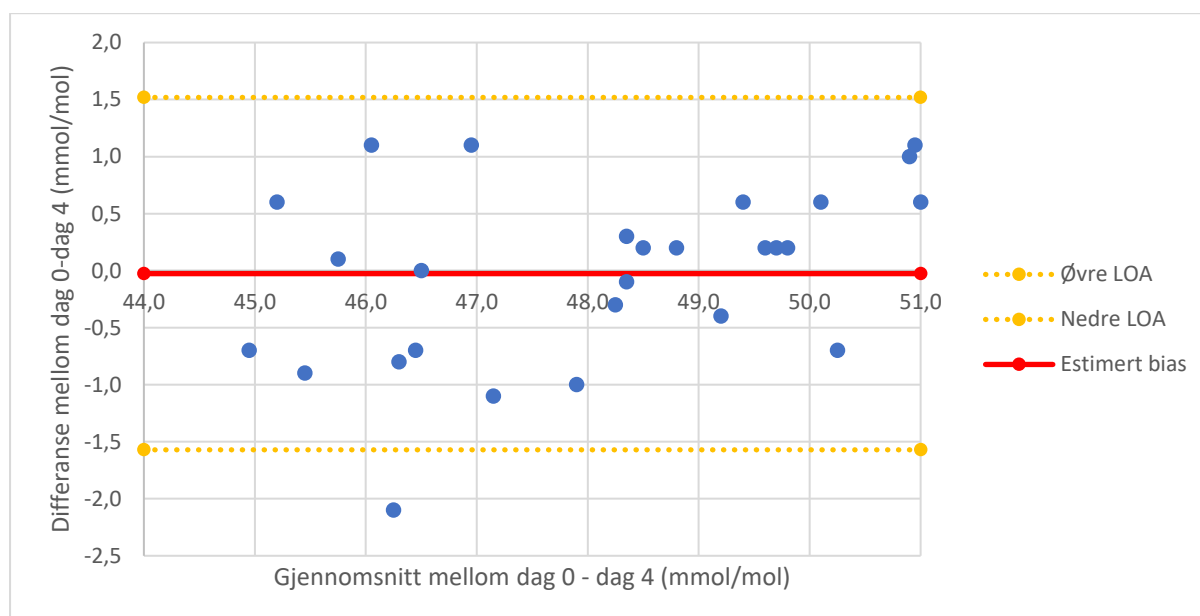
I det følgende avsnittet blir de ulike statistiske beregningene presentert. Histogrammene (vedlegg 7) viser at datasettet var tilnærmet normalt fordelt. Dette gjorde det mulig å gjennomføre flere stiske tester, som Bland Altman plott og paret t-test. Etter vurdering av datasettet ble det valgt å inndele resultatene i de tre konsentrasjonsnivåer brukt for batch-metoden. Dette ble gjort ut fra vurdering av at forutsetning for de ulike statistiske testene var oppfylt for de nevnte konsentrasjonsområder.

I den videre presentasjonen vises resultater i cut-off nivået, med tanken på at beslutningsgrense for diagnosen diabetes ligger i dette område. Resultater for de øvrige nivåene ligger som vedlegg.

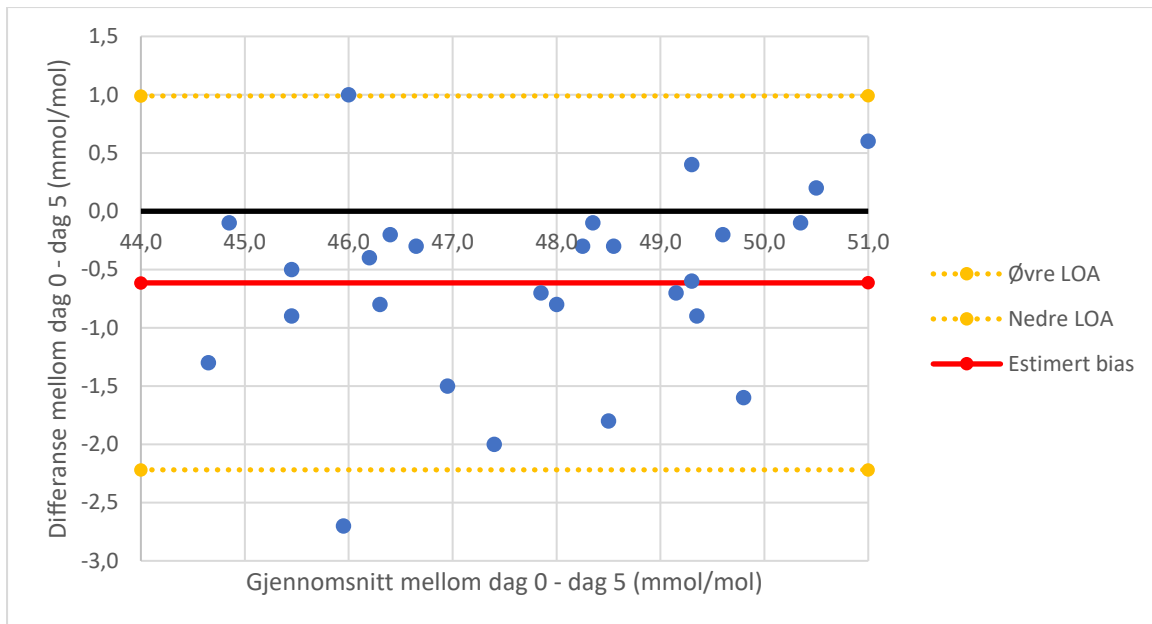
4.4.1 Bland Altman plott

Det ble utarbeidet Bland-Altman plott for å illustrere differansen i HbA1c verdi målt på henholdsvis dag 0 og 4, dag 0 og 5 samt dag 0 og 6. Til sammen ble det laget 9 Bland Altman plott, fordelt på tre ulike konsentrasjonsnivå. Se vedlegg 8-9.

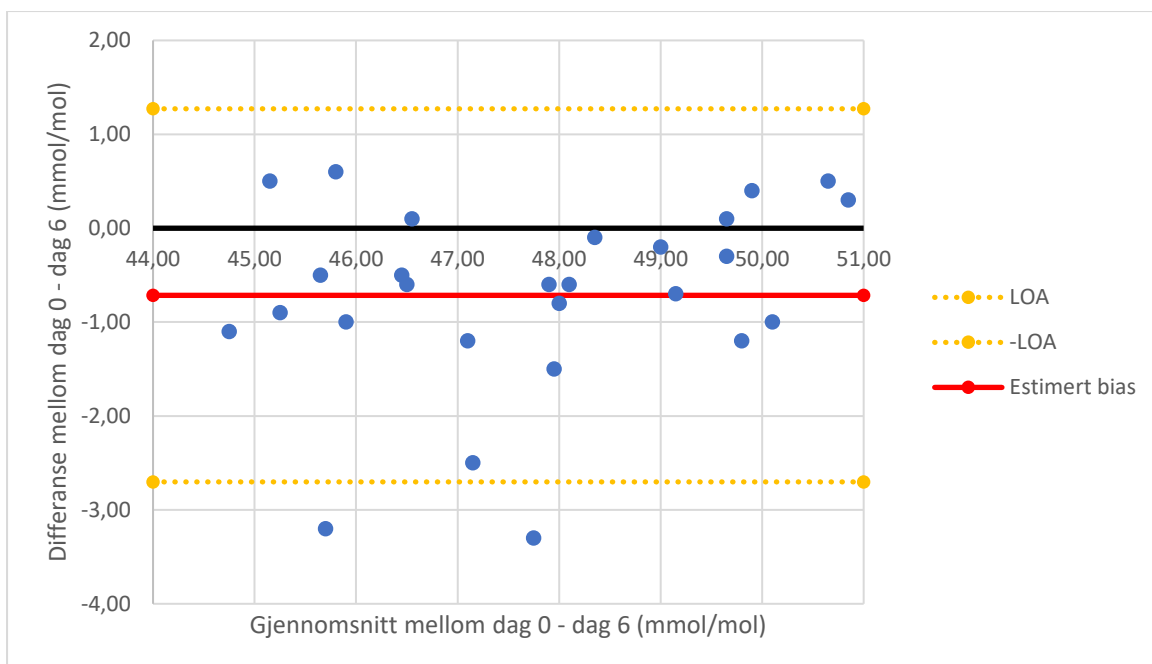
Figurene nedenfor viser Bland-Altman plottene for HbA1c verdier målt for dag 0-4, dag 0-5 og dag 0-6 for cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol).



Figur 13. Bland Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 4. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 4. Cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 1,52 mmol/mol, og nedre LOA er satt til -1,57 mmol/mol. Bias er estimert til å være 0,0 mmol/mol og ligger over 0-linjen.



Figur 14. Bland Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 5. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 5. Cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 0,98 mmol/mol, og nedre LOA er satt til -2,22 mmol/mol. Bias er estimert til å være -0,6 mmol/mol.



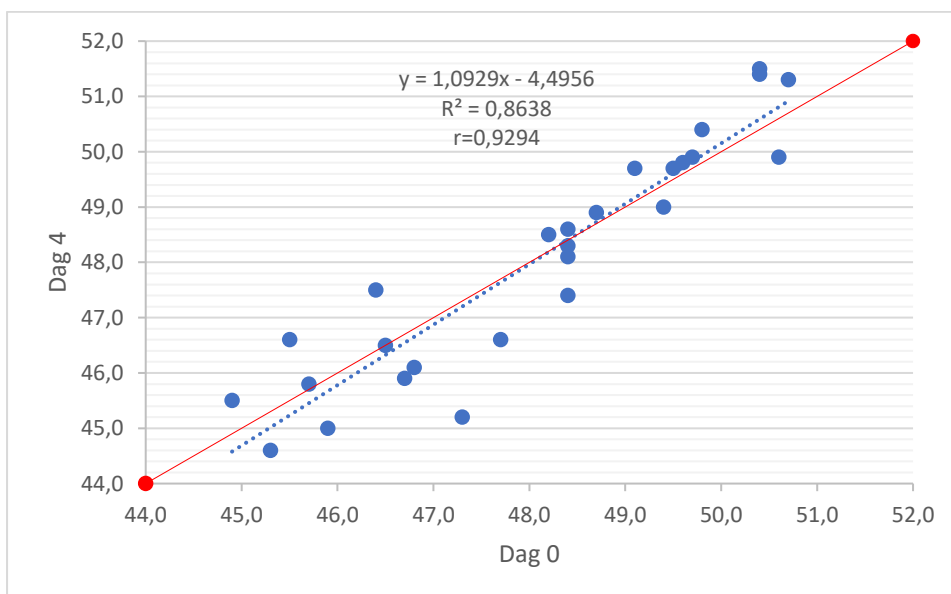
Figur 15. Bland Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 6. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 6. Cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol). Øvre LOA er 1,27 mmol/mol og nedre LOA er -2,70 mmol/mol. Bias er estimert til å være -0,71 mmol/mol.

Bland Altman plott for cut-off nivå dag 0 – 4 viser god spredning. Imidlertid observeres det at enkeltmålingene i plottene for dag 0-5 og dag 0-6 har en tendens til å legge seg mot den nedre

delen av plottet. Gjennomsnittet av differansene synker fra dag 0 (0,0 mmol/mol) til dag 6 (-0,71 mmol/mol). Dette kan indikere at det er statistiske signifikante forskjeller mellom dag 0 og 5 og dag 0 og 6 i cut-off nivå. For samtlige plott er en til to av enkeltmålingene utenfor nedre grensen for LOA.

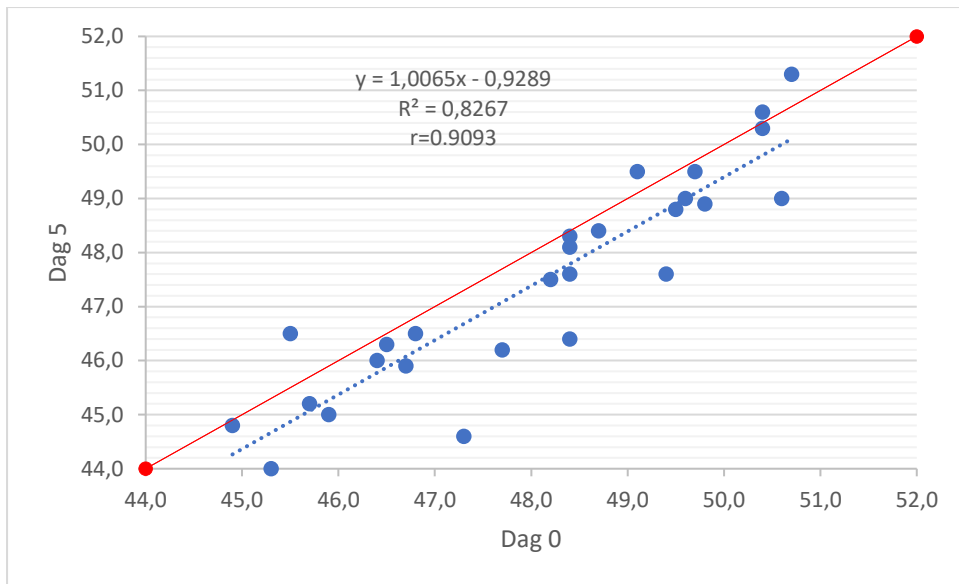
4.4.2 Regresjonsanalyse

Regresjonsanalyse ble utført for å undersøke i hvor stor grad HbA1c verdiene fra de ulike oppbevaringsbetingelse samsvarer med hverandre. Figur 16-18 viser sammenhengen mellom HbA1c verdiene på dag 0 - 4, dag 0 - 5, og dag 0 - 6 for prøver i cut-off nivået. Grafer for lavt og høyt nivå, samt alle nivå samlet vises i vedlegg 10-12. Sammenhengen mellom måleseriene er vist med blå punkter, og den blå, stiplede trendlinjen viser den lineære sammenhengen mellom de to dagene. Egalitetslinjen (rød, heltrukket linje) viser hvordan trendlinjen for måleseriene skulle vært dersom $y = x$.



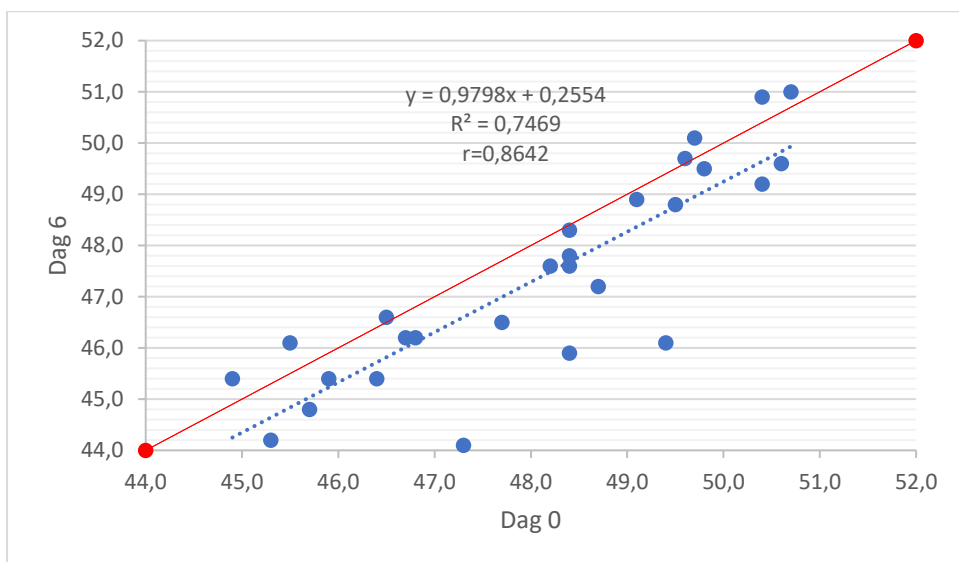
Figur 16. Regresjonsanalyse dag 0-4 for cut-off nivå for HbA1c (44,9-50,7 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

I figur 16 ses det at korrelasjonskoeffisienten $r=0,9294$. De fleste punktene er godt sentrert rundt linjen. Det er ett punkt (47,3, 45,2) som avviker mer enn de andre. Regresjonsstatistikk (vedlegg 13) viser at skjæringspunkt og stigningstall ligger innenfor konfidensintervallene. Se tabell 10.



Figur 17. Regresjonsanalyse dag 0-5 for cut-off nivå for HbA1c (44,9-50,7 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

Figur 17 viser at $r=0,9093$. De fleste punktene er godt sentrert rundt linjen. Det er noen punkter som avviker mer enn de andre. Regresjonsstatistikk (vedlegg 13) viser at skjæringspunkt og stigningstall ligger innenfor konfidensintervallene. Se tabell 10.



Figur 18. Regresjonsanalyse dag 0-6 for cut-off nivå for HbA1c (44,9-50,7 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

Figur 18 viser at $r=0,8642$. De fleste punktene er sentrert rundt linjen, men noen punkter avviker mer enn de andre. Regresjonsstatistikk (vedlegg 13) viser at skjæringspunkt og stigningstall ligger innenfor konfidensintervallene. Se tabell 10.

4.4.3 Paret t-test

Tosidig, paret t-test ble gjennomført for å undersøke om det er signifikant forskjell mellom HbA1c målt på de ulike dagene.

Hypotesene for t-testen var som følger:

H_0 : Det er ingen signifikant forskjell mellom dagene.

H_1 : Det er signifikant forskjell mellom dagene.

Tabell 8. Paret t-test for alle nivåer av HbA1c. Totalt 87 målinger for hver dag.

	Dag 0 og 4	Dag 0 og 5	Dag 0 og 6
T-observert	1,154	3,526	4,436
T-kritisk	1,988	1,988	1,988
P, tosidig	0,25	0,00	$2,70 \cdot 10^{-5}$
Konklusjon	P>0,05 t-kritisk > t-observert. H0 beholdes.	P<0,05 t-kritisk < t-observert. H0 forkastes.	P<0,05 t-kritisk < t-observert. H0 forkastes.

Resultatene av paret t-test for samtlige resultater viser at det ikke er signifikant forskjell mellom målingene mellom dag 0 og 4, men det er signifikant forskjell mellom dag 0 og 5 samt dag 0 og 6.

Det ble også utført paret t-test for de ulike konsentrasjonsnivåene. Resultat av nivåindelt paret t-test finnes i vedlegg 14.

Tabell 9. Effekt av lagring av HbA1c etter oppbevaring i romtemperatur. HbA1c verdier er analysert på dag 0, dag 4, dag 5 og dag 6 på Bio-Rad D-100 (Diablo). Tabellen viser utregning for alle 87 prøver.

Alle nivå	Dag 0	Dag 4	Dag 5	Dag 6
Gjennomsnitt (mmol/mol)	45,6	45,7	45,3	45,2
Standardavvik (mmol/mol)	11,90	12,21	12,04	11,84
Bias (%)	-	0,2	-0,8	-1,0
Paret t-test P-verdi	-	0,25	0,00	$2,70 \cdot 10^{-5}$
Regresjonsanalyse	Dag 0	Dag 4	Dag 5	Dag 6
Skjæringspunkt [konf.int]		-0,95 [-1,68 - -0,21]	-0,72 [-1,50 - 0,05]	-0,06 [-0,86 - 0,74]
Stigningstall [konf.int]		1,02 [1,01 - 1,04]	1,01 [0,99 - 1,02]	0,99 [0,97 - 1,00]

Tabell 9 viser at alle samlede parete t-test resultater viser statistisk signifikant forskjell for dag 0-5 og dag 0-6. I tillegg viser regresjonsanalysen statistisk signifikant forskjell for stigningstallet for dag 0-4, men ikke for de øvrige oppbevarings betingelsene i romtemperatur.

Tabell 10. Effekt av lagring av cut-off nivåer av HbA1c etter oppbevaring i romtemperatur. HbA1c verdier er analysert på dag 0, dag 4, dag 5 og dag 6 på Bio-Rad D-100 (Diablo).

Cut-off	Dag 0	Dag 4	Dag 5	Dag 6
Gjennomsnitt (mmol/mol)	48,1	48,1	47,5	47,4
Standardavvik (mmol/mol)	1,74	2,05	1,93	1,98
Bias (%)	-	-0,05	-1,28	1,01
Parete t-test P-verdi	-	0,87	0,00	0,00
Regresjonsanalyse	Dag 0	Dag 4	Dag 5	Dag 6
Skjæringspunkt [Konf.int]		-4,50 [-13,10- 4,10]	-0,93 [-10,06 – 8,20]	0,26 [-11,05 – 11,56]
Stigningstall [Konf.int]		1,09 [0,91 – 1,27]	1,01 [0,82 – 1,20]	0,98 [0,75 – 1,21]

Tabell 10 viser at samlede parete t-test resultater for cut-off nivå viser statistisk signifikant forskjell for dag 0-5 og dag 0-6. Regresjonsanalysen viser at det ikke er statistisk signifikant forskjell for samtlige dager.

5 Diskusjon

Diabetes mellitus (DM) er en hyppig forekommende sykdom i den norske befolkningen som diagnostiseres og følges opp behandlingsmessig med analyse av HbA1c. HbA1c er derfor en analyse som utføres i store kvanta i sykehuslaboratoriene. Siden analysen inngår i oppfølging av diabetespasienter, tas prøvene oftest i primærhelsetjenesten og blir videresendt til samarbeidende laboratorier for analysering. Seksjonen for porfyrianalyser ved MBF har ikke mulighet til å kontrollere hvilke betingelser prøvene blir oppbevart i lokalt på legekantor eller under transport, selv om det forsøkes å få dette standardisert. Standardisering av forhold ved oppbevaring og transport fra legekantor til sykehuset kan være en utfordring. Normalt skjer denne transporten ved romtemperatur. Seksjonen for porfyrianalyser ved MBF har ikke

mulighet til å kontrollere ved hvilke betingelser prøvene blir oppbevart lokalt på legekantor eller under transport. Dog viste tidligere studier av Rohlfing et.al og Niazipour et. al. at oppbevaring av prøvene i kjøleskap gav best holdbarhet av HbA1c.

MBF oppgir at holdbarheten til HbA1c er fire dager i romtemperatur (Helse Bergen, 2020). Utover fire dager må prøvene fryses ned på -80 °C eller kaldere dersom det tar lengre tid å få disse analysert, noe som kan by på problemer i ferier og helger. Det er derfor viktig å utføre lokale forsøk på holdbarhet. I dag har de ulike universitetssykehusene i Norge satt sine egne grenser for holdbarhet av HbA1c, og disse varierer med både analyseinstrument og analyseprinsipp. For eksempel bruker MBK Ullevål og MBF på HUS samme instrument og analyseprinsipp, men har satt holdbarheten til henholdsvis 5 og 4 dager i romtemperatur.

I dette prosjektet ble konsentrasjonen av HbA1c målt etter at prøvene hadde blitt oppbevart i romtemperatur (24°C) i henholdsvis 0, 4, 5 og 6 dager før de ble frosset ned. Alle prøvene ble tint og analysert på samme dag på Bio-Rad D-100.

Samtlige kontroller i analyseperioden var akseptable. Alle kromatogrammene viste god separasjon av komponentene og ble godkjent. Noen enkeltmålinger med høy konsentrasjon av HbA1c har en noe forhøyet P3-topp, men alle var innenfor kravet på 10 %. Det var derfor ikke nødvendig å forkaste noen prøver på bakgrunn av dårlig analysekvalitet.

Resultatene viser at HbA1c målingene hovedsakelig holder seg på et stabilt nivå, men har en tendens til å avta ved oppbevaring i romtemperatur over flere dager.

5.1 Vurdering av holdbarheten – Batch metoden

Batch metoden som er brukt i denne studien er beskrevet i et nasjonalt prosjekt for standardisering av holdbarhetsstudier (Noklus, 2015). Her er avviksgrenser for enkeltmålinger satt til 100 % ± tillatt totalfeil. Grenser for gjennomsnittsendringer er satt til 100 % ± tillatt bias. I dette prosjektet ble tillatt bias og tillatt total feil for HbA1c satt til henholdsvis 2,45% og 7,4%.

Plottet for HbA1c holdbarhet i relativ verdi (%) for alle HbA1c målingene vist i figur 9 og tabell 7 viser generelt en synkende trend for gjennomsnittsverdiene. Alle verdiene for både gjennomsnitt og enkeltmålinger er innenfor de fastsatte grensene for tillatt bias og tillatt total

feil. Det observeres variasjon i gjennomsnittsverdi mellom dagene på alle plottene. Labilt HbA1c kan være årsak til at konsentrasjonen av analytten synker og kan føre til at gjennomsnittsverdier viser synkende trend. Våre resultater viser at holdbarhetskriteriene er oppfylt, og at EDTA-blod til analyse av HbA1c i EDTA-blod er holdbart i 6 dager i romtemperatur (24°C).

5.2 Statistiske beregninger for vurdering av holdbarhet

Normalfordeling av datasettet ble vurdert ved hjelp av histogrammer (vedlegg 7). For utarbeiding av disse ble ikke de tre høyeste målingene tatt med. Histogrammene kan fremstå noe forskjøvet i forhold til normalfordelingen, men forskyvningen vurderes i dette tilfelle til å være av liten betydning, og datasettet blir sett på som tilnærmet normalfordelt.

Bland-Altman plott ble brukt for å visualisere forholdet mellom to oppbevaringsbetingelser. Akseptable grenser ble definert på forhånd ved å bruke *limits of agreement* (LOA).

Samtlige Bland-Altman plott viser spredning av differansene med et negativt gjennomsnittsavvik. Tolkning av plottene viser at avviket er tilnærmet konstant, og ikke konsentrasjonsavhengig.

Den estimerte bias verdi for alle dager (tabell 9) ligger innenfor kravet som er satt for batch metoden (tillatt bias=2,45%). I tillegg ligger 95% av alle målingene innenfor tillatte grenser for LOA, med unntak av Bland Altman plott for dag 0-6, hvor 7% av målingene ligger utenfor LOA. Dette tilfredsstiller ikke kravet om at kun 5% bør ligge utenfor grenser for tillatt LOA. Disse målingene burde derfor blitt testet som slengere. Det ble imidlertid ikke utført statistiske tester for å finne ut av dette. Ut ifra plottene for dag 0-5 og dag 0-6 observeres det at differansene har en tendens til å legge seg mot den nedre grensen for LOA, noe som kan indikere statistiske avvik.

Regresjonsanalysene for hele datasettet påviser statistisk signifikant avvik for målingene mellom dag 0 og 4, men ikke for de øvrige dagene. Regresjonsanalyse for de enkelte konsentrasjonsnivåene viste ingen statistisk signifikant avvik for målingene mellom dag 0 og de øvrige dagene (tabell 9). For cut-off nivå dag 0-4 ses det at regresjonslinjen ligger tett på egalitetslinjen. For dag 0-5 og dag 0-6 viser regresjonslinjen en synkende trend. Dette

samsvarer med Bland-Altman-plottene der det ses at punktene for dag 0-5 og dag 0-6 legger seg lavere enn for dag 0-4. Dette er sammenfallende med tolkningene av Bland-Altman plott.

Korrelasjonskoeffisienten r til regresjonsplottene for cut-off nivå viser at sammenhengen mellom punktene for dag 0-4 ($r=0,9294$), dag 0-5 ($r=0,9093$) og dag 0-6 ($r=0,8642$) er relativt god, men med synkende verdier fra dag 0-4 til dag 0-6. Dette sammen med endring i gjennomsnittsavvik tyder på at oppbevaring i romtemperatur påvirker prøvematerialet, men ikke i så stor grad at det påvises en statistisk signifikant forskjell.

Paret t-test ble utført både på samlet datasett og på nivåinndelte konsentrasjonsområder. Ved undersøkelse av samlet datasett ses det en statistisk signifikant forskjell på både dag 0-5 og dag 0-6, men at det ikke er statistisk signifikant forskjell mellom dag 0-4.

Dersom en derimot ser på paret t-test som er nivåinndelt, sees det at på lavt nivå av HbA1c er det ikke signifikant statistisk forskjell mellom dag 0-4 og dag 0-6. Likevel er det signifikant statistisk forskjell mellom dag 0 og 5. Dette stemmer overens med beregnet bias i tabell 9, hvor gjennomsnittsavvik er større for dag 0-5 enn de øvrige dagene.

Paret t-test på cut-off nivå av HbA1c viste ikke statistisk signifikant forskjell mellom dag 0-4. For dag 0-5 og dag 0-6 forkastes nullhypotesen, og det påvises statistisk signifikant forskjell. Også her viser Bland-Altman plottene den synkende trenden.

For høyt nivå viste paret t-test at det er statistisk signifikant forskjell mellom dag 0-4, men ikke mellom de resterende dagene. Dette styrker det som er blitt observert i Bland Altman plottene for dette nivået.

Samlet statistisk vurdering av datasett viser at resultatene av regresjonsanalyse og paret t-test ikke er helt sammenfallende. Regresjonsanalysen for hele datasettet påviste statistisk signifikant avvik. For de oppdelte nivåene viste regresjonsanalysen ingen statistisk signifikant forskjell for de ulike oppbevaringsbetingelsene, selv om visuell inspeksjon av sammenligning av regresjonslinje og egalitetslinje viste en forskjell. Paret t-test som benyttes ved parallell analysing av et materiale, viste at det er statistisk signifikant for flere av lagringsbetingelsene. Forutsetning for å kunne benytte seg av paret t-test er at det ikke forekommer konsentrasjonsavhengige avvik mellom datasettene ved de ulike oppbevaringsbetingelsene. Dette ble kun vurdert ved visuell inspeksjon av Bland-Altman

plott, og kan være en svakhet. På grunn av dette kan regresjonsanalysen ha størst betydning i vurdering av resultatene.

En tidligere studie utført av Rohlfing et al. (2012) samt holdbarhetsstudien utført ved Avdeling for medisinsk biokjemi i Ålesund (Noklus, u.d.) viser at HbA1c er holdbar i 4 dager i romtemperatur når det måles på instrumentene Bio-Rad Variant II NU og Bio-Rad D-100. Begge instrumente benytter ionebytterkromatografi som analyseprinsipp. Samme studie viser også at ved bruk av instrumentene Tosoh G7 og Tosoh G8 (ionebytterkromatografi) er holdbarheten til HbA1c 6 dager i romtemperatur. Resultatene i studien gjennomført i forbindelse med dette prosjektet er dermed i samsvar med tidligere studier.

Batch-metoden gir ikke sammenfallende tolkning med de statistiske testene. Dette skyldes ulike forutsetninger. Batch metoden setter grenser til tillatt bias og tillatt totalfeil ut ifra biologisk variasjon, mens statistiske tester setter grenser ut fra datamaterialet og gjeldende statistiske regler.

Ved å se på trendene i de to ulike tilnærmingene observeres det en gjennomsnittlig synkende endring i konsentrasjon ved lengre oppbevaring i romtemperatur. Dette er vist i Bland-Altman plott og regresjonsplott. Det samme observeres igjen i plottet for holdbarhet i relativ verdi utarbeidet ved hjelp av Batch metoden, både for samlet datasett og for de ulike nivåene. Det er heller ikke slik at enhver statistisk signifikant forskjell har en klinisk betydning. Dette må imidlertid vurderes av brukeren av analyseresultatene, klinikerens.

5.3 Begrensninger ved studien

For å ha styrket studiet kunne eventuelt flere målinger i høyt nivå som dekket verdiene til de utelatte prøvene. Dette ville forsikret at disse også er holdbare i opptil 6 dager. Imidlertid er minste kravet for antall for holdbarhetsstudier satt til 20 prøver i de nasjonale føringene for holdbarhetsforsøk, og i dette tilfellet er dette antallet nådd for både lavt, cut-off og høyt nivå av HbA1c.

Normalfordeling av datamaterialet ble estimert vha. histogrammer. Det burde imidlertid ha blitt utført en Shapiro-Wilk test for å bekrefte eller avkrefte resultatet fra disse. Dette ble ikke utført pga. mangel på passende programvare. Det burde også ha blitt utført en Grubbs test for å undersøke om de få avvikende differansene i Bland-Altman plottene var slengere. Videre

hadde det vært interessant å utvide studien til å omfatte flere dager for å se om holdbarheten kan økes ytterligere.

6 Konklusjon

Holdbarheten for analyse av prøvematerialet til HbA1c er i dag satt til 4 dager i romtemperatur ved Seksjon for porfyrianalyser hvor ionebytterkromatografi benyttes til analysering. Holdbarhetsstudien ble utført for å se om dette kunne utvides til 5 eller 6 dager, for å eventuelt kunne lette på logistiske utfordringer i den daglige rutinen.

Rådata antyder at HbA1c i EDTA-blod er holdbart i romtemperatur (24°C) i opptil 6 dager, og kromatogrammene viser lite tegn til nedgradering. Batch-metoden viste at gjennomsnittsverdiene og konfidensintervallene for de ulike oppbevaringstidene ligger innenfor tillatt bias (2,45%), og alle enkeltmålingene ligger innenfor tillatt totalfeil (7,4%).

De statistiske testene påviste signifikant forskjell mellom enkelte nivåer på ulike dager. De to tilnærmingene har ulike forutsetninger.

Statistisk signifikant forskjell funnet med statistiske tester motstrider ikke nødvendigvis resultatene fra Batch-metoden. Dette skyldes at den statistisk signifikante forskjellen ikke er stor nok til å havne utenfor grensene som er satt for Batch-metoden. Den statistiske signifikante forskjellen må vurderes opp mot klinisk signifikans. Dette er imidlertid opp til klinikere å avgjøre.

7 Definisjoner og forkortelser

BFI – Bioingeniørfaglig Institutt

Bias – systematisk avvik som gir en gjennomsnittsverdi av mange målinger som avviker fra den sanne verdi

CV – Variasjonskoeffisient, uttrykker variasjon i forhold til middeltallet i prosent

DM - Diabetes Mellitus

EFLM – European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

EKV – Ekstern kvalitetsvurdering

HbA1c – Glykert hemoglobin, langtidsglukose

HPLC – High performance liquid chromatography

HUS – Haukeland Universitetsjukehus

HVL – Høgskolen på Vestlandet

Interferens – Systematisk feil som skyldes påvirkning av en annen komponent i prøven enn den som skal måles

LOA – Limits of agreement

Konf.int – Konfidensintervall

MBF – Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi

NKK – Norsk klinisk-kjemisk kvalitetssikring

Noklus - Norsk kvalitetsforbedring av laboratorievirksomhet

NSMB – Norsk selskap for medisinsk biokjemi

Referanseverdi – Kvantitativ verdi for en referansem metode med liten måleusikkerhet

SD – Standardavvik, viser hvor stor spredning (variasjon) det er i et utvalg

Slenger – Verdi- verdi som avviker vesentlig fra øvrige verdier i datasettet

TE – Totalfeil, kombinasjon av systematisk og tilfeldig feil

8 Referanser

- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(Supplement 1), S81. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- American Diabetes Association. (2021). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*, 44(Supplement 1), S15. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
- Aryal, S. (2018). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). I. Hentet fra <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
- Bertelsen, B. I. (2011). *Patologi : menneskets sykdommer* (2. utg. utg.). Oslo: Gyldendal akademisk.
- Bio-Rad. (u.d.-a). Analyseprinsipp D-100.
- Bio-Rad. (u.d.-b). D-100™ HbA1c Bruksanvisning.
- Bio-Rad. (u.d.-c). D-100™ Hemoglobin Testing System Brukerhåndbok
- Bolann, B. J. & Åsberg, A. (2020). *Riktig svar på biokjemiske analyser: Praktisk veileder i kvalitetskontroll for medisinske laboratorier*. Oslo: Cappelen Damm AS.
- Clark, S. L. D., Santin, A. E., Bryant, P. A., Holman, R. W. & Rodnick, K. J. (2013). The initial noncovalent binding of glucose to human hemoglobin in nonenzymatic glycation. *Glycobiology*, 23(11), 1250-1259. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt061>
- EFLM. (u.d). EFLM Biological Variation. Hentet 1.mars 2021
- Fellesorganet for REK. (2011). Kjennetegnet som REK bør observere i spørsmål om kvalitetssikring vs. fremleggingspliktige prosjekter. I *Tilråding fra Fellesorganet for REK (FREK)*. Hentet fra <https://helseforskning.etikkom.no/Content/275633/Kvalitetssikring%20vs%20framleggingspliktig%20prosjekt%20FREK%20des%202011.pdf>
- Fraser, C. G. (2001). *Biological variation: From principles to practice*. Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry.
- Gallagher, E. J., Le Roith, D. & Bloomgarden, Z. (2009). Review of hemoglobin A1c in the management of diabetes. *Journal of Diabetes*, 1(1), 9-17. <https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2009.00009.x>
- Giavarrina, D. (2015). Understanding Bland Altman analysis. I. Zagreb: Biochemica Medica. Hentet fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470095/>
- Gupta, M., Thalquatra, M. & Rao, P. (2016). P3 Fraction: Effect on HbA1c Values by HPLC. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 10(9), BC12-BC14. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/21092.8451>
- Hagve, T.-A. & Berg, J. P. (2019). *Klinisk biokjemi og fysiologi* (6. utg.). Oslo: Gyldendal Norsk Forlag.
- Harris, D. C. (2016). *Quantitative chemical analysis* (9. utg.). New York: Freeman.
- Helbæk, M. (2001). *Statistikk for Kjemikere* Trondheim: Tapir Akademisk Forlag.
- Helse Bergen. (2020). HbA1c. Hentet 13.januar 2021 fra <https://analyseoversikten.no/analyse/260>
- Helse Stavanger. (2020). HbA1c, glykolyisert hemoglobin. Hentet 18.februar 2021 fra https://labhandbok.sus.no/docs/doc_17541/index.html
- Helsedirektoratet. (2012). HbA1c som diagnostikum for diabetes. Hentet 27.januar 2021 fra <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/diabetes/diagnostikk-av-diabetes-risikovurdering-og-oppfolging-av-personer-med-hoy-risiko-for-a-utvikle-diabetes/diagnostiske-kriterier-for-diabetes/blodproven-hba1c-som-diagnostikum-for-diabetes-brev-2012.pdf/> /attachment/inline/fa34811d-a683-4b35-887d-

- [a009e0def875:5185c506ef7c21f4390ada9fb536ef1efded8bd7/blodproven-hba1c-som-diagnostikum-for-diabetes-brev-2012.pdf](https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/diabetes#referere)
- Helsedirektoratet. (2020). Nasjonal faglig retningslinje for diabetes. Hentet fra <https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/diabetes#referere>
- Helseforskningsloven. (2008). Lov om medisinsk og helsefaglig forskning (LOV-2008-06-20-44). Hentet fra <https://lovdata.no/dokument/NL/lov/2008-06-20-44>
- Nasjonal selskap for medisinsk biokjemi. (2020). HbA1c, B. Hentet 2021 21.januar fra <https://brukerhandboken.no/index.php?action=showtopic&topic=51abaf1eeed958d691b4&highlight=true>
- National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). (2019). Factors that Interfere with HbA1c Test Results. Hentet 9.februar 2021 fra <http://www.ngsp.org/factors.asp>
- Niazpour, F., Bandarian, F., Esfahani, E., Ebrahimi, R., Abdollahi, M. & Razi, F. (2019). The Effect of Blood Sample Storage Conditions on HbA1c Concentration. *Clinical Laboratory*, 65. <https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2019.190114>
- Noklus. (2015). Nasjonalt prosjekt for standardisering av holdbarhetsforsøk. Hentet 20.februar 2021 fra https://www.noklus.no/media/3wsftsfz/22_holdbarhet-protokoll_hvordan-utføre-holdbarhetsforsok.pdf?fbclid=IwAR2VkJMnhjZhRRHmQ9JPr3xGjn5LyLPy5Fvp-JupUOzcVCQ673gSrYXKZe_k
- Noklus. (u.d.). Holdbarhetsdatabase. Hentet 18.februar 2021 fra <https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/holdbarhetsdatabase/>
- Norsk Senter for Forskningsdata. (u.d.). Om NSD - Norsk Senter for Forskningsdata. Hentet 02.mars 2021 fra <https://www.nsd.no/om-nsd-norsk-senter-for-forskningsdata/>
- Oslo Universitetssykehus. (2020a). HbA1c (hemoglobin A1c, glykert hemoglobin). Hentet 2021 18.februar fra <https://ehandboken.ous-hf.no/document/105636>
- Oslo Universitetssykehus. (2020b). Mål for analysekvalitet, MBK. Hentet 12.mars 2020 fra <https://ehandboken.ous-hf.no/document/35624>
- Panteghini, M., Ceriotti, F., Jones, G., Oosterhuis, W., Plebani, M., Sandberg, S. & on behalf of the Task Force on Performance Specifications in Laboratory Medicine of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory, M. (2017). Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(12), 1849-1856. <https://doi.org/doi:10.1515/cclm-2017-0772>
- Rohlfing, C. L., Hanson, S., Tennill, A. L. & Little, R. R. (2012). Effects of whole blood storage on hemoglobin a1c measurements with five current assay methods. *Diabetes technology & therapeutics*, 14(3), 271-275. <https://doi.org/10.1089/dia.2011.0136>
- Schwettmann, L., Berg, J. P. & Sandberg, S. (2018). HbA1c skal angis i mmol/mol. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, (15). <https://doi.org/doi:10.4045/tidsskr.18.0633>
- St. Olavs Hospital. (u.d.). Glykert hemoglobin. Hentet 23.mars 2021 fra https://data.stolav.no/labhandboker/Medisinsk_biokjemi/ask/TestFinder.html
- Universitetssykehuset Nord-Norge. (2020). HbA1c. Hentet 23.mars 2021 fra <https://labhandbok.unn.no/medisinsk-biokjemi/hba1c-article1962-816.html>
- Vikøren, T. B., Berg, J. P. & Berg, T. J. (2014). Feilkilder ved bruk av Hemoglobin A1c. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 134(22). <https://doi.org/doi10.4045/tidsskr.14.0172>

- Westgard QC. (u.d.). Desirable Biological Variation Database specifications. Hentet 01.mars 2021 fra <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
- Weykamp, C. (2013). HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Annals of laboratory medicine*, 33(6), 393-400. <https://doi.org/10.3343/alm.2013.33.6.393>
- Weykamp, C., John, W. G. & Mosca, A. (2009). A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. *Journal of diabetes science and technology*, 3(3), 439-445. <https://doi.org/10.1177/193229680900300306>
- Witczak, O. & Haugen, T. B. (2014). Glykert eller glykosylert? *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 134(22). <https://doi.org/10.4045/tidsskr.14.0172>
- World Health Organization. (2019). Classification of diabetes mellitus. I: World Health Organization. Hentet fra <https://apps.who.int/iris/handle/10665/325182>
- Åsberg, A., Solem, K. B. & Mikkelsen, G. (2011). Prøvematerialets holdbarhet - kriterier og vurderinger. *Klinisk Biokemi i Norden*, 4.

9 Vedlegg

Vedlegg 1: Forespørsel om prosjektdeltakelse på Canvas

Vedlegg 2: Informasjonsskriv til deltakere ved innsamling av prøver

Vedlegg 3: Tabell over måleresultater for HbA1c

Vedlegg 4: Grafer for kontroller målt 23.02.21

Vedlegg 5: Kromatogrammer

Vedlegg 6: Nivådelte linjediagram for endring av HbA1c-verdi ved ulike oppbevaringstider

Vedlegg 7: Histogrammer for normalfordeling

Vedlegg 8: Bland-Altman plott lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol)

Vedlegg 9: Bland-Altman plott høyt nivå (51,4-72,7 mmol/mol)

Vedlegg 10: Regresjonslinje alle nivå (27,1-72,7 mmol/mol)

Vedlegg 11: Regresjonslinje lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol)

Vedlegg 12: Regresjonslinje høyt nivå (51,4-72,7 mmol/mol)

Vedlegg 13: Regresjonsstatistikk cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol)

Vedlegg 14: Paret t-test

Vedlegg 1: Forespørsel om prosjektdeltakelse på Canvas

"Hei!

Vi er en gruppe tredjeårsstudenter som skal skrive bachelor. Oppgaven er å utføre en holdbarhetsstudie på HbA1c, og den forbindelse trenger vi frivillige som kan gi en blodprøve. Vi trenger både diabetikere og friske frivillige. All informasjon vil bli anonymisert, og det vil ikke være mulig å spore resultatene tilbake til personer som deltar. Deltakerne vil derfor heller ikke få tilgang til resultatene sine. Prøvetakingen vil foregå torsdag 28. og fredag 29. januar, enten på HVL eller HUS. Dersom det er nødvendig, vil det også tas prøver torsdag og fredag uken etter. Det vil bli brukt munnbind under prøvetakingen. Vi håper det er mange som vil være med å hjelpe oss med dette. Send mail til martheostebo@hotmail.com<<mailto:martheostebo@hotmail.com>> om du ønsker å være med, eller om du har spørsmål av noe slag.

Hilsen Oliwia, Madeleine og Marthe"

Vedlegg 2: Informasjonsskriv til deltakere ved innsamling av prøver

FORESPØRSEL OM DELTAKELSE I FORSKNINGSPROSJEKT

HbA1c holdbarhetsforsøk

Bakgrunn og formål:

Holdbarheten til HbA1c i EDTA -blod er metodeavhengig og påvirkes både av tid og temperatur. Avdeling for medisinsk biokjemi og farmakologi (MBF) ønsker å gjøre en holdbarhetsstudie i romtemperatur for å undersøke om prøvene kan oppbevares lenger enn de fire dagene som er vi har som grense i dag. Dersom holdbarheten kan økes vil det forenkle prøvehåndteringen ved langhelg/ferieavvikling.

Prosjektet foregår på MBF på Haukeland Universitetssjukehus/ Høgskulen på Vestlandet (HVL), Bergen. Prosjektet er et bachelorprosjekt ved HVL, som gjennomføres for ekstern oppdragsgiver (MBF).

Hva innebærer deltakelse i prosjektet?

Det vil bli tappet fire EDTA rør (8 ml) for å måle HbA1c. Du vil ikke få tilgang til analyseresultatet fordi alle prøvene anonymiseres. Prosjektet er frivillig og deltagerne vil forbli anonyme, samtykket kan derfor ikke trekkes tilbake. Prøvematerialet vil destrueres etter analysering, og vil ikke benyttes til andre formål.

Takk for din deltakelse

Vedlegg 3: Tabell over måleresultater for HbA1c

Tabell 11: Alle måleresultat fra analysering av HbA1c på Bio-Rad D-100.

	Tid 0	Tid 1	Tid 2	Tid 3
Dager	0	4	5	6
Prøve nr	Målte verdier			
1	31,4	30,9	29,7	30,2
2	31,6	31,6	31,0	31,5
3	35,5	35,3	35,4	36,1
4	28,7	28,4	29,0	28,8
5	35,1	35,9	35,8	34,7
6	32,3	31,0	32,0	32,6
7	29,7	30,0	29,1	29,7
8	33,7	33,4	33,2	34,3
9	33,5	33,6	33,3	32,4
10	31,3	31,4	30,7	30,8
11	27,1	26,1	25,7	26,0
12	29,3	28,7	28,5	28,7
13	30,4	30,4	30,6	31,2
14	36,9	37,4	36,8	36,7
15	33,3	33,6	33,0	32,3
16	32,4	31,7	31,8	32,4
17	31,0	31,3	31,4	31,4
18	32,9	33,6	33,4	32,9
19	33,4	34,3	33,6	33,4
20	37,8	38,3	37,5	37,3
21	32,9	32,2	31,7	32,3
22	33,8	33,9	33,7	34,7
23	36,3	36,1	36,7	36,8
24	30,2	30,3	30,5	30,0
25	30,1	31,1	30,7	30,8
26	32,2	33,2	32,3	31,7
27	31,9	32,3	30,8	31,7
28	33,9	33,8	34,1	33,9
29	29,7	29,0	29,4	29,2
30	28,0	27,2	27,7	28,6
31	46,7	45,9	45,9	46,2
32	49,1	49,7	49,5	48,9
33	45,7	45,8	45,2	44,8
34	48,4	48,1	47,6	47,8
35	45,9	45,0	45,0	45,4
36	46,8	46,1	46,5	46,2
37	48,4	48,3	48,3	47,6
38	50,4	51,4	50,3	49,2

Normale verdier
Middels verdier
Høye verdier

39	47,3	45,2	44,6	44,1
40	49,7	49,9	49,5	50,1
41	48,4	48,6	48,1	48,3
42	34,7	34,3	34,8	34,0
43	53,7	53,9	51,6	51,5
44	53,2	54,5	53,2	53,0
45	48,4	47,4	46,4	45,9
46	49,4	49,0	47,6	46,1
47	48,2	48,5	47,5	47,6
48	50,4	51,5	50,6	50,9
49	50,6	49,9	49,0	49,6
50	49,8	50,4	48,9	49,5
51	45,5	46,6	46,5	46,1
52	49,5	49,7	48,8	48,8
53	51,6	51,2	50,7	51,1
54	44,9	45,5	44,8	45,4
55	48,7	48,9	48,4	47,2
56	50,7	51,3	51,3	51,0
57	46,4	47,5	46,0	45,4
58	49,6	49,8	49,0	49,7
59	47,7	46,6	46,2	46,5
60	46,5	46,5	46,3	46,6
61	61,0	61,6	61,3	61,5
62	45,3	44,6	44,0	44,2
63	34,5	33,2	33,0	33,3
64	64,5	66,7	66,6	65,9
65	54,9	55,4	55,5	54,4
66	57,7	57,9	56,8	55,3
67	67,2	69,1	68,2	67,9
68	54,7	53,9	53,3	53,6
69	52,1	51,9	51,6	52,0
70	58,8	58,3	58,6	57,5
71	52,1	52,9	52,6	52,2
72	52,8	54,0	53,0	52,3
73	54,6	52,8	52,8	52,8
74	72,4	73,0	72,2	73,1
75	67,5	66,5	66,4	66,5
76	36,8	35,9	35,2	35,7
77	52,2	53,3	52,7	52,7
78	68,7	69,3	68,8	68,7
79	62,4	63,4	62,9	62,0
80	51,4	52,6	51,5	50,7
81	62,3	64,9	63,1	61,8
82	72,7	74,8	73,1	73,2

83	52,2	52,1	51,4	51,6
84	63,6	63,8	63,7	63,1
85	61,9	63,2	63,7	62,6
86	62,2	63,3	63,3	61,7
87	83,6	87,3	86,3	85,7
88	126,9	134,1	135,7	136,2
89	61,2	58,7	57,5	57,1
90	104,0	108,9	109,4	109,1

Vedlegg 4: Grafer for kontroller målt 23.02.21

Blo-Rad
D-100
Sys-2 Diablo
Control Summary Report

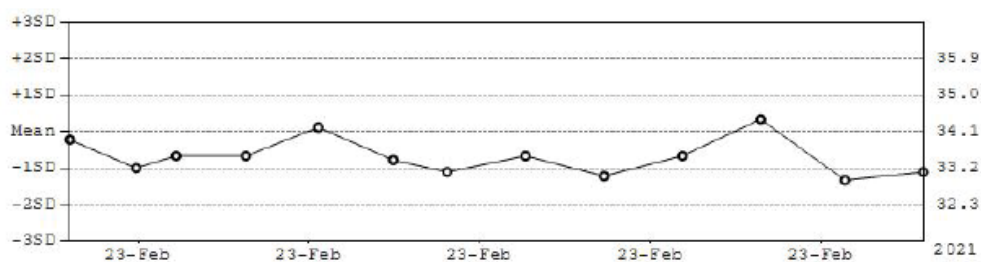
Assay: HbA1c

Date Range: 23-Feb-2021 - 23-Feb-2021

Lot Number: 34001

Level 1, BR1

Exp. Date 31-Oct-2021



Evaluation Criteria as of 23-Feb-2021

Mean: 34.1

SD: 0.9

(mmol/mol IFCC)

Analysis Date/Time

Rule Violation

Specimen Comment

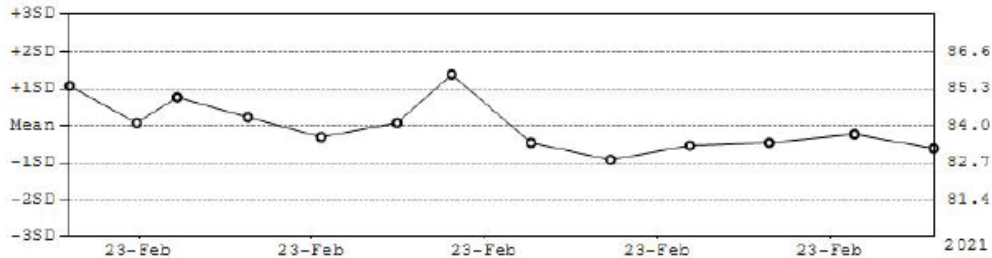
Figur 19: Graf over avvik fra gjennomsnittsverdi (34,1 mmol/mol) for kvalitetskontroll i lavt nivå. Kontrollen er innenfor kontrollgrensene på $2_{SD}/1_{SD}$.

**Bio-Rad
D-100
Sys-2 Diablo
Control Summary Report**

Assay: HbA1c

Date Range: 23-Feb-2021 - 23-Feb-2021

Lot Number: 34002	Level 2, BR2	Exp. Date 31-Oct-2021
-------------------	--------------	-----------------------



Evaluation Criteria as of 23-Feb-2021

Mean: 84.0

SD: 1.3

(mmol/mol IFCC)

Analysis Date/Time	Rule Violation	Specimen Comment
--------------------	----------------	------------------

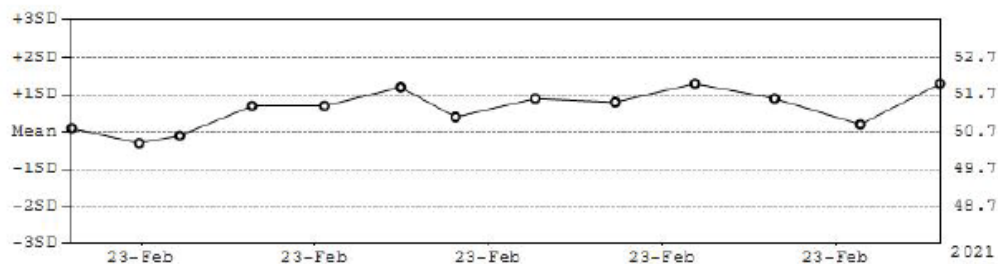
Figur 20: Graf over avvik fra gjennomsnittsverdi (84,0 mmol/mol) for kvalitetskontroll i høyt nivå. Kontrollen er innenfor kontrollgrensene på $2_{2SD}/1_{3SD}$.

**Bio-Rad
D-100
Sys-2 Diablo
Control Summary Report**

Assay: HbA1c

Date Range: 23-Feb-2021 - 23-Feb-2021

Lot Number: 100920	Level 3, Pasientkr	Exp. Date 30-Sep-2022
--------------------	--------------------	-----------------------



Evaluation Criteria as of 23-Feb-2021

Mean: 50.7

SD: 1.0

(mmol/mol IFCC)

Analysis Date/Time	Rule Violation	Specimen Comment
--------------------	----------------	------------------

Figur 21: Graf over avvik fra gjennomsnittsverdi (50,7 mmol/mol) for kvalitetskontroll i cut-off nivå (pasientpool). Kontrollen er innenfor kontrollgrensene på $2_{2SD}/1_{3SD}$.

Vedlegg 5: Kromatogrammer

Noen eksempler vises her. Resten av kromatogrammene kan forevises ved behov.

**Bio-Rad
D-100**

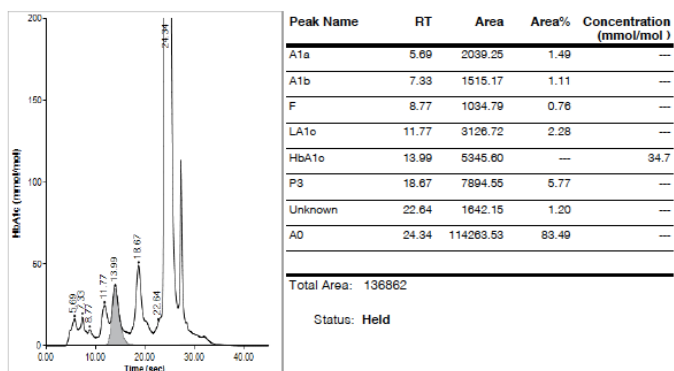
**Sys-2 Diablo
Patient Report**

67400864

Patient ID:	Gender:	
DOB:	Physician:	

Rack: 014	Position: 5	HbA1c: 34.7 mmol/mol
Run Date/Time:	23-Feb-2021 13:16:21	

Note: _____ Comment: _____



Figur 22: Eksempel på kromatogram for lavt nivå med tabell over retensjonstid, areal og areal%, samt konsentrasjon for HbA1c.

**Bio-Rad
D-100**

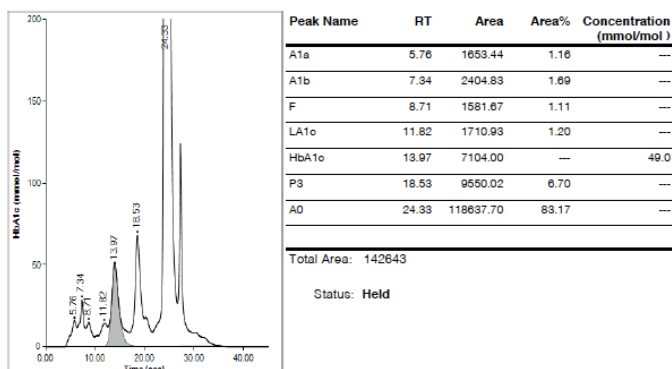
**Sys-2 Diablo
Patient Report**

67400889

Patient ID:	Gender:	
DOB:	Physician:	

Rack: 011	Position: 2	HbA1c: 49.0 mmol/mol
Run Date/Time:	23-Feb-2021 13:32:51	

Note: _____ Comment: _____



Figur 23: Eksempel på kromatogram for cut-off nivå med tabell over retensjonstid, areal og areal%, samt konsentrasjon for HbA1c.

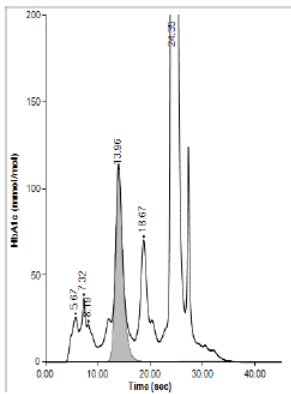
**Bio-Rad
D-100
Sys-2 Diablo
Patient Report**

6740244540

Patient ID: Gender:
DOB: Physician:

Rack: 008 Position: 9 HbA1c: 109.4 mmol/mol
Run Date/Time: 23-Feb-2021 15:53:06

Note: Comment:



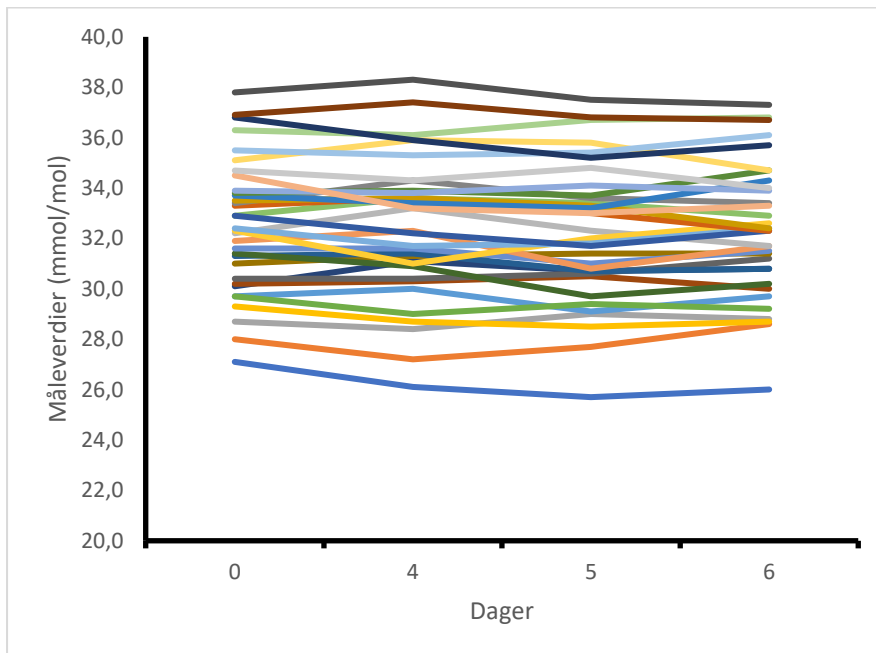
Peak Name	RT	Area	Area%	Concentration (mmol/mol)
A1a	5.67	2611.64	1.98	---
A1b	7.32	2494.22	1.87	---
F	8.19	1729.45	1.29	---
HbA1c	13.96	12795.67	---	109.4
P3	18.67	9709.59	7.27	---
A0	24.35	10423.21	78.03	---

Total Area: 133564

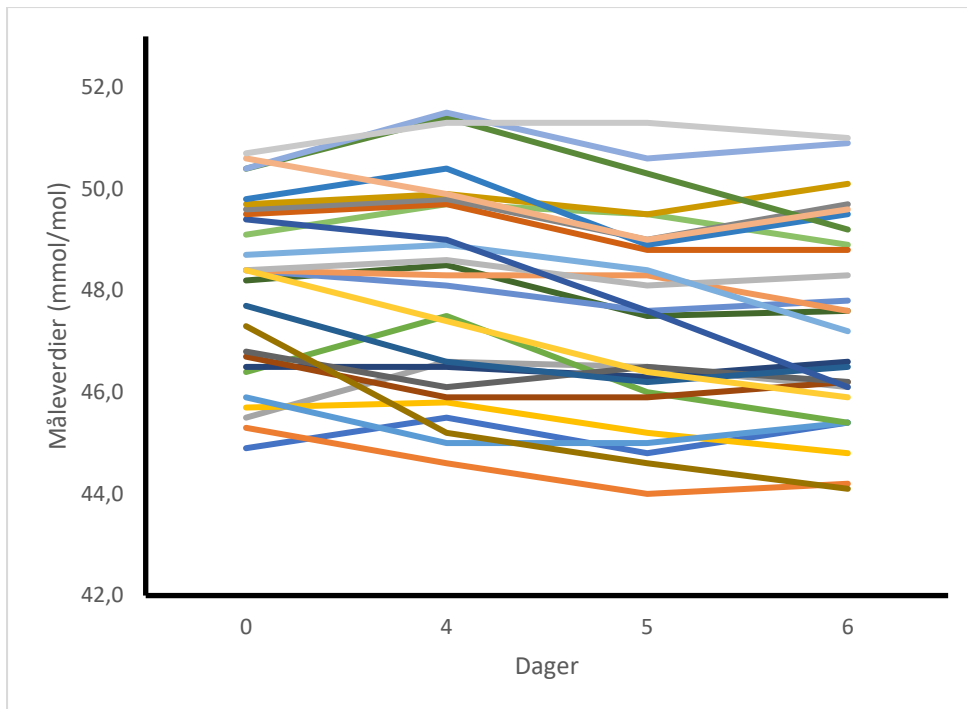
Status: Held

Figur 24: Eksempel på kromatogram for høyt nivå med tabell over retensjonstid, areal og areal%, samt konsentrasjon for HbA1c.

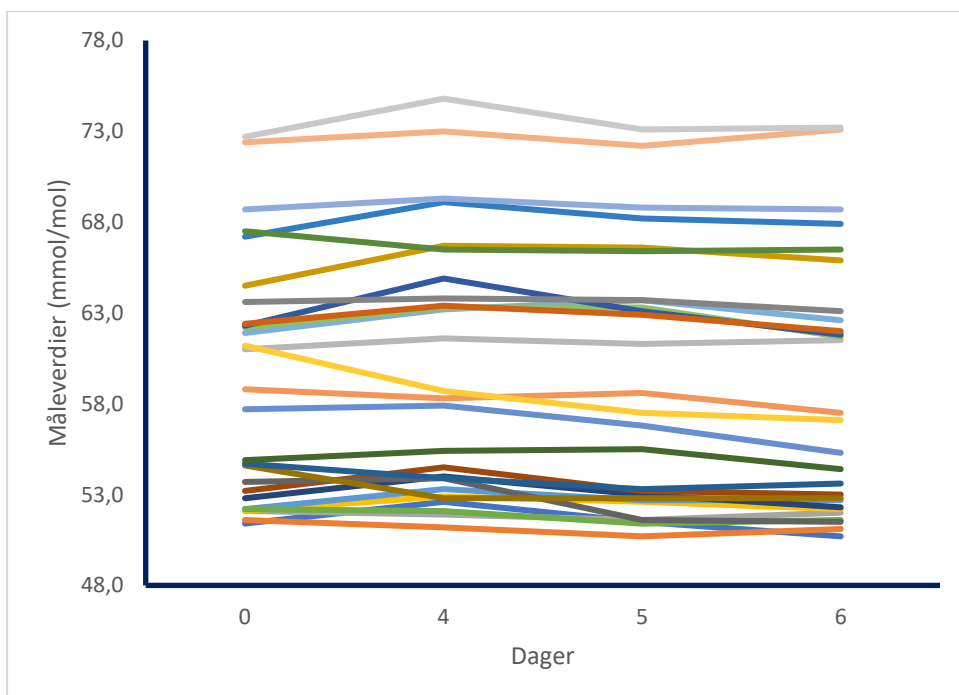
Vedlegg 6: Nivådelte linjediagram for endring av HbA1c-verdi ved ulike oppbevaringstider



Figur 25: Linjediagram for alle HbA1c målinger i lavt nivå målt etter oppbevaring i romtemperatur (24°C) på dag 0, dag 4, dag 5 og dag 6 analysert på Bio-Rad D-100 (Diablo). Hver linje representerer verdiene for hver enkel prøve.

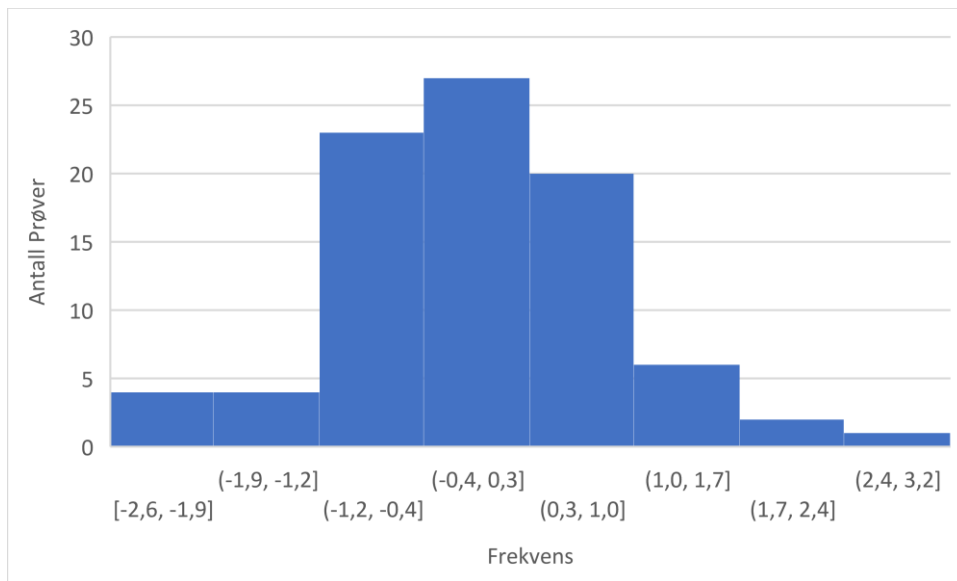


Figur 26: Linjediagram for alle HbA1c målinger i cut-off nivå målt etter oppbevaring i romtemperatur (24°C) på dag 0, dag 4, dag 5 og dag 6 analysert på Bio-Rad D-100 (Diablo). Hver linje representerer verdiene for hver enkel prøve.

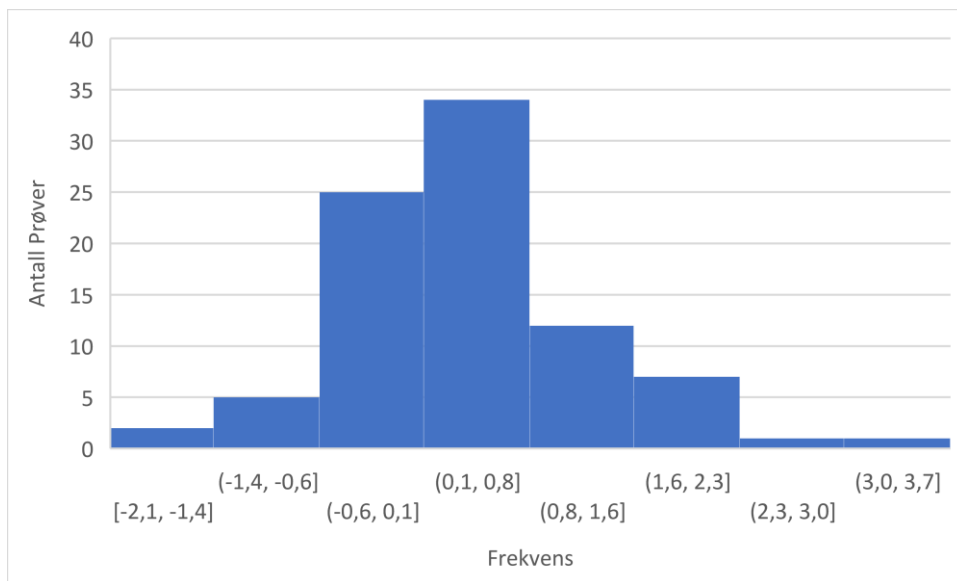


Figur 27: Linjediagram for alle HbA1c målinger i høyt nivå målt etter oppbevaring i romtemperatur (24°C) på dag 0, dag 4, dag 5 og dag 6 analysert på Bio-Rad D-100 (Diablo). Hver linje representerer verdiene for hver enkel prøve.

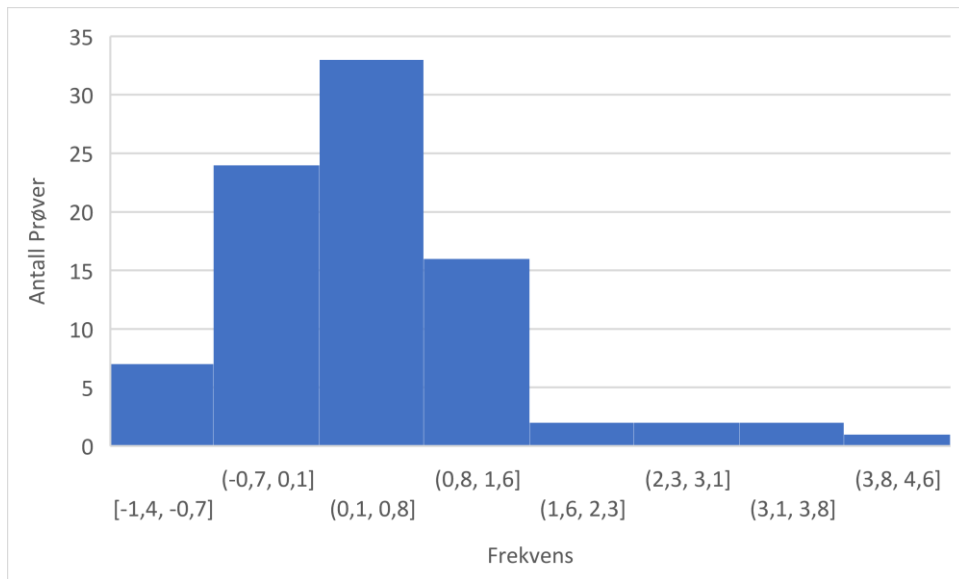
Vedlegg 7: Histogrammer for normalfordeling



Figur 28: Histogram for normalfordeling for alle HbA1c målinger (87 prøver) oppbevart i romtemperatur mellom dag 0 og 4. X-aksen viser frekvens, mens y-aksen viser antall prøver.

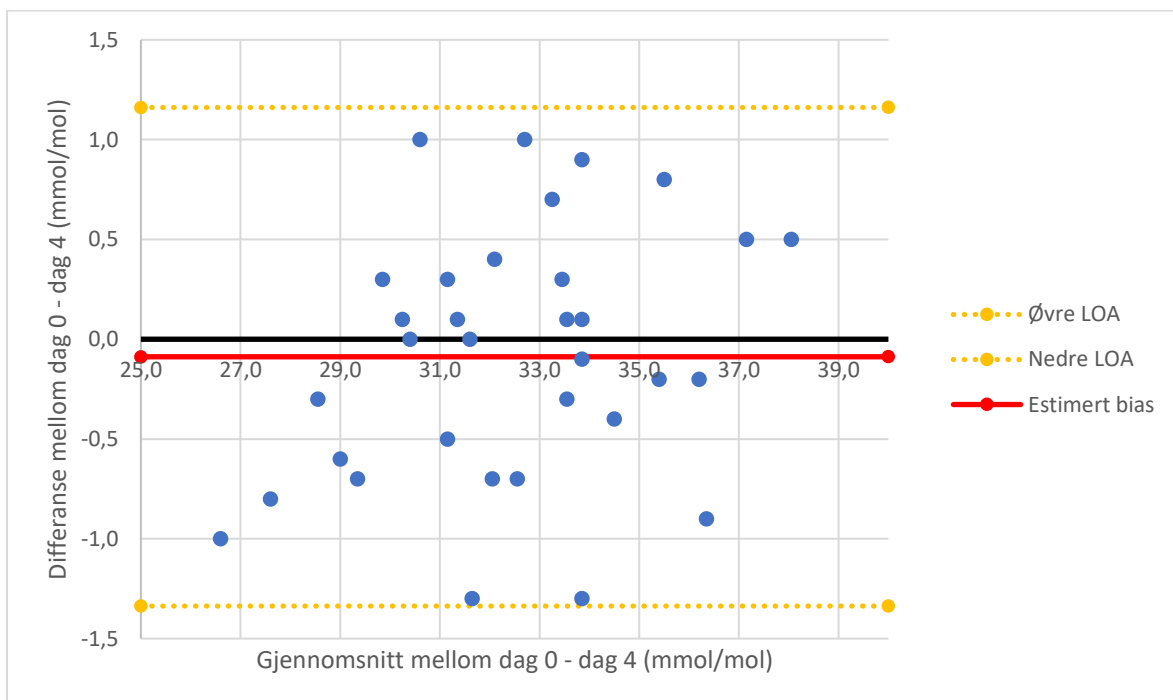


Figur 29: Histogram for normalfordeling for alle HbA1c målinger (87 prøver) oppbevart i romtemperatur mellom dag 0 og 5. X-aksen viser frekvens, mens y-aksen viser antall prøver.

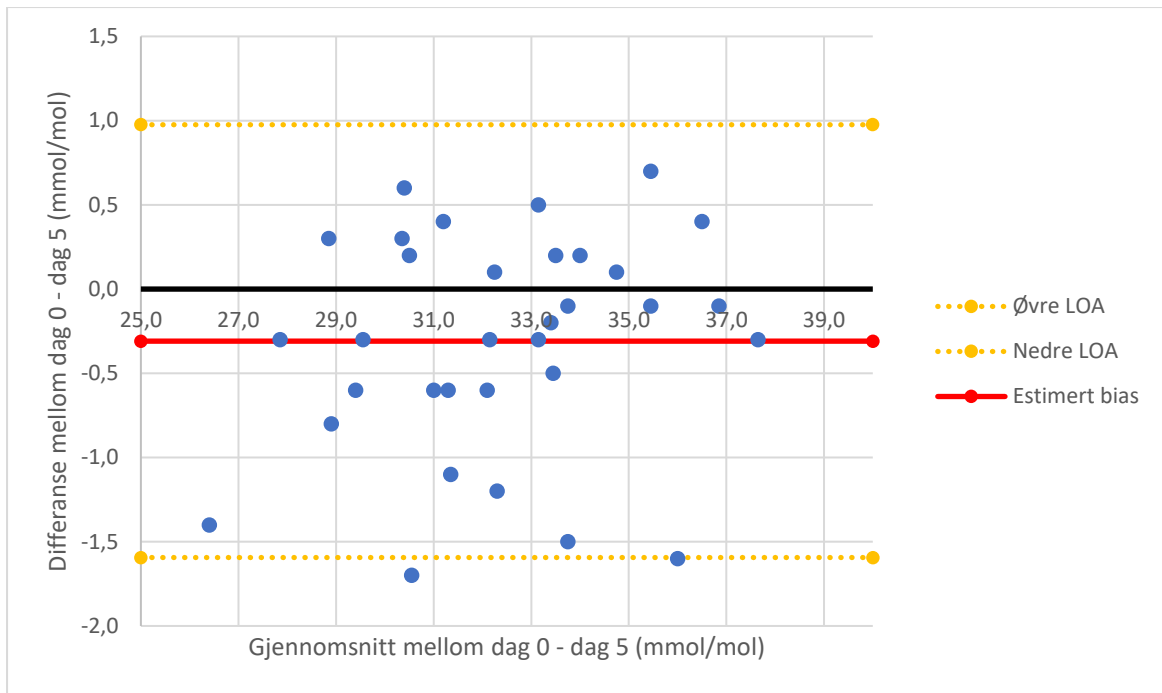


Figur 30: Histogram for normalfordeling for alle HbA1c målinger (87 prøver) oppbevart i romtemperatur mellom dag 0 og 6. X-aksen viser frekvens, mens y-aksen viser antall prøver.

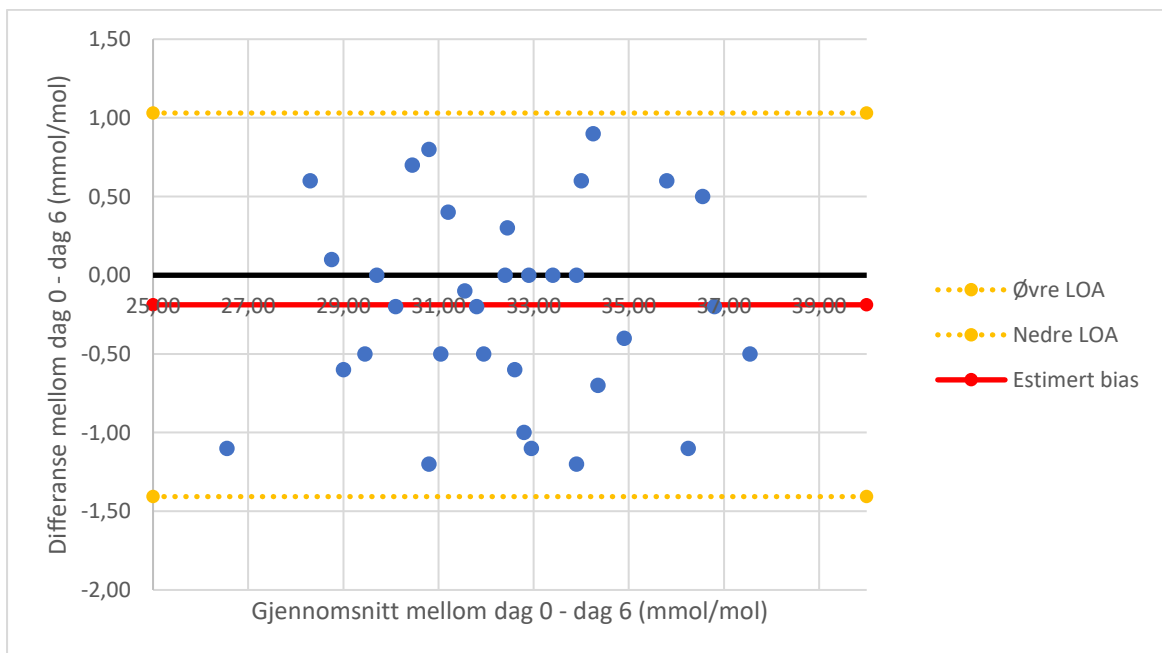
Vedlegg 8: Bland-Altman plott lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol)



Figur 31: Bland-Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 4. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 4. Lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 1,16 mmol/mol og nedre LOA er satt til -1,34 mmol/mol. Bias er estimert til å være -0,1 mmol/mol.

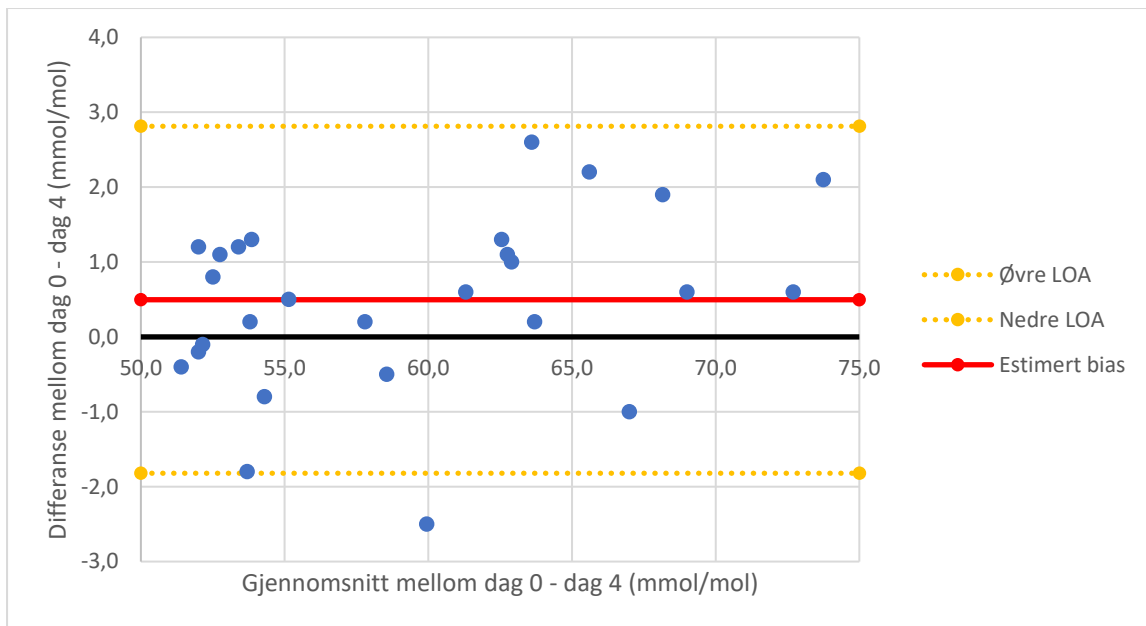


Figur 32: Bland-Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 5. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 5. Lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 0,96 mmol/mol og nedre LOA er satt til -1,60 mmol/mol.. Bias er estimert til å være -0,3 mmol/mol.

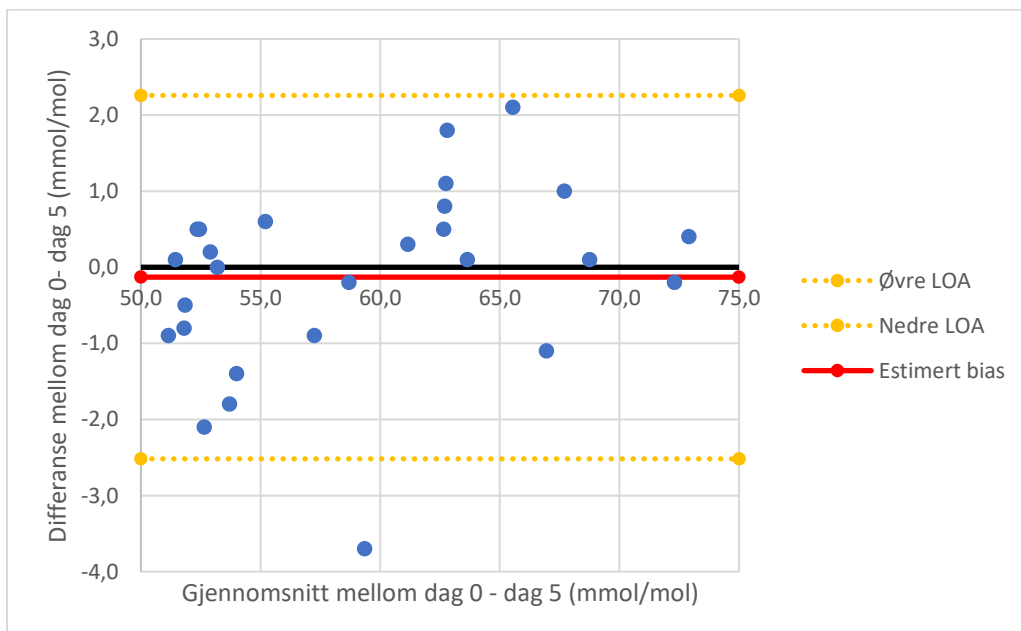


Figur 33: Bland-Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 6. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 6. Lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 1,03 mmol/mol og nedre LOA er satt til -1,40 mmol/mol. Bias er estimert til å være -0,19 mmol/mol.

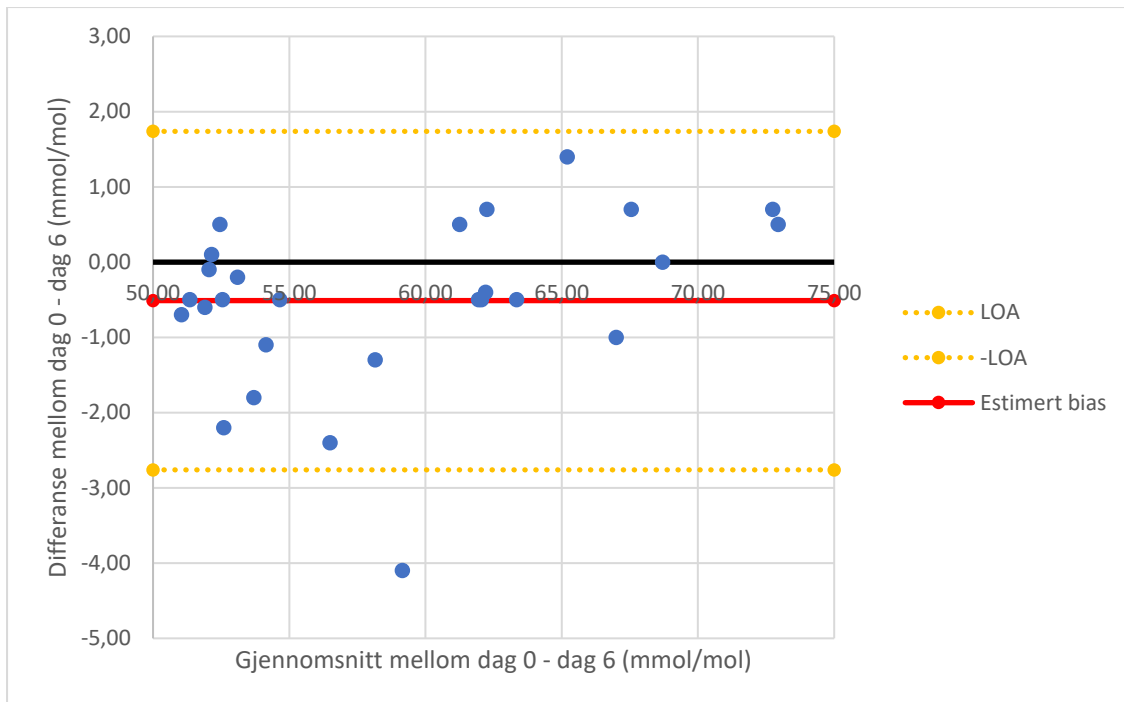
Vedlegg 9: Bland-Altman plott høyt nivå (51,4-72,7 mmol/mol)



Figur 34: Bland-Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 4. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 4. Høyt nivå (51,4 mmol/mol – 72,7 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 2,81 mmol/mol, og nedre LOA er satt til -1,82 mmol/mol. Bias er estimert til å være 0,5 mmol/mol.

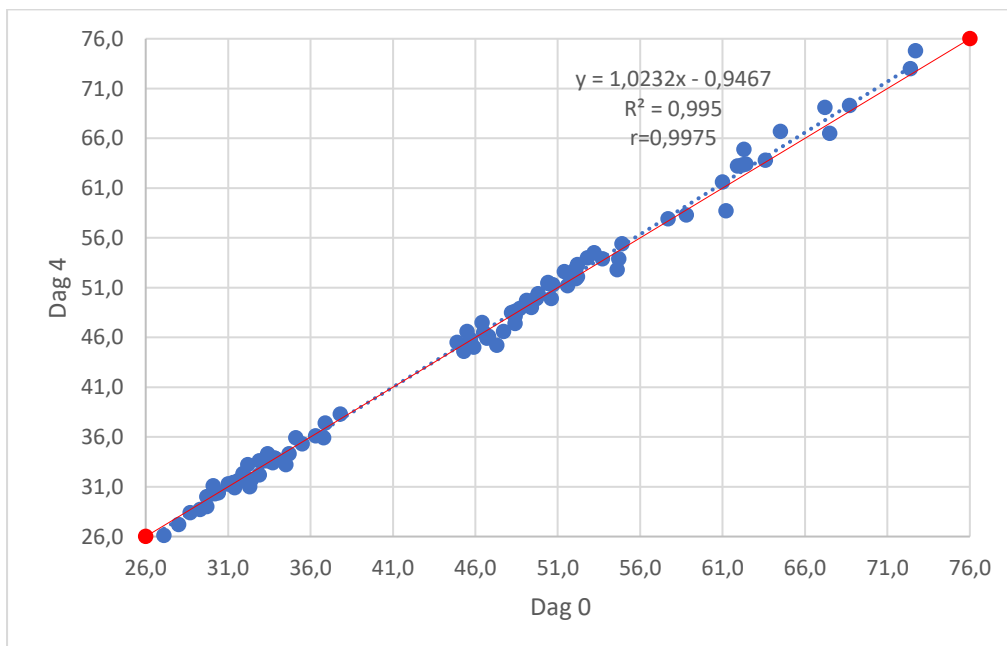


Figur 35: Bland-Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 5. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 5. Høyt nivå (51,4 mmol/mol – 72,7 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 2,26 mmol/mol, og nedre LOA er satt til -2,52 mmol/mol. Bias er estimert til å være -0,1 mmol/mol.

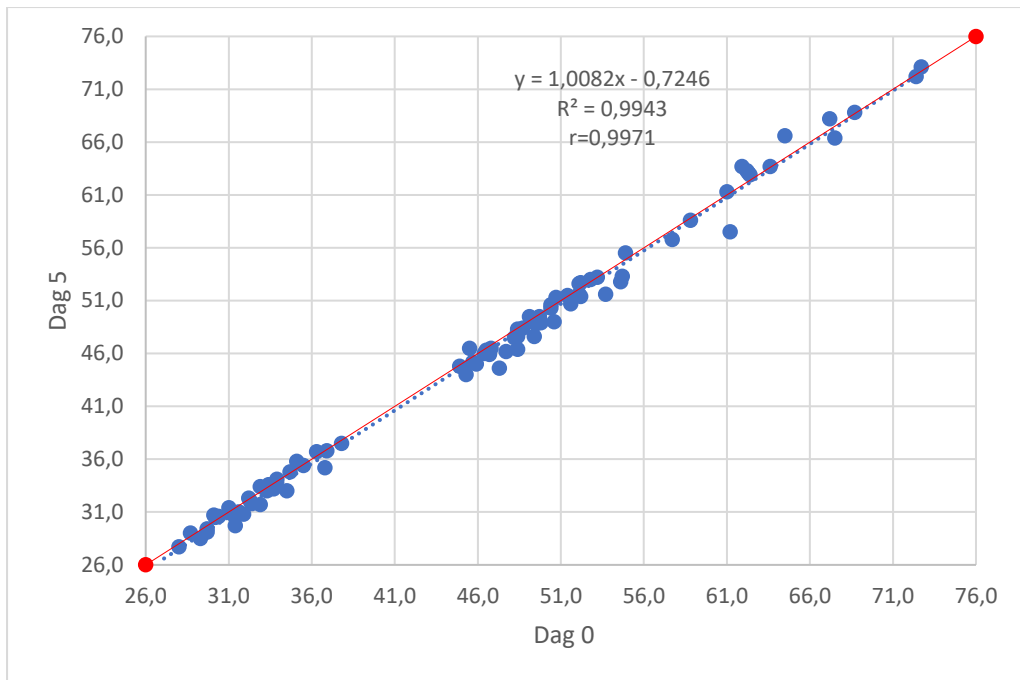


Figur 36: Bland-Altman plott for forskjellene i HbA1c konsentrasjon i prøver som er oppbevart i romtemperatur dag 0 – dag 6. X-aksen viser gjennomsnitt av HbA1c, mens y-aksen viser differansen mellom dag 0 og 6. Høyt nivå (51,4 mmol/mol – 72,7 mmol/mol). Øvre LOA er satt til 1,74 mmol/mol, og nedre LOA er satt til -2,77 mmol/mol. Bias er estimert til å være -0,51 mmol/mol.

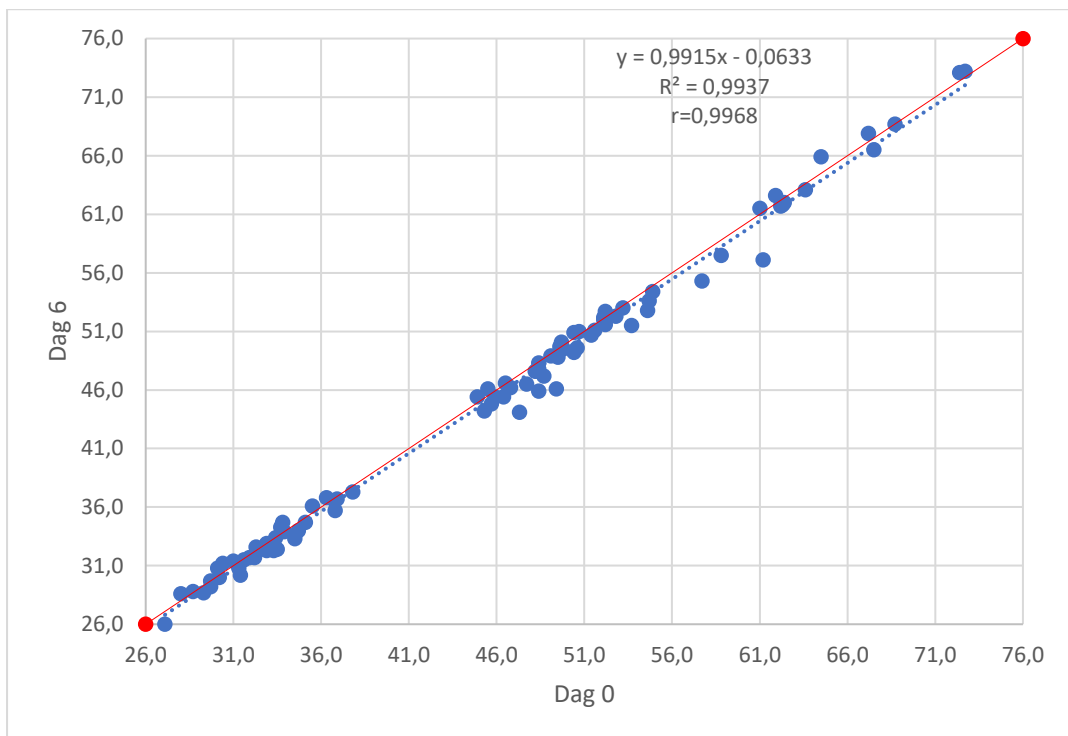
Vedlegg 10: Regresjonslinje alle nivå (27,1-72,7 mmol/mol)



Figur 37: Regresjonsanalyse dag 0-4 for alle nivå for HbA1c (27,1-72,7 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

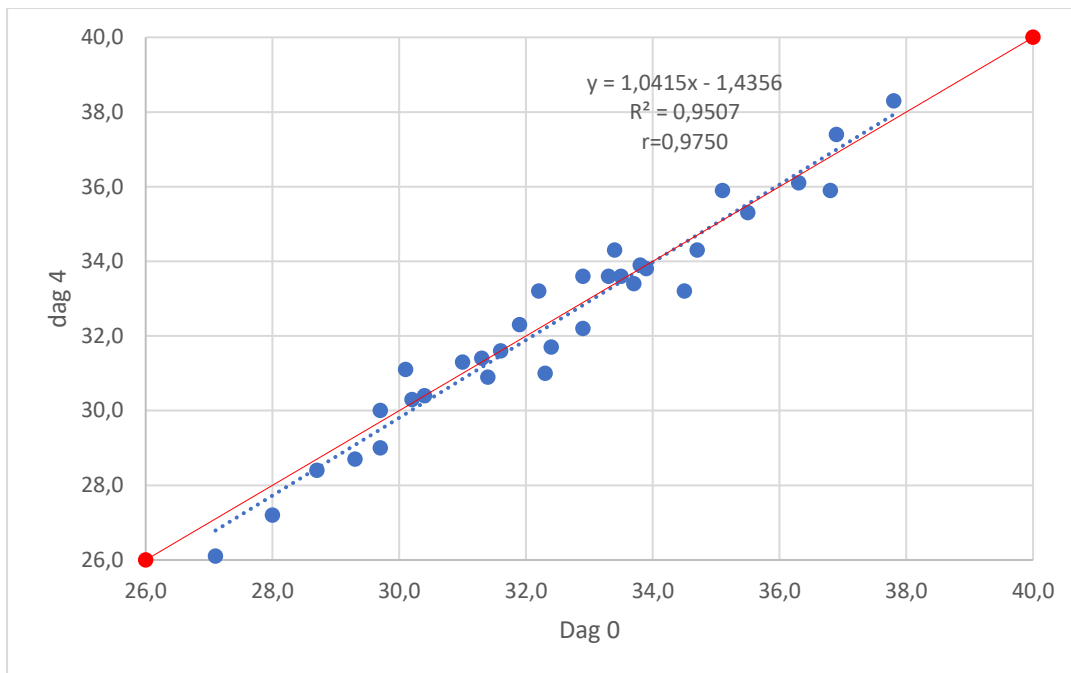


Figur 38: Regresjonsanalyse dag 0-5 for alle nivå for HbA1c (27,1-72,7 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

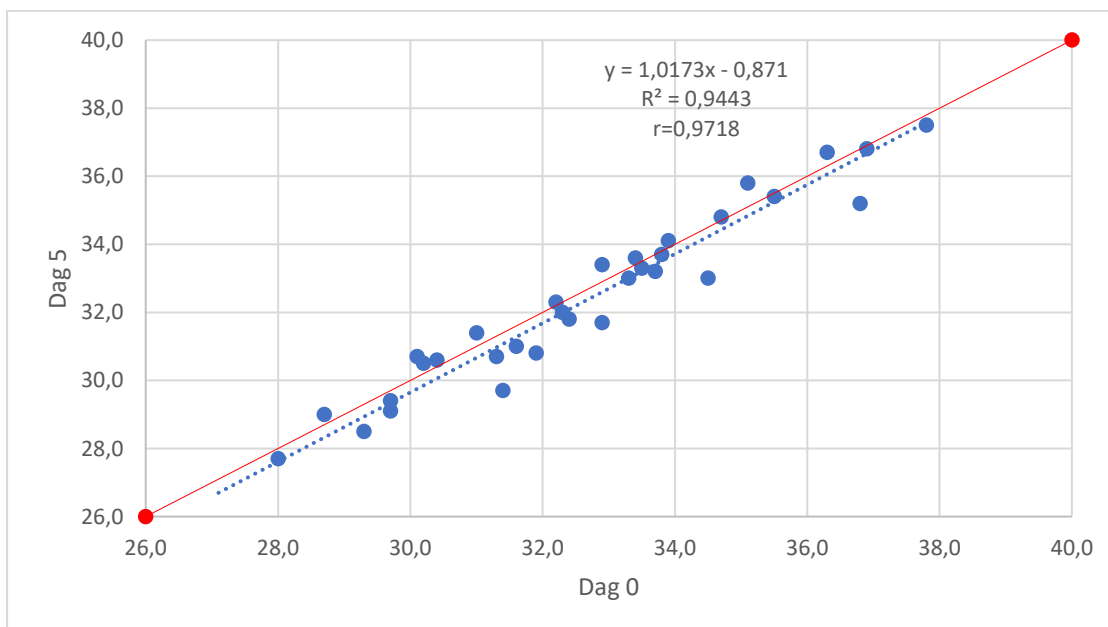


Figur 39: Regresjonsanalyse dag 0-6 for alle nivå for HbA1c (27,1-72,7 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

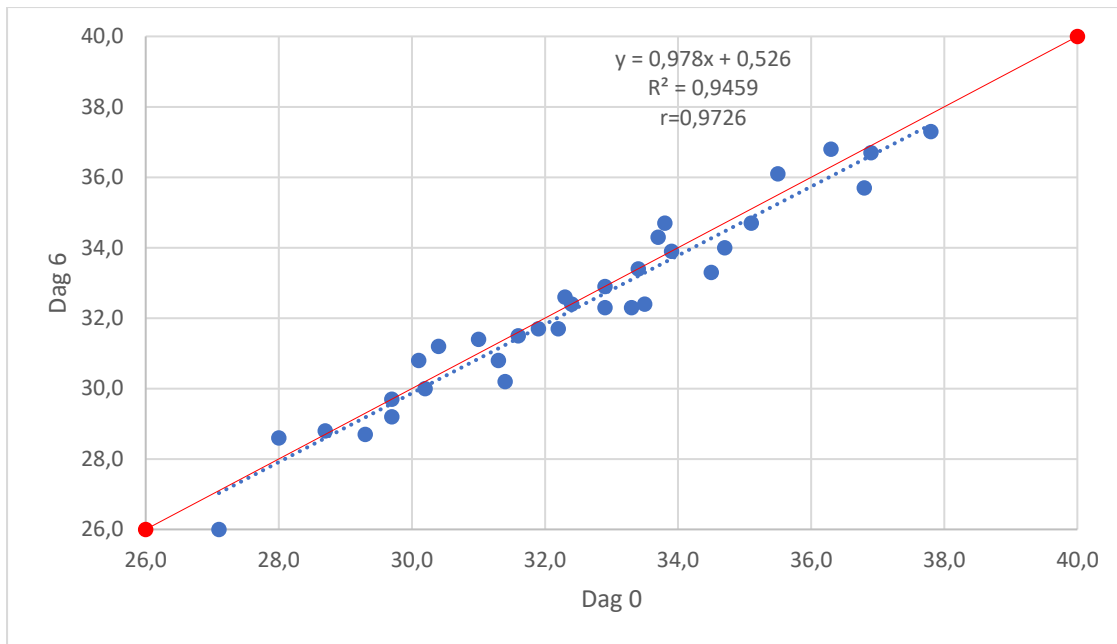
Vedlegg 11: Regresjonslinje lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol)



Figur 40: Regresjonsanalyse dag 0-4 for lavt nivå for HbA1c (27,1-37,8 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

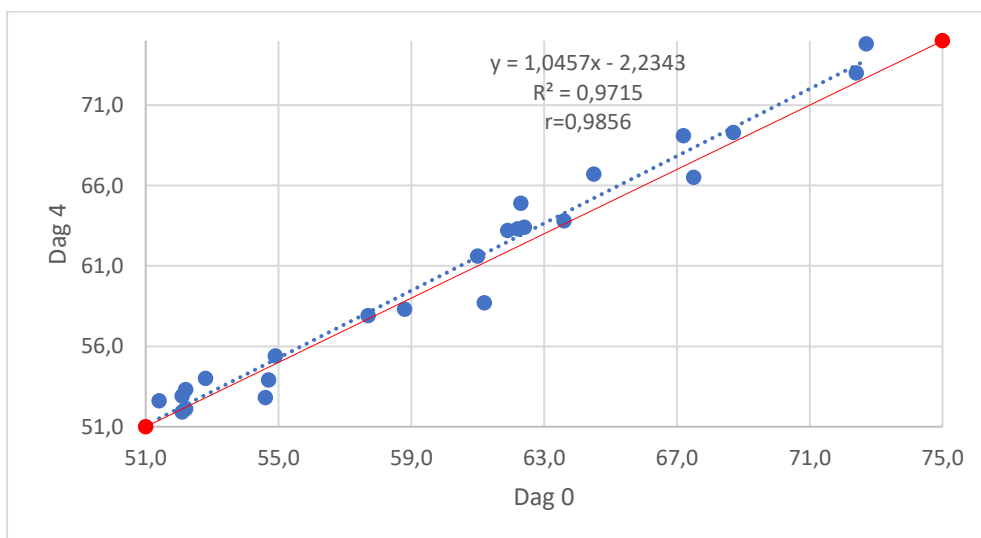


Figur 41: Regresjonsanalyse dag 0-5 for lavt nivå for HbA1c (27,1-37,8 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

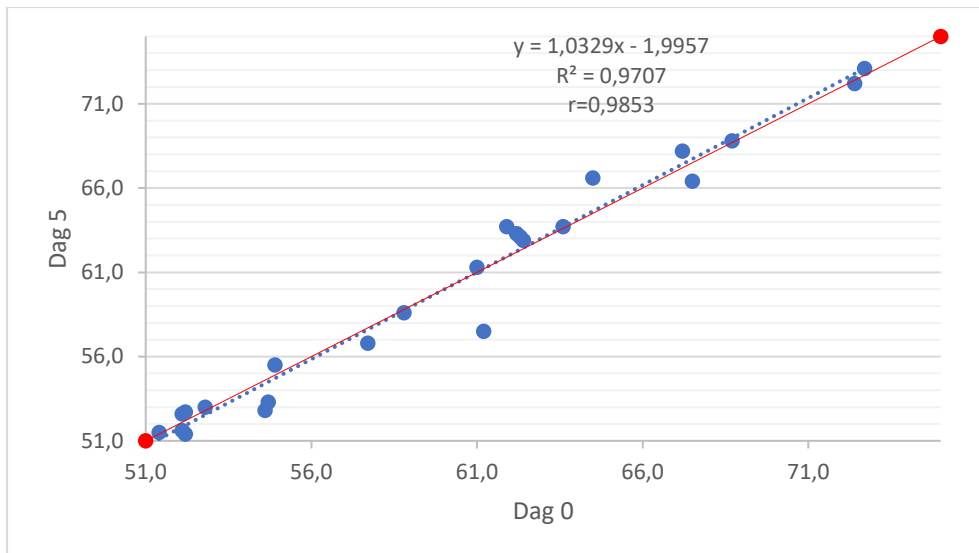


Figur 42: Regresjonsanalyse dag 0-6 for lavt nivå for HbA1c (27,1-37,8 mmol/mol). Den røde, heltrukne linjen viser egalitetslinjen. Den blå stiplede linjen viser regresjonslinjen.

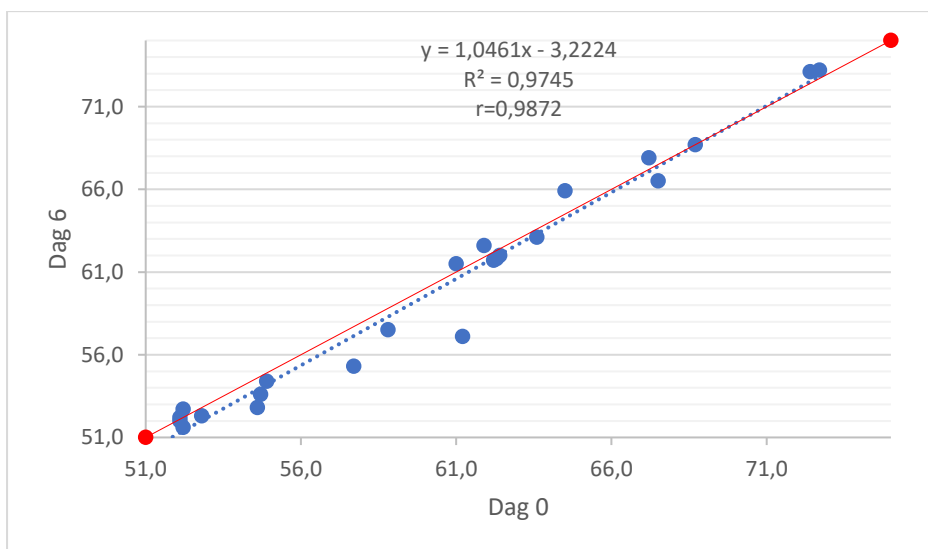
Vedlegg 12: Regresjonslinje høyt nivå (51,4-72,7 mmol/mol)



Figur 43: Regresjonsanalyse dag 0-4 for høyt nivå for HbA1c (51,4-72,7 mmol/mol)



Figur 44: Regresjonsanalyse dag 0-5 for høyt nivå for HbA1c (51,4-72,7 mmol/mol)



Figur 45: Regresjonsanalyse dag 0-6 for høyt nivå for HbA1c (51,4-72,7 mmol/mol)

Vedlegg 13: Regresjonsstatistikk cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol)

Statistikk for de resterende nivåene kan forevises ved behov

Regresjonsstatistikk	
Multipel R	0,929418327
R-kvadrat	0,863818426
Justert R-kvadr	0,858371163
Standardfeil	0,785961677
Observasjoner	27

Variansanalyse					
	fg	SK	GK	F	Signifikans-F
Regresjon	1	97,95956902	97,95956902	158,5784339	2,53743E-12
Residualer	25	15,44339394	0,617735758		
Totalt	26	113,402963			

	Koeffisienter	Standardfeil	t-Stat	P-verdi	Nederste 95%	Øverste 95%	Nedre 95,0%	Øverste 95,0%
Skjæringspunkt	-4,495613726	4,176442888	-1,076421693	0,292017127	-13,09715887	4,105931415	-13,09715887	4,105931415
X-variabel 1	1,092946373	0,086791419	12,59279293	2,53743E-12	0,914196099	1,271696647	0,914196099	1,271696647

Figur 46: Regresjonsstatistikk for dag 0-4 for Cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol). Skjæringspunkt og nullpunkt ligger innenfor konfidensintervallene, og det er dermed ikke påvist statistisk signifikant forskjell mellom disse dagene.

Regresjonsstatistikk	
Multipel R	0,909255952
R-kvadrat	0,826746386
Justert R-kvadr	0,819816241
Standardfeil	0,83451966
Observasjoner	27

Variansanalyse					
	fg	SK	GK	F	Signifikans-F
Regresjon	1	83,0812753	83,0812753	119,2971339	5,24999E-11
Residualer	25	17,41057656	0,696423062		
Totalt	26	100,4918519			

	Koeffisienter	Standardfeil	t-Stat	P-verdi	Nederste 95%	Øverste 95%	Nedre 95,0%	Øverste 95,0%
Skjæringspunkt	-0,928865765	4,434470279	-0,209464876	0,835782897	-10,06182827	8,204096736	-10,06182827	8,204096736
X-variabel 1	1,006530634	0,092153534	10,92232273	5,24999E-11	0,816736879	1,196324389	0,816736879	1,196324389

Figur 47: Regresjonsstatistikk for dag 0-5 for Cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol). Skjæringspunkt og nullpunkt ligger innenfor konfidensintervallene, og det er dermed ikke påvist statistisk signifikant forskjell mellom disse dagene.

Regresjonsstatistikk	
Multipel R	0,864228514
R-kvadrat	0,746890924
Justert R-kvadr	0,736766561
Standardfeil	1,033067209
Observasjoner	27

Variansanalyse									
	fg	SK	GK	F	Signifikans-F				
Regresjon	1	78,73115539	78,73115539	73,77164562	6,28122E-09				
Residualer	25	26,68069647	1,067227859						
Totalt	26	105,4118519							

	Koeffisienter	Standardfeil	t-Stat	P-verdi	Nederste 95%	Øverste 95%	Nedre 95,0%	Øverste 95,0%
Skjæringspunkt	0,25535503	5,48951218	0,046516889	0,963267873	-11,05050694	11,561217	-11,05050694	11,561217
X-variabel 1	0,979825488	0,114078551	8,589042183	6,28122E-09	0,744876314	1,214774663	0,744876314	1,214774663

Figur 48: Regresjonsstatistikk for dag 0-6 for Cut-off nivå (44,9-50,7 mmol/mol). Skjæringspunkt og nullpunkt ligger innenfor konfidensintervallene, og det er dermed ikke påvist statistisk signifikant forskjell mellom disse dagene.

Vedlegg 14: Paret t-test

Tabell 12: Paret t-test for HbA1c i lavt nivå (27,1-37,8 mmol/mol). Resultatene viser at det ikke er signifikant forskjell mellom dag 0-4 samt dag 0-6, men det er signifikant forskjell dag 0-5.

	Dag 0 og 4	Dag 0 og 5	Dag 0 og 6
T-observert	0,792	2,709	1,736
T-kritisk	2,037	2,037	2,037
P, tosidig	0,43	0,01	0,09
Konklusjon	P>0,05 t-kritisk > t-observert. H0 beholdes.	P<0,05 t-kritisk < t-observert. H0 forkastes.	P>0,05 t-kritisk > t-observert. H0 beholdes.

Tabell 13: Paret t-test for HbA1c i cut-off nivået (44,9-50,7 mmol/mol). Resultatet viser at det ikke er signifikant forskjell mellom målingene mellom dag 0-4, men viser at det er signifikant forskjell mellom dag 0-5 samt dag 0-6.

	Dag 0 og 4	Dag 0 og 5	Dag 0 og 6
T-observert	0,171	3,904	3,664
T-kritisk	2,056	2,056	2,056
P, tosidig	0,87	0,00	0,00
Konklusjon	P>0,05 t-kritisk > t-observert. H0 beholdes.	P<0,05 t-kritisk < t-observert. H0 forkastes.	P<0,05 t-kritisk < t-observert. H0 forkastes.

Tabell 14: Paret t-test for HbA1c i høye nivåer (51,4-72,7 mmol/mol). Resultatene viser at det ikke er signifikant forskjell mellom dag 0-4, 0-5 og 0-6.

	Dag 0 og 4	Dag 0 og 5	Dag 0 og 6
T-observert	2,814	1,087	0,211
T-kritisk	2,046	2,046	2,046
P, tosidig	0,01	0,29	0,83
Konklusjon	P<0,05 t-kritisk < t-observert. H0 forkastes.	P>0,05 t-kritisk > t-observert. H0 beholdes.	P>0,05 t-kritisk > t-observert. H0 beholdes.