

Talasemi Taramasında Primus Ultra2 Analyzer ve Tosoh HLC-723 G8 HPLC Sistemlerinin Karşılaştırılması

Comparison of Primus Ultra2 Analyzer and Tosoh HLC-723 G8 HPLC Systems in Thalassemia Screening

Hamit Yaşar Ellidağ*

Esin Eren**

Serpil Aktaş Tosun*

Necat Yılmaz*

* Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Antalya

** Antalya Atatürk Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Antalya

Başvuru Tarihi: 22.05. 2013

Kabul Tarihi: 24.10.2013

ÖZET

Amaç: Hemoglobino-pati taraması için hemoglobin alt tiplerini ayırmada HPLC (High Performance Liquid Chromatography) yaygın kullanılan bir yöntemdir. Günümüzde değişik marka ve modelde HPLC sistemleri hemoglobino-pati taraması için kullanılmakta fakat bu cihazların birbiri ile olan uyumu bilinmemektedir. Bu amaçla, biz bu çalışmada Primus Ultra2 analyzer marka HPLC cihazı ile Tosoh HLC 723 G8 marka HPLC cihazını hemoglobin A2 (HbA2) bakımından birbirleri ile olan uyumu araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Laboratuvarımıza 15 Mart -15 Nisan 2013 tarihleri arasında talasemi taraması için başvuran 22'si erkek, 18'i kadın toplam 40 kişi prospektif olarak çalışmaya alındı. Her iki cihazda tek seferde çalışılan HbA2 değerleri için istatistiksel uyum, student t test, korelasyon katsayısı (r), regresyon analizi, iki-yönlü rasgele sınıfıçı korelasyon katsayısı (SKK) ve Uyum korelasyon katsayısı (UKK) kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Analiz sonucunda örneklerin 6'sı (%33,7) -talasemi taşıyıcısı, 10'u (%36.2) anemik ve 24'ü (%30) normal olarak saptandı. Her iki cihazda ölçülen HbA2 değerleri arasında anlamlı farklılık yoktu ($t = -1.269$ $p = 0.208$). HbA2 değerleri için korelasyon katsayısı $r = 0.987$, SKK=0.97, UKK= 0.93 ve regresyon analizinde ise $Y = -0.0605 + 1.1613X$ olarak bulundu.

Sonuç: Korelasyon regresyon ve diğer istatistiksel analizlere göre iki cihazın HbA2 değerleri arasındaki uyum iyi olarak bulundu.

Anahtar Sözcükler: Primus Ultra2 analyzer; Hemoglobino-pati; HPLC; Tosoh HLC 723 G8; Yöntem karşılaştırma

ABSTRACT

Objective: HPLC (High Performance Liquid Chromatography) is the most commonly used method to differentiate the subtypes of hemoglobin in screening for hemoglobinopathy. Today, different models and trademarks of HPLC equipment have been used in screening for hemoglobinopathy. However, the agreement of the results of the analyses performed by these types of equipment are unknown. In this

study, the aim was to investigate the agreement between the results of the analyses of hemoglobinopathy screening performed in two sets of HPLC equipment with the Primus Ultra2 analyzer and the analyzer Tosoh HLC 723 G8 trademarks.

Materials and Methods: A total of 40 individuals, 22 males and 18 females, presented to the laboratory between March 15 and April 15, 2013 for thalassemia screening were included in this prospective study. Statistical correlations of hemoglobin A2 (HbA2) values, analyzed in each analyzer as a single analysis from each sample were evaluated using student t test, two-way random intraclass correlation coefficient (ICC), concordance correlation coefficient, correlation coefficient (r) and regression analysis.

Results: As a result of the analysis, 6 of the samples (35.7%) were detected as β -thalassemia carrier, 10 (36.2%) were diagnosed as anemic and 24 (30%) were detected to be normal. HbA2 values were not significantly different between the two HPLC equipments ($t = -1.269$ $p = 0.208$). Correlation coefficients for HbA2 values were found to be as $r = 0.987$, $ICC = 0.97$ and $CCC = 0.93$. Regression analysis for HbA2 values were found to be as $Y = -0.0605 + 1.1613X$.

Conclusion: According to the regression, correlation and other statistics analysis, agreement between the results of HbA2 values measured in the two analyzers was found to be sufficient.

Key Words: Primus Ultra2 analyzer, Hemoglobinopathy, HPLC, Tosoh HLC 723 G8, Method comparison

GİRİŞ

Talasemi, hemoglobin yapısında bulunan globin zincirlerinin biri ya da daha fazlasının üretiminin azlığı veya yokluğu ile karakterize olan hemoglobin sentezinin otozomal resesif kalıtsal bir grup hastalığıdır. Dünyada en yaygın genetik hastalıklar arasındadır ve dünya nüfusunun yaklaşık %1.5 kadarı β -talasemi taşıyıcısıdır. Diğer bir grup hemoglobinin yapısal değişiklikleri ise hemoglobin moleküllerinin globin zincirlerindeki özel bir bölgede aminoasitlerin bir veya daha fazlasının yer değiştirmesinden oluşur (1,2).

Gerek talasemi ve gerekse diğer hemoglobinopatilerin tanısı ve taramasında hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve değerlendirilmesi temel esastır (3). Günümüzde hemoglobin alt tiplerinin ayrımı için selüloz asetat elektroforezi, kromatografik mikrokolonlar, immünfiksasyon elektroforezi, kapiller elektroforez ve katyon değiştirici HPLC kullanılan metotlar arasındadır (4). HPLC, hemoglobin A2 (HbA2), hemoglobin F (HbF), hemoglobin A0 (HbA0) ve bunun yanında hemoglobin S (HbS), hemoglobin C (HbC), vb. patolojik hemoglobin varyantlarını ayırmada güvenilir ve altın standart bir yöntemdir (5,6). Hemoglobin alt tiplerinin ayırmak zahmetli ve zor bir süreçtir; hem HPLC, hem de diğer metotlar eğitimli ve uzman personel gerektirir (4).

Hangi yöntem kullanılırsa kullanılırsın β -talasemi taşıyıcılarını saptamada HbA2 değerleri çok önemlidir. β -talasemi taşıyıcılarının tanısında, kullanılan metoda bağlı olarak %3.5 ile %4 arasında değişen oranlarda yükselmiş HbA2 değerlerine rastlanır (7). β -talasemi ve diğer hemoglobinopati tarama ve tanısında genel olarak izlenen yol; hemoglobin, hematokrit ve diğer eritrosit endekslerinin tespiti, HbF ve HbA2 analizlerini de içeren hemoglobin alt tiplerinin ayrıştırılması ve sonunda kesin tanı için DNA analizini kapsar (4,8).

Günümüzde sürekli gelişen tıp teknolojileri değişik marka ve modelde cihazları tıp laboratuvarlarının kullanıma sunmaktadır. Bu cihazların birbiri ile uyumunu araştırmak ise ilgili uzmanlar için bir sıkıntıdır. Bu nedenle biz bu çalışmada; Primus Ultra2 analizyer (Primus Corporation, Kansas City, Kansas, USA) marka HPLC cihazı ile Tosoh HLC 723 G8 (Tosoh Bioscience, Japan) HPLC cihazını hemoglobinopati tanı ve taraması açısından önemli olan HbA2 bakımından karşılaştırmayı hedefledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Antalya Eğitim ve Araştırma hastanesi merkez laboratuvarı biyokimya bölümüne 15 Mart-15 Nisan 2013 tarihleri arasında talasemi taraması için başvuran 22'si

erkek, 18'i kadın toplam 40 kişi prospektif olarak alındı. Bu kişilerin antekübital venlerinden EDTA'lı (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) tüplere kan örnekleri alındı. Alınan bu örnekler her iki cihazda da tek seferde çalışıldı ve sonuçlar kaydedildi.

Tosoh HLC 723 G8 ve Primus Ultra2 analizler HPLC sistemlerinde cihazlara spesifik iyon değiştirici HPLC kolon ve tamponları kullanıldı. Bu cihazlar çalışılan numuneye önceden herhangi bir işlem gerektirmeyen örnek dilüsyonunu ve hemolizini otomatik yapan HPLC sistemidir (3,9).

Genel olarak HPLC sistemleri ile hemoglobinin alt tiplerinin ayrılması:

Tosoh HLC 723 G8 ve Primus Ultra2 analizler cihazlarında hemoglobin alt tiplerinin kantitatif ayrılması genel olarak şöyle özetlenebilir. Dilüe ve hemoliz edilmiş örnekler, özel filtrelerden geçirilir ve kolon içine ortalama +4 MPa (mega paskal) basınçla pompalanır. Kolon içinde hemoglobin proteinlerinin net yükleri ile kolondaki resin yükleri birbirleriyle etkileşime girerler. İlk adımda, eluat-1 için analiz başlayacağı zaman kolon içine diğer tamponlara göre düşük iyonik güçte (düşük pH ve tuz konsantrasyonunda) solüsyon pompalanır. Bu solüsyon HbF gibi zayıf bağlı molekülleri kolon üzerindeki resinden ayırır. İkinci adımda ise kolonun içine birinci solüsyona göre daha alkali ve daha yüksek tuz konsantrasyonunda, ikinci solüsyon pompalanır. Bu solüsyon HbA0 ve HbA2 gibi resi ne daha güçlü bağlanan hemoglo-

bin alt tiplerini resinden söker. Daha sonraki adımlarda ise ikinci solüsyona göre daha alkali pH ve yüksek tuz konsantrasyonlarda solüsyon kolona pompalanarak resine çok daha güçlü bağlanan diğer hemoglobinin alt tiplerini resinden söker. Kolondan çıkan elüatlardaki hemoglobin alt tiplerini dedektörler saptar ve buna bağlı olarak kromatogramlar elde edilir.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Tosoh HLC 723 G8 ve Primus Ultra2 analizler HPLC sistemlerinden elde edilen hemoglobin alt tipleri ortalama \pm standart sapma olarak kaydedildi. Elde edilen sonuçlar için korelasyon ve regresyon analizlerinin yanısıra istatistiksel uyum için sınıf içi korelasyon katsayısı (SKK) (iki-yönlü rasgele) (10) ve uyum (concordance) korelasyon katsayısı (11,12) kullanıldı. İki cihazdan alınan ölçümler için Youden ve Bland & Altman grafiği (13) oluşturuldu. Analizler SPSS 15.0 ve MedCalc 11.0 paket programları ile yapıldı.

BULGULAR

Elde edilen numunelerin her iki cihazda da çalışması sonucunda örneklerin 6'sı (%33.75) -talasemi taşıyıcısı, 10'u (%36.25) anemik ve 24'ü (%30) normal olarak saptandı. Bu kişilerin yaş, cinsiyet ve eritrosit endeksleri Tablo 1'de verilmiştir.

Her iki HPLC cihazında ölçülen HbA2 değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 1. Hastaların cinsiyetlerine göre dağılımları, yaş (ortalama \pm standart sapma) eritrosit indeksleri (ortalama \pm standart sapma) ve referans aralıkları.

	Cinsiyet (n)	Yaş	Hemoglobin Erkek: 14-18 g/dl Kadın: 12-16 g/dl	Hematokrit Erkek: 38-50 % Kadın: 34-44 %	OEH 78-93 μm^3	OEHB 25-32 pg
Taşıyıcı	Erkek (4)	21 \pm 10	11 \pm 2	35 \pm 6	61 \pm 3,1	20 \pm 1
	Kadın (2)	26 \pm 15	10 \pm 0.6	34 \pm 2	61 \pm 4.2	19 \pm 1
Anemik	Erkek (2)	25 \pm 21	11 \pm 0.4	35 \pm 1.1	66 \pm 20	21 \pm 7
	Kadın (8)	34 \pm 20	10 \pm 0.1	34 \pm 1.3	73 \pm 3	23 \pm 2
Normal	Erkek (15)	21 \pm 26	14 \pm 1.5	42 \pm 7	85 \pm 10	28 \pm 2
	Kadın (9)	23 \pm 15	12.8 \pm 0.8	39 \pm 4	83 \pm 10	26 \pm 2

OEH: Ortalama Eritrosit Hacmi, OEHB: Ortalama Eritrosit Hemoglobini

Tablo 2. Cihazlardan elde edilen HbA2 değerleri.

	Tosoh- HbA2 (%2.0-%3.5)*	Primus- HbA2 (%1.7-%3)*
Taşıyıcı (6)	5.6 ± 0.6	4.9 ± 0.3
Anemik+Normal (34)	2.3 ± 0.37	2.08 ± 0.31

*Referans aralıklar

Tablo 3. Her iki cihazda ölçülen HbA2 değerlerinin karşılaştırılması.

Tosoh-Primus	HbA2 (%)
t-test	t= -1.269 p= 0.208
Korelasyon katsayısı	r=0.987
Regresyon katsayısı	Y = -0.0605 + 1.1613X
Bias (%)	1.101
Sınıfıçı korelasyon katsayısı	0.97 (%95 GA 0.95-0.98)
Uyum korelasyon katsayısı	0.93 (%95 GA 0.89-0.95)

GA: güven aralığı. Korelasyon katsayısı, regresyon katsayısı ve sınıfıçı korelasyon katsayısı için p<0.0001

Tablo 4. Cihazlardan elde edilen %CV değerleri.

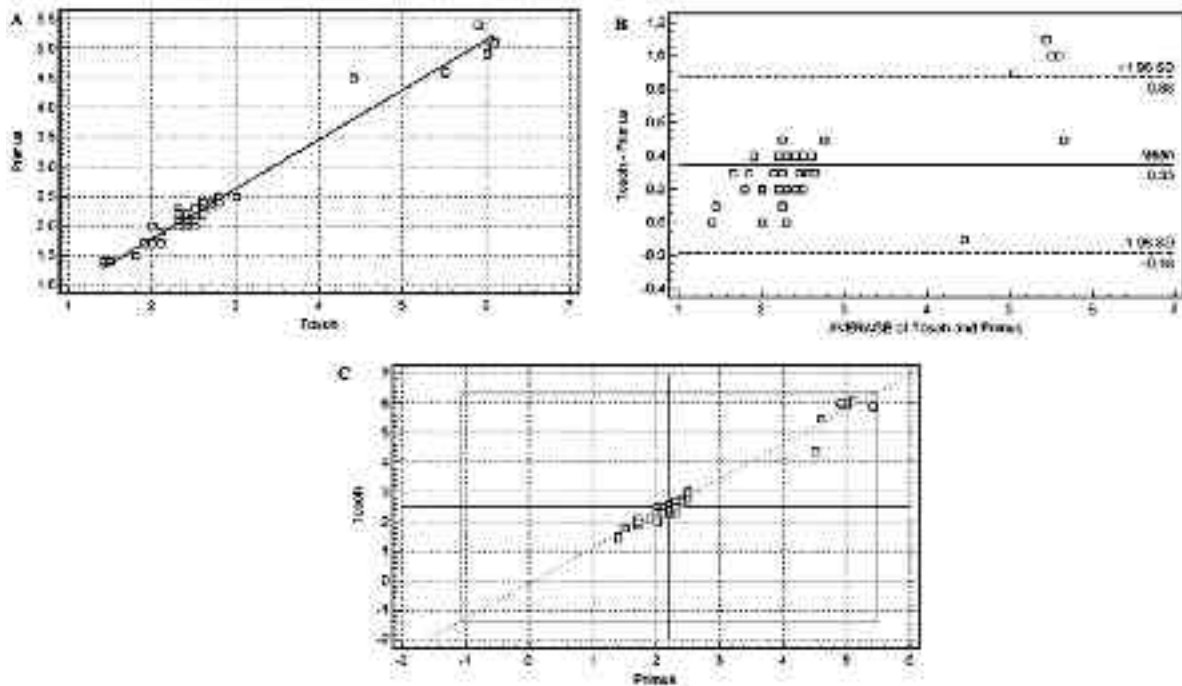
	Primus Ultra2 HbA2 (%)	Tosoh HLC 723 G8 HbA2 (%)
%CV		
Gün İçi	2.1	1.9
Günler Arası	2.4	2.2

Tosoh HLC 723 G8 ve Primus Ultra2 analizler sistemleri ile ölçülen HbA2 değerleri için t test, korelasyon katsayısı, regresyon analizi, sınıfıçı korelasyon katsayısı ve uyum korelasyon katsayısı Tablo 3'te, Bland-Altman, Youden ve regresyon grafikleri ise Şekil 1'de verilmiştir.

Cihazlara ait normal kontrol ile yapılan gün içi ve günler arası %CV (belirsizlik katsayısı) çalışması Tablo 4'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Primus Ultra2 analizler ve Tosoh HLC 723 G8 HPLC cihazlarının HbA2 ölçümleri bakımından uyumunu incelediğimiz çalışmamızda iki cihazın sonuçları arasında anlamlı fark bulunmamaktadır (t= -1.269, p= 0.208). Yaptığımız korelasyon ve regresyon analizlerine göre r= 0.987 slope= 1.161 bulunmuştur. CLSI'nin metot karşılaştırma protokolüne (EP-9) göre korelasyon katsayısının, tek başına yeterli olmamakla birlikte, 0.97'ten büyük olması önerilmektedir (14). Buna göre korelasyon katsayısı uygundur ve slope değerinin 1'e yakın olduğu saptanmıştır.



Şekil 1. A) Regresyon analizi grafiği, B) Bland-Altman grafiği, C) Youden grafiği.

İki cihazın uyumunu incelemek için yaptığımız sınıfıçı korelasyon katsayısını (SKK) 0.97, uyum korelasyon katsayısını (UKK) ise 0.93 olarak bulduk. Fleiss, uyumun çok iyi olması için SKK'nın 0.90'ın üzerinde olması gerektiğini bildirmiştir (10). Lin ise UKK'nın 0.90-0.95 arasında bulunmasını "orta dereceli uyum" olarak değerlendirmiştir (11,12).

Bu sonuçlara benzer şekilde Bland-Altman grafiğinde iki cihaz ölçümlerinin ortalamaları arasında %0.35 fark olduğunu ve diğer farkların güven aralıklarında saçıldığı görülmüştür. Yine Bland-Altman ve Youden grafiklerine göre her iki cihaz sonuçlarının %1-%3 aralıklarında uyumunun iyi olduğunu, bununla birlikte %4'den büyük değerlerde Tosoh cihazının Primus cihazına göre daha yüksek ölçüm yaptığını saptadık.

Teknolojik gelişmeler ve ülkemizdeki ihale ile kit karşılığı cihaz edinme uygulamasına bağlı olarak klinik biyokimya laboratuvarlarında cihazlar belirli periyotlarla değişmektedir. Bu geçiş sürecinde yeni cihaz için yöntem değerlendirme çalışmaları zor, zaman alıcı ve maliyetli bir süreçtir. Bunun için klinik biyokimya uzmanları laboratuvarlarına yeni bir cihaz kurulduğu zaman, gerek dış kalite kontrol, gerek iç kalite kontrol ve gerekse klinisyen ve hasta geri dönüşü yönünden takip ettikleri ve uzun süre kullandıkları eski cihazla (referans yöntem olmasa da) uyumlu olmasını isterler. Genellikle iki cihaz arasındaki uyumu bulmak için yapılan çalışmalarda korelasyon ve regresyon analizleri kullanılmaktadır. Uyumu araştırmada bu analizlerin kullanılması dağılım genişliğinin korelasyon katsayısını etkilemesi, iki yöntemin zayıf uyuma sahip olduğu halde yüksek korelasyon göstermesi, regresyon analizinde, slope değerinin yorumlanmasının güçlüğü ve hangi yöntemin bağımlı hangi yöntemin bağımsız olmasının saptanaması vb. nedenlerden dolayı hatalı sonuçlar elde edilebilmektedir (13,15). Bundan dolayı yöntem karşılaştırma deneylerinde daha kolay yorumlanabilir ek istatistik yöntemlere ge-

rek duyulmaktadır. SKK ve UKK bu amaçla kullanılan ve yorumlanması kolay istatistiksel yöntemlerdir. Yine Bland-Altman ve Youden grafikleri regresyon grafiği yanında ek bilgi sağlayan ve kolaylıkla çizilebilen grafiklerdir.

Bu çalışmanın sonucunda talasemi taramasında kullanılan Primus Ultra2 analizyer ve Tosoh HLC 723 G8 HPLC cihazının birbiri ile uyumunu araştırdık ve yöntem değerlendirme için gerekli ekipmanı (örneğin primer referans madde) ve zamanı olmayan laboratuvarlarda iki cihazın birbiri ile uyumunu nasıl araştırılacağını ortaya koyduk. Yaptığımız istatistiksel analizlere göre her iki cihaz arasında HbA2 yönünden uyumun yeterli olduğunu bulduk. HbA2 talasemi taramalarında hayati bir öneme sahiptir. Yanlış negatif sonuçlar evlilik öncesi yapılan taramalar için istenmeyen sonuçlar doğurabilir. Yine farklı cihaz kullanan merkezlerden gelen farklı sonuçlar klinisyenlerin kafasını karıştırabilir. Talasemi taramalarında HbA2 eritrosit indeksleri ve serum demir parametreleri ile beraber yorumlanmalı şüpheli durumlarda daha ileri tetkik ve araştırmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problems. Bull WHO 2001; 79: 740-1.
2. Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes 2001; pp.1-3 4th ed. Oxford: Blackwell Science LTD, Publication.
3. Françoise M, Imane A, Nathalie BP, Chantal P, Nicolas L, Catherine B. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G8 automated HPLC analyzer for hemoglobin analysis in beta-thalassemia mode. Clinical Biochemistry 2011; 44: 441-3.
4. Antonino G, Cristina P, Disma R, Aurelio M. The significance of the hemoglobin A2 value in screening for hemoglobinopathies. Clinical Biochemistry 2009; 42: 1786-96.
5. Colah RB, Surve R, Sawant P, D'Souza E, Italia K, Phanasgaonkar S, et al. HPLC studies in hemoglobinopathies. Indian J Pediatr 2007; 74: 657-62.
6. Van Kirk R, Sandhaus LM, Hoyer JD. The detection and diagnosis of hemoglobin A2 by high-performance liquid chromatography. Am J Clin Pathol 2005; 123: 657-61.

7. Wild BJ, Bain BJ. Investigation of abnormal hemoglobins and thalassemia. In (Eds. Lewis SM, Bain BJ, Bates I). Dacie & Lewis Practical Hematology 2001; pp. 231-268. 9 th ed. Churchill Livingstone.
8. Clarke G, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemia: review and update. Clin Chem 2000; 46: 1284-90.
9. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Nan Ou C, Bak R. Comparison of Sebia Capillary Electrophoresis With the Primus High-Pressure Liquid Chromatography in the Evaluation of Hemoglobinopathies. Am J Clin Pathol 2008; 130: 824-31.
10. Fleiss JL. The design and analysis of clinical experiments, New York, John Wiley and Sons, 1986: 1-32.
11. Lawrence I-Kuei Lin. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. Biometrics (International Biometric Society) 1989; 45(1): 255-68. doi:10.2307/2532051.
12. Statistical Calculators, Lin's Concordance: <http://www.niwa.co.nz/online-services/statistical-calculators/concordance>.
13. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986; 1: 307-10.
14. A Good Example. http://www.medical.siemens.com/siemens/nl_NLDIAG/gg_diag_FBAs/files/EP_Evaluator/Webinars/02-EE9-Mods-Fall_2010.pdf (Last accessed: April 2013)
15. Genç Y, Sertkaya D, Demirtaş S. Klinik Araştırmalarda İki Ölçüm Tekniğinin Uyumunu İncelemede Kullanılan İstatistiksel Yöntemler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2003; 56(1): 1-6.

Yazışma adresi:

Dr. Hamit Yaşar Ellidağ
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı, Antalya
E-posta: hayael1980@hotmail.com
