

İyon Değişirici HPLC ile HbA1c Ölçümünde Varyant Hemoglobin İnterferansı

Interference of Variant Hemoglobin in Measurement of HbA1c by Ion-Exchange HPLC

Fatih Yay, Fatma Uçar, Ali Yalçındağ, Lütfüye Tuba Hancı, Esra Çetin, İsmail Temel

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, ANKARA, Türkiye

Başvuru Tarihi: 05 Aralık 2017

Kabul Tarihi: 28 Aralık 2017

* Bu çalışma, XVII. Uluslararası Katılımlı Klinik Biyokimya Kongresi, 03-07 Mayıs 2017, Girne, KKTC'de sunulmuştur.

ÖZET

Giriş: Hemoglobino patilerin ve hemoglobinin kimyasal olarak modifiye olmuş türevlerinin bazı HbA1c ölçüm yöntemlerini pozitif ya da negatif interfere ettiği ispatlanmıştır. Bu çalışmada iyon değişirici kromatografi ile HbA1c değeri alt referans sınırın altında saptanan bir olgu sunulmuştur.

Olgu sunumu: Dahiliye polikliniğine başvuran 55 yaşındaki hastadan istenen HbA1c testinin laboratuvarımızda iyon değişirici HPLC metoduyla ölçülen değeri %2.1 idi. Kromatogramda olağan dışı pikler ve varyant hemoglobin uyarısı görüldü. Varyant hemoglobinin değerlendirilmesi amacıyla Trinity Biotech variant analyzer ile HPLC metoduyla yapılan değerlendirme sonucu HbD Los Angeles %84.4, HbA %6.9, HbA2 %3.9, HbF %4.8 olarak saptandı.

Tartışma: Varyant Hb'ler immün yöntemlerle ölçümde ciddi bir interferansa neden olmazken, iyon değişirici HPLC gibi yük farkına göre ölçüm yapılan yöntemlerde negatif interferansa neden olabilirler. Bu nedenle klinik ile uyumlu olmayan HbA1c düzeylerinde hemoglobin varyantlarının varlığı araştırılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Varyant Hemoglobin; HbD-Los Angeles; HbA1c; İnterferans

ABSTRACT

Background: It has been established that hemoglobinopathies and chemically modified derivatives of hemoglobin, interfered with some HbA1c assay methods either positively or negatively. In this study we present a case with a low HbA1c value as measured by ion-exchange HPLC method.

Case presentation: A 55 year old patient admitted to polyclinic of Internal Medicine and the result of HbA1c was 2.1%, measured by ion-exchange HPLC method in our laboratory. Unusual peaks and warning about variant hemoglobin were detected in the result chromatogram. Following on suspicion of hemoglobin variant sent to referral laboratory, was determined result of HbD-Los Angeles 84.4%, HbA 6.9%, HbA2 3.9%, HbF 4.8% (Trinity Biotech variant analyzer).

Discussion: Variant hemoglobin may cause negative interference in methods such as ion-exchange HPLC, while immunological methods do not cause significant interference in the measurement. Therefore, in the presence of clinically incompatible HbA1c levels, hemoglobin variants should be investigated.

Key Words: Variant Hemoglobin; HbD-Los Angeles; HbA1c; Interference

GİRİŞ

Hemoglobin enzimatik bir reaksiyon olmaktan glikozillenen proteinlerden biridir (1). Yetişkin insan hemoglobini, %97 hemoglobin A (HbA₀), %2.5 HbA₂ ve %0.5 HbF'den oluşmaktadır. HbA₁, hemoglobinin glikozillenmiş hali olup; HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c} fraksiyonlarından oluşur. HbA_{1c}; HbA₁'in %80'nini oluşturan major fraksiyondur (2). HbA_{1c}, hemoglobin yapısındaki β zincirinin N- terminalindeki valinin amino grubuna glukozun enzimatik olmayan bir reaksiyonla geri dönüşümsüz olarak bağlanması ile oluşan yapıdır (3). Amerikan Diyabet Birliği (ADA) HbA_{1c} ölçümünün küresel standardizasyona ve yöntemin analitik performansının geliştirilmesine bağlı olarak diyabetin tanısında kullanımını savunmaktadır (4).

HbA_{1c} ölçümünde yapısal, kimyasal ve elektriksel yük özelliklerine göre geliştirilmiş 30'dan fazla değişik yöntem mevcuttur. HbA_{1c} ölçüm yöntemleri, iyon farkına göre ölçüm yapanlar ve yapısal farklılığına dayananlar olmak üzere iki kategoride sınıflandırılabilir. Yük farkına dayalı metotlar yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), elektroforez ve izoelektrik fokuslama; yapısal farklılığa dayananlar ise boronat affinite kromatografisi ve immünyöntemlerdir (5). ABD'de Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı (NGSP) tarafından HPLC ile HbA_{1c} ölçümü referans yöntem olarak kabul edilmektedir (6).

Bazı HbA_{1c} ölçüm yöntemlerinde hemoglobinopatilerin ve hemoglobinin kimyasal olarak değişime uğraması ile oluşan türevlerinin (üremik hastalardaki Karbamile Hemoglobin gibi), ölçümü pozitif ya da negatif interfere ettiği kanıtlanmıştır (7). Bu çalışmada, kliniği ile uyumsuz olarak iyon değiştirici HPLC yöntemi ile HbA_{1c} değerini referans aralığın altında saptadığımız bir olguyu inceledik.

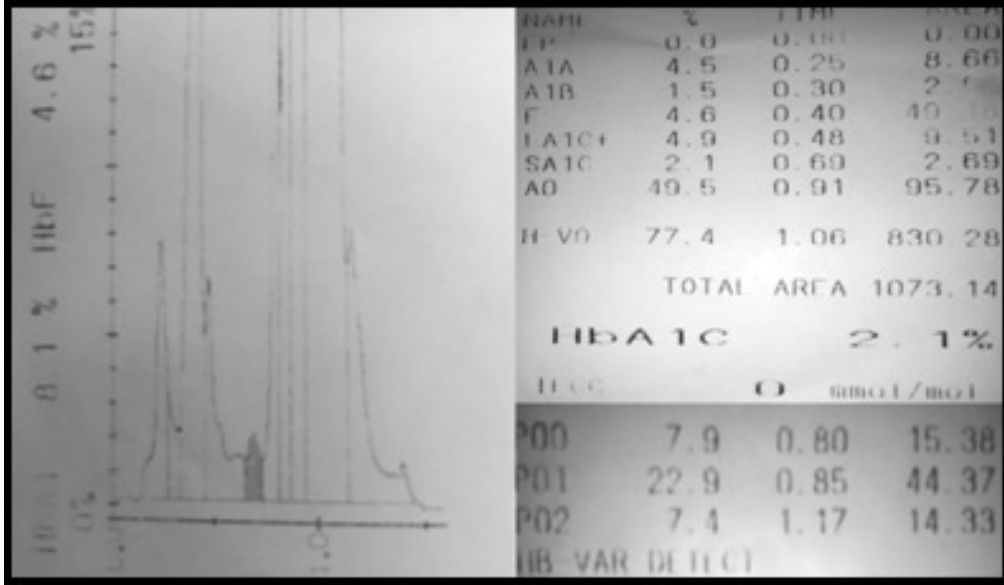
OLGU SUNUMU

Hastanemiz Dahiliye Polikliniğine kırgınlık ve yorgunluk şikayetiyle başvuran 55 yaşında bayan hasta; anemi, diabetes mellitus, hipotiroidi ve romatolojik hastalıklar ön tanılarıyla değerlendirildi. Hastanın rutin tam kan ve serum analizi sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir. HbA_{1c}'nin laboratuvarımızda iyon değiştirici HPLC metoduyla (Tosoh Bioscience, Inc., South San Francisco, ABD) ölçülen değeri %2.1 idi ve referans aralığın altındaydı (Referans aralık:%4-6). Kromatogramda HbA₀'dan önce ve sonra olağan dışı pikler ve cihazdan alınan raporda varyant hemoglobin uyarısı görüldü (Şekil 1). Aynı numune Beckman Coulter AU-680 otoanalizöründe immün yöntemle çalışıldı ve HbA_{1c} değeri %4.75 olarak ölçüldü. İyon değiştirici HPLC metoduyla ölçülen HbA_{1c} sonucundaki düşüklüğün varyant hemoglobin nedeni ile olabileceği düşünüldü. Varyant hemoglobinin araştırılması amacıyla Trinity Biotech variant analizör cihazında HPLC metoduyla yapılan değerlendirme sonucu HbD Los Angeles %84.4, HbA %6.9 (referans aralık: %96.5-98.6), HbA₂ %3.9 (referans aralık: %1.4-3.5), HbF %4.8 (referans aralık: <%2.0) olarak saptandı (Şekil 2).

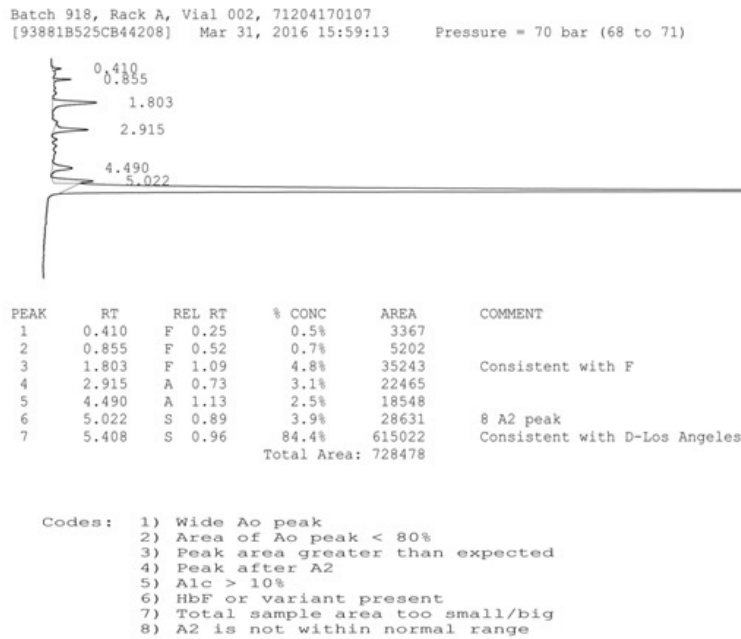
Tablo-1. Hastaya ait test sonuçları

Table 1. Patient report

Hasta Test Sonucu		Referans aralık
RBCx10 ⁹ /μL	5.77	3.84-5.62
WBCx10 ³ /μL	4.7	3.57-11.01
Hemoglobin g/dL	10.5	11.7-15.5
MCV fL	60.7	73.54-96.48
MCH pg	18.2	23.90-33.58
MCHC g/dl	30	32.27-35.07
RDW %	20.7	12.14-16.49
Açlık glukozu mg/dl	80	74-106
Ferritin ng /ml	42.3	11 - 306.8
Sedimentasyon TSH μIU/mL	2	0-20
	1.25	0.58 - 1.6



Şekil 1. Tosoh cihazından alınan hastaya ait sonuç raporu ve kromatogram görüntüsü Figure 1. Patient report from Tosoh instrument and its chromatogram



Şekil 2. Trinity Biotech variant analyzer cihazından alınan hastaya ait sonuç raporu ve kromatogram görüntüsü
Figure 2. Patient report from Trinity Biotech variant analyzer instrument and its chromatogram

TARTIŞMA

Hemoglobinin HbA1c ölçümüne etkisi kullanılan metoda göre değişir. Ayrıca bu hastalarda artmış transfüzyon gereksinimi, eritrosit yaşam süresinin değişmesi gibi etkenler de ölçümün değerini sınırlandırmaktadır (3,8). Sık görülen hemoglobin varyant-

larından HbS ve HbC yüke bağlı ayırım yapan ölçüm tekniklerinde yanlış düşük sonuçlara neden olur (3,9). İmmün yöntemde ise hemoglobinin β zincirinin N-terminal ucundaki ilk 4-8 aminoasite karşı geliştirilen antikorlar kullanılır. Varyant Hb'ler immün ölçümde ciddi bir interferansa yol açmazlar ancak HbF

yüksekliğine bağlı düşük sonuçlara rastlanabilmektedir (10,11).

Yeo-Min Yun ve arkadaşları, Kore popülasyonunda görülen çeşitli Hb varyantlarının 5 rutin HbA1c testindeki etkisini (bir kapiller elektroforez, bir immunoassay ve üç iyon değiştirici HPLC yöntemi) IFCC referans ölçüm yöntemi olan HPLC-mass spectrometry (MS) ile karşılaştırmışlar ve 5 rutin testin her birinde farklı derecelerde bias gözlemlemişlerdir. Tina-quant immunoassay ve Capillarys 2 göreceli olarak daha doğru sonuç verip varyantlardan minimal etkilenirken; Tosoh HLC-

723 G8 standard mode ve Arkray ADAMS HA-8180 analizörleri hemoglobin varyantı olan tüm numunelerde önemli derecede negatif bias göstermiş ve numunelerin %89'dan fazlası izin verilebilir bias olan %7'yi aşmıştır (12).

Randie R. Little ve arkadaşları, boronat afinite kromatografisini (Primus ultra2 HPLC) karşılaştırma metodu olarak kullandıkları 23 metodlu bir çalışmada; Hb varyantlarını ayırt edemediği için immunoassay, enzimatik ve boronat afinite metodlarında HbE ve HbD trait interferansı tespit edemediler, ancak iyon değiştirici HPLC yöntemlerinin hepsinde HbE ve/veya HbD interferansı tespit etmişler ve Variant II Turbo'nun yanlış yüksek değerlerinin ise yanlış düşük sonuç verdiğini görmüşlerdir. Ayrıca, Tosoh G8 ile HbA1c ölçümünde, HbD trait varyant piki olduğunda sonucun raporlanabilir olduğunu, HbE trait varlığında ise sonuç raporunun kabul edilemez olduğunu belirtmişlerdir. Varyant analizi için kromatogramların kullanılıp kullanılmayacağı konusu ile ilgili olarak; HbE trait kromatogramları HbAA'dan ayırt edilebildiği için kabul edilebilirken, HbD trait için olan raporların kullanılamaz olduğunu tespit etmişlerdir (13).

HPLC ile HbA1c ölçümü sırasında rastgele saptanması nedeniyle varyant hemoglobinlerin sayı ve insidansı artmaktadır (14). Ulusal Hemoglobinopati Konseyinin 5 yıl boyunca toplam 377.339 kişide yaptığı tarama çalışmaları sonucunda, ülkemizdeki talasemi ve

hemoglobinopati sıklığı % 4.3 olarak tespit edilmiştir (15). Hb S dünyada ve ülkemizde en sık görülen anormal hemoglobin olarak karşımıza çıkmaktadır. Altay, 2002 yılında, son 40 yılda yapılan anormal hemoglobin çalışmalarını inceleyerek ülkemizde anormal hemoglobinler içinde sıklıklarına göre ilk sırada Hb S sonra Hb D-Los Angeles görüldüğünü ve Türkiye'de Hb D-Los Angeles görülme sıklığının % 0.2 olduğunu yayınlamıştır (16). Dikker ve arkadaşları da, 1894 farklı hastaya ait hemoglobin varyant analizi sonuçlarını retrospektif olarak değerlendirmişler; dünya ve ülkemizdeki sıklığına benzer olarak en sık Hb S ikinci sıklıkla ülkemizdekine benzer şekilde Hb D-Los Angeles varyantını tespit etmişlerdir (17).

Hb D Punjab (Hb D Los Angeles), β -globin zincirinin 121. pozisyonundaki glutamik asitin glutamin ile yer değiştirdiği bir Hb varyantıdır. Homozigot bir hasta kanından yapılan HPLC analizinde normal ya da az miktarda yükselmiş HbF ve HbA2 pikleri ve Hb D pozisyonunda da total hemoglobinin %90'ından daha fazla geniş bir pik görülür. Tam kan sayımında Hb, MCV ve MCHC'de hafif düşüklük ve periferik yaymada hedef hücreler gözlenir. Klinik olarak da hasta hafif anemiktir (18) .

İnterferansla mücadele adına yapılan bir çalışmada Erna Lenters-Westra, Tosoh G8 analizörünün yazılımını güncelleyerek yaygın görülen varyant hemoglobinlere bağlı interferansı çözmüştür. Eski yazılım HbAS ve HbAE ile önemli interferans gösterirken, güncel versiyonda çalışılan bu varyantlar ile interferans gözlenmemiştir. Özellikle yıllardır Tosoh analizörleri için problem olan HbAE'nin güncellemeyle ortadan kalkması şaşırtıcıdır (19).

Sonuç olarak Varyant Hb'ler immün ölçümde ciddi bir interferansa neden olmazken, iyon değiştirici HPLC gibi yük farkına göre ölçüm yapan yöntemlerde negatif interferansa neden olabilirler. Bu nedenle klinik ile uyumlu olmayan HbA1c düzeylerinde, numuneler farklı bir metotla çalışılmalı ve hemoglobin varyantlarının varlığı araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Rahbar S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clinica Chimica Acta*. 1968;22(2):296-8.
2. Sacks DB, Diabetes Mellitus. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Fifth edition. St. Louis, missouri:Elsevier saunders; 2012. p. 1441.
3. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40(1):78-89.
4. American diabetes association. Standards of medical care in diabetes-2012. *Diabetes Care*. 2012;35(Suppl):11-63.
5. John WG, Mosca A, Weykamp C, Goodall I. HbA1c standardisation: history, science and politics. *Clin Biochem Rev*. 2007;28(4):163-8.
6. Gillery P. A history of HbA1c through Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med*. 2013; 51(1):65-74.
7. Thevarajah TM, Nani N, Chew YY. Performance evaluation of the Arkray Adams HA-8160 HbA1c analyser. *Malays J Pathol*. 2008;30(2): 81-6.
8. Jeppsson JO, Jermtorp P, Sundkvist G, Englund H, Nylund V. Measurement of hemoglobin A1c by a new liquid-chromatographic assay: methodology, clinical utility, and relation to glucose tolerance evaluated. *Clin Chem*. 1986;32(10):1867-72.
9. Roberts WL, Chiasera JM, Ward-Cook KM. Glycohemoglobin results in samples with hemoglobin C or S trait: a comparison of four test systems. *Clin Chem*. 1999;45(6 Pt 1):906-9.
10. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, Fujimoto EK, Mallia AK, Smith PK, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. *Clin Chem*. 1982;28(10):2088-94.
11. Iwamoto H, Motomiya Y, Miura K, Morisawa M, Yoshimura Y, Maruyama I. Immunochemical assay of hemoglobin with N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine at lysine 66 of the beta chain. *Clin Chem*. 2001;47(7):1249-55.
12. Yun YM, Ji M, Ko DH, Chun S, Kwon GC, Lee K, et al. Hb variants in Korea: effect on HbA 1c using five routine methods. *Clin Chem Lab Med*. 2017;55(8):1234-42.
13. Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, Connolly S, Higgins T, Weykamp CW, et al. Effects of Hemoglobin (Hb) E and HbD Traits on Measurements of Glycated Hb (HbA 1c) by 23 Methods. *Clinical Chemistry*. 2008;54(8):1277-82.
14. Higgins T, M Sc, Eckfeldt JH, Barton JC, Doumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Fifth edition, St. Louis, missouri:Elsevier saunders; 2012.p.995.
15. Canatan D, Aydınok Y. T.C. Sağlık Bakanlığı AÇSAP Genel Müdürlüğü, hemoglobinopati kontrol programı. Talasemi ve hemoglobinopatiler tanı ve tedavi kılavuzu. Antalya, 2007;29.
16. Altay Ç. Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Haematol*. 2002;19(1):63-74.
17. Dikker O, Vardar M, Sandıkçı R, Basat B, Sucu V, Vurgun E, et al. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında HPLC Yöntemi ile Saptanan Anormal Hemoglobin Varyantları. *Okmeydanı Tıp Dergisi*. 2016; 32(4):185-9.
18. Higgins T, M Sc, Eckfeldt JH, Barton JC, Doumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, eds. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Fifth edition. St. Louis, missouri:Elsevier saunders; 2012.p.998.
19. Lenters-Westra E. Common Hb-variants show no longer interference on the Tosoh G8 after an update of the software. *Clinica Chimica Acta*. 2016;463:73-4.

Yazışma adresi:

Fatih Yay

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Ankara

E-mail: fatihyaygazi@gmail.com