

Short Communications

Evaluatie van HbA1c middels capillaire elektroforese met de Capillarys 2 Flex Piercing analyzer

A.J. BAKKER, A. Vlieg, M. SOBAHI, B. van der VEEN en A. WOLTHUIS

HbA1c wordt als maat voor het gemiddelde glucose-niveau van de voorgaande 3 maanden gebruikt voor controle van de langere termijn instelling van Diabetes Mellitus. Routinematig wordt HbA1c gemeten met chromatografische (HPLC) dan wel immunochemische meetmethoden. De chromatografische meetmethoden hebben korte runtijden, maar kunnen worden beïnvloed door de aanwezigheid van Hb-varianten. Bij immunochemische methoden wordt het HbA1c resultaat verkregen uit een tweetal metingen, namelijk het HbA1c en het totaal Hb. Het gevolg is doorgaans een wat grotere spreiding in vergelijking tot de chromatografische meetmethoden. Sinds kort is aan dit arsenaal bepalingmethoden de capillaire elektroforese (CE) toegevoegd, waarbij de verschillende Hb-fractionen elektroforetisch van elkaar worden gescheiden in een alkalische buffer. Het voordeel van deze methode zou kunnen zijn dat Hb-varianten het HbA1c resultaat minder beïnvloeden dan bij HPLC het geval is. In het hier gepresenteerde onderzoek is

het analytisch presteren van de Capillarys-2-Flex-Piercing analyzer (CE, Sebia Benelux s.a., Brussel, België) voor de HbA1c vergeleken met de Cobas-Integra-800 (Immunochemie, Roche Diagnostics Nederland B.V., Almere) en de Tosoh-G8 (HPLC, Sysmex Nederland B.V., Etten-Leur).

Methoden

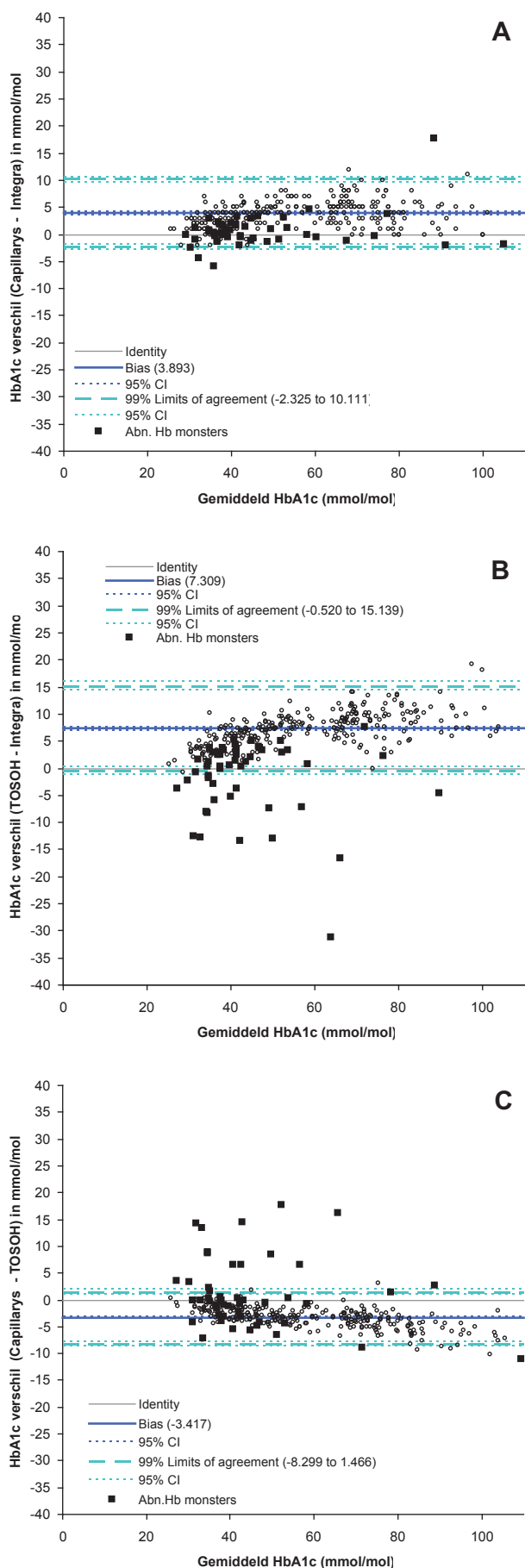
Voor dit onderzoek werden alle methoden gebruikt overeenkomstig de instructies van de leveranciers. De calibratie van de Integra-800 was aangepast overeenkomstig het advies van Roche Nederland. De reproduceerbaarheid werd getest met een 15-daags EP-15 protocol (triplo analyse van 3 controlemonsters). Voor de Capillarys-2-Flex-Piercing analyzer werd dit voor elk capillair gedaan. De controlebloedjes werden bereid door op 3 niveaus (HbA1c: ca. 40, 60 en 85 mmol/mol) voldoende bloed van patienten te verzamelen, zodat op elk van de 3 systemen het EP-15 protocol volledig kon worden uitgevoerd. De pools werden uitverdeeld

Tabel 1. Overzicht van de binnen-run, tussen-run en totale variatie voor de HbA1c-systemen.

Procedure	QC ₁ (gem.±SD)	CV ₁	QC ₂ (gem.±SD)	CV ₂	QC ₃ (gem.±SD)	CV ₃
<i>Binnen-run variatie</i>						
Integra-800	39,3±0,6	1,6%	60,2±0,8	1,3%	86,5±1,9	2,2%
Tosoh-G8	43,1±0,7	1,5%	66,0±0,4	0,7%	91,6±0,5	0,5%
Capillarys-2 (range per individueel capillair)	40,2–40,9 ± 0,5–0,8	1,2–2,1%	61,4–62,8 ± 0,6–0,9	1,0–1,4%	84,6–86,4 ± 0,6–0,9	0,8–1,1%
<i>Tussen-run variatie</i>						
Integra-800	39,3±1,6	3,7%	60,2±1,9	3,2%	86,5±2,1	2,4%
Tosoh-G8	43,1±0,9	2,1%	66,0±0,9	1,4%	91,6±1,0	1,1%
Capillarys-2 (range per individueel capillair)	40,2–40,9 ± 0,6–1,1	1,5–2,8%	61,4–62,8 ± 0,8–1,0	1,3–1,6%	84,6–86,4 ± 0,6–0,9	0,7–1,2%
<i>Capillarys-2: totale variatie</i>						
range per dag	39,6–41,2 ±	1,4–2,5%	61,4–63,3 ±	1,2–1,8%	85,0–86,1 ±	1,0–1,4%
15-dagen	0,56–1,04 40,5±0,9	2,1%	0,71–1,15 62,2±1,0	1,6%	0,81–1,16 85,5±1,0	1,2%

St. Klinisch Chemisch Laboratorium, Leeuwarden

E-mail: a.j.bakker@kcl.znb.nl



Figuur 1. Verschil grafieken van de HbA1c waarden verkregen met Capillary2 en Integra-800 (A), Tosoh-G8 en Integra-800 (B) en Capillary2 en Tosoh-G8 (C) voor normale HbA1c monsters (open rondjes) en abnormale Hb monsters (gesloten vierkantjes).

en ingevroren tot analyse. Daarnaast werden zowel routine monsters ($n=265$) voor HbA1c als een aantal monsters met een abnormaal hemoglobine ($n=55$) of neonatale monsters met overwegend HbF ($n=8$) op de drie systemen geanalyseerd en vergeleken (procedure Passing-Bablok). Tevens werd onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om hemolysaten (conform de voor elk systeem geldende instructies) en filterkaartjes te gebruiken. Voor de statistische verwerking van de resultaten is de Analyse-It software voor Excel-2003 gebruikt.

Resultaten

Voor de evaluatie van de binnen-run en tussen-run variatie werd gedurende 15 dagen het EP-15 protocol gevolgd. De resultaten staan vermeld in tabel 1. Voor de Capillary2 zijn naast resultaten per individueel capillair ook de totale variaties per dag en de looptijd van het EP-15 protocol vermeld.

Tijdens het EP-15 protocol werden, behalve de controlemonsters, ook 265 patiëntenmonsters geanalyseerd met de drie analyzers. Met de methode volgens Passing en Bablok werden de volgende correlaties gevonden: Capillary2=1,05 (1,03-1,06) x Integra + 1,73 (0,75-2,73), $r=0,9915$, bias(C2FP-Integra): 3,89 (3,6-4,2); Capillary2=0,94 (0,93-0,95) x Tosoh-G8 + 0,27 (-0,20-0,75), $r=0,9968$, bias(C2FP-Tosoh-G8): -3,42 (-3,6- -3,2); Tosoh-G8=1,12 (1,10-1,14) x Integra + 1,02 (-0,05-2,20), $r=0,9913$, bias(Tosoh-G8 - Integra): 7,31(6,9-7,7), waarbij de tussen haakjes geplaatste cursief gedrukte range het 95%-betrouwbaarheidsinterval is.

Analyse van 15 SKML monsters laat zien dat de Capillary2 gemiddeld 2 mmol/mol hoger meet dan de Integra terwijl de Tosoh-G8 daar gemiddeld weer 2 mmol/mol boven zit, waarbij de Integra-800 gemiddeld ca. 0,5 mmol/mol onder de IFCC-richtwaarde zit. Hoewel wat minder extreem dan de bias van de patiëntenmonsters laten deze SKML monsters dezelfde trend zien.

De monsters met een Hb-pathie ($n=55$) of HbF ($n=8$) geven met de Integra-800 bij 10/63 een ogenschijnlijk fout-laag resultaat hetgeen betekent dat er bij deze 10 monsters een onwaarschijnlijk laag resultaat van <20 mmol/mol wordt gevonden. De Capillary2 geeft bij 10/60 monsters geen resultaat omdat in aanwezigheid van overwegend HbF er geen goede identificatie van HbA₀ plaatsvindt en dus geen HbA1c kan worden geïdentificeerd. De Tosoh-G8 geeft bij 9/63 een melding van een te laag schotelgetal om HbA1c te meten (maat voor kwaliteit van de scheiding) en bij 39/63 een waarschuwing om te attenderen op een mogelijk abnormaal Hb. In het onderlinge vergelijk van Capillary2-Integra, Capillary2-Tosoh-G8 en Tosoh-G8-Integra vallen resp. 4/50, 20/50 en 20/52 buiten de 99%-range voor de bias bij de normale monsters (zie figuur 1).

Vergelijking van de Integra resultaten van hemolysaten ($n=51$) met de volbloed analyse (Integra) geeft in het lage gebied hogere resultaten en in het hoge gebied lagere resultaten dan de resultaten met volbloed (hem. Int=0,76 (0,71-0,80) x volbloed + 12,30 (10,04-15,64); $r=0,9747$; bias(hem.Int-volbloed): -1,34 (-3,09-0,41)).

Indien hemolysaten met de Tosoh-G8 worden gemeten dan zijn de resultaten structureel iets hoger: hem. G8=1,06 (1,00-1,16) x volbloed + 5,52 (0,60-8,23); r=0,9844; bias(hem.G8-volbloed): 8,10 (-7,01-9,19). Ook de Capillary-2 meet de hemolysaten structureel iets hoger: hem.Cap=1,00 (0,93-1,02) x volbloed + 6,00 (4,57-9,21); r=0,9884; bias(hem.cap-volbloed): 5,24 (4,39-6,08).

Filterkaartjes worden routinematig met de immunochemische procedure gebruikt voor de analyse van HbA1c. Bij de capillaire elektroforese komt te weinig hemoglobine in het capillair voor een betrouwbare meting en procedure met de Tosoh-G8 vraagt nog verdere optimalisatie.

Conclusies

Qua reproduceerbaarheid presteert de Capillary-2 vergelijkbaar met de Tosoh-G8 en beter dan de Integra-800. Bij monsters met een Hb-pathie heeft de Tosoh-G8 duidelijk meer problemen om een HbA1c resultaat te produceren dan de Integra en de Capillary-2. De laatste 2 hebben allebei problemen met neonatale monsters waarin overwegend HbF aanwezig is; de Integra-800 meet het HbA1c in deze monsters te laag, terwijl de Capillary-2 geen resultaat geeft omdat geen goede identificatie van de piek kan worden verkregen. Tot slot blijkt alleen de Integra-800 HbA1c via de filterkaartjes procedure te kunnen meten, terwijl hemolysaten met alle drie methoden kunnen worden gebruikt.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2013; 38: 128-130

Afwijkende vervormbaarheid van erythrocyten met een hemoglobinopathie

P. FRANCK, P. BUIJS, A. SPAANS, C. POSTMA, F. HUDIG en J.L. KERKHOFFS

De erythrocyt van patiënten met een erfelijke hemolytische anemie zijn zwakker van opbouw. De oorzaak hiervan zijn mutaties in het hemoglobine, de enzymen of de eiwitten van het membraanskelet. Deze afwijkingen beïnvloeden de conditie van de cel en zorgen voor een verkorte levensduur. Bij cellen met een membraan defect is deze verzwakking meetbaar in een ektacytometer (1, 2).

In deze analyzer wordt gekeken naar de vervormbaarheid van de erythrocyt, door een 'shear stress' op de cellen aan te brengen (1). De mate van vervormbaarheid wordt uitgedrukt in de Elongation Index (EI), waarbij gekeken wordt naar de uitrekbaarheid van de cel als maat voor de vervormbaarheid (figuur 1A).

Optimale flexibiliteit is essentieel voor een functionele erythrocyt in de kleine haarvaten. De zeefwerking in de milt is mede hierop gebaseerd. Oude cellen zijn minder vervormbaar en niet in staat om de poriën van de sinussen te passeren en worden weggevangen uit de bloedsomloop.

Over de relatie tussen de vervormbaarheid, het type mutatie, maar ook de ernst van de anemie is veel onderzoek gedaan bij hemolytische anemieën met een membraan defect. Het wordt als een betrouwbare diagnostische test gebruikt (3, 4).

Cellen van patiënten met een hemoglobino (Hb)-pathie hebben eveneens een veranderde membraansamenstelling. Deze wordt veroorzaakt door neerslag van (hemo)globine moleculen (Heinz bodies) op het membraan of een verstoord integriteit van het membraanskelet als gevolg van een toegenomen oxidatieve

stress (5). Bij sikkelcelanemie kan dit uiteindelijk leiden tot irreversibele vorming van sikkelcellen.

In onze studie wordt de vervormbaarheid van rode bloedcellen van patiënten met verschillende Hb-pathieën onderzocht, waaronder α - en β -thalassemie en sikkelcelanemie.

Materiaal en methode

Hemoglobine HbS, HbF en HbA₂ (β -thalassemie) is aangetoond met behulp van capillaire elektroforese (Capillary 2, Sebia). Mutatie onderzoek van het α -globine gen is uitgevoerd met behulp van DNA amplificatie technieken. De verschillende α deleties zijn bepaald door gebruik te maken van specifieke primer sets voor de 4 meest voorkomende deleties 3,7 kb, 4,2 kb, SEA en MED, gevolgd door agarose MP-elektroforese. Ook werd gebruik gemaakt van een reverse-hybridisatie StripAssay voor de screening op 21 α -globine deleties/mutaties die minder vaak voorkomen met een eventueel vervolgonderzoek. DNA is met behulp van QIAGEN DNA isolatiekit geïsoleerd uit buffy coat/witte bloedcellen afkomstig uit perifere bloed.

De vervormbaarheid van erythrocyten wordt gemeten met behulp van de ektacytometer LoRRca Maxis Osmoscan (Mechatronics). Als maat voor de vervormbaarheid wordt de rekbaarheid/Elongation Index (EI) van de cel onder veranderende osmolaliteit (50 - 500 mOsm/kg) in een viskeus PVP medium gemeten, waarbij de aangebrachte shear stress op de cellen constant is (1). Karakteristieke punten in de curve zijn de EI-max/O-max en EI-min/O-min, waarbij respectievelijk de maximale en minimale rekbaarheid van de cel wordt uitgedrukt (figuur 1A). Er is alleen bloed van patiënten met een Hb-pathie onderzocht die geen (recente) bloedtransfusie hebben gehad.

HagaZiekenhuis, Lab West, Den Haag

E-mail: p.franck@hagaziekenhuis.nl