

Hemolytische index en haptoglobine bepaling

E.H. JENINGA, J. DINKELAAR, A. LEYTE en I.A. HAAGEN

Haptoglobine is een transport- en acuut-fase eiwit, dat in hepatocyten wordt gesynthetiseerd. Het bindt irreversibel vrij hemoglobine en wordt snel en effectief uit de circulatie verwijderd door het reticulo-endotheliale-systeem. Op deze manier wordt bij intravasale hemolyse (IVH) hemoglobininurie en daarmee renaal ijzerverlies voorkomen. De haptoglobineconcentratie in serum/plasma zal in geval van IVH verlaagd zijn. In het laboratorium van het OLVG wordt haptoglobine met behulp van een immunoturbidimetrische methode (Tina-quant) van Roche bepaald. Het is bekend dat hemolyse interfereert, echter er wordt geen maximaal toelaatbare hemolytische index (HI) vermeld. Daarom hebben we zelf deze HI bepaald volgens het EP7-A2 protocol. Uit dit onderzoek blijkt dat de mate waarin hemolyse interfereert met de haptoglobine bepaling afhankelijk is van de concentratie haptoglobine en tevens een maximum bereikt. Het is daarom van groot belang om voor het stellen van een maximaal toelaatbare HI uit te gaan van een monster met een haptoglobineconcentratie rond de klinische beslisgrens.

Trefwoorden: haptoglobine, hemolytische index, intravasale hemolyse

Methode

Om de maximaal toelaatbare hemolytische index voor de immunoturbidimetrische haptoglobine bepaling (Tina-quant) van Roche vast te stellen werd er gewerkt volgens het EP7-A2 protocol (1). Poolplasma's werden samengesteld met lage (< 0,40 g/l), normale (0,40-2,45 g/l) en hoge (> 2,45 g/l) haptoglobine concentraties. Daarnaast werd een hemolysaat gemaakt als volgt: een lithium-heparine buis werd gedurende 10 minuten gecentrifugeerd bij 1500 g. Vervolgens werd het plasma verwijderd en het pellet 3 maal gewassen met PBS. Het gewassen pellet werd geresuspendeerd in gedestilleerd water, 30 minuten bij kamertemperatuur bewaard en vervolgens overnacht in de -80°C vriezer bewaard. Het monster werd in 10 minuten ontdooid bij 37°C, waarna het 10 minuten werd gecentrifugeerd bij 1500 g en het supernatant werd verzameld. De hemolytische index werd bepaald met de serumindex bepaling op de P800-module (Roche Diagnostics). Deze methode is gebaseerd op een berekening uit de absorptie van een bichromatisch golflengtepaar, welke voor de hemolytische index gerelateerd is aan de concentratie

vrij hemoglobine in het monster. De plasmapools werden in twee gelijke delen gesplitst. Aan het ene deel werd gedestilleerd water toegevoegd (<10% v/v: monster A) en aan het andere deel hemolysaat in gedestilleerd water (< 10% v/v; monster B). Vervolgens werden beide monsters in verschillende verhoudingen gemengd. In een eerste experiment werden de monsters gemengd om vooraf ten doel gestelde hemolytische indices in het monster te bewerkstelligen (i.e. HI 0, 30, 60, 90, 120; verhouding A:B resp.: 4:0, 3:1, 2:2, 1:3 en 0:4). In het volgende experiment werden de monsters gemengd om bepaalde hemoglobine/haptoglobine ratio's (i.e. 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40) te bewerkstelligen (verhouding A:B resp.: 10:0, 9:1, 8:2, 7:3 ... 0:10). De concentratie haptoglobine en de hemolytische index werden in deze monsters bepaald op de P800-module. De resultaten werden verwerkt met behulp van Excel. Voor het vaststellen van de maximaal toelaatbare hemolytische index werd als acceptatiecriterium een procentuele afwijking $\leq 10\%$ als gevolg van hemolytische interferentie aangehouden.

Resultaten

Naar aanleiding van onderzoek door andere laboratoria naar de afwijkingen van de haptoglobine concentratie als gevolg van hemolyse (2, 3) werd ervoor gekozen de mogelijke interferentie te meten bij een hemolytische index van 0 tot 120 voor plasmapools met een lage, normale en hoge haptoglobine concentratie (0,31 g/l, 1,59 g/l en 3,91 g/l, respectievelijk). De concentratie haptoglobine en de hemolytische index van de bereide monsters werden bepaald op de P800-module. Vervolgens werd de recovery (concentratie haptoglobine in het monsters met hemolysaat als percentage van de concentratie in het monster zonder hemolysaat) uitgezet tegen de hemolytische index (HI), zie figuur 1A (zwarte lijnen met open symbolen). Hierin is te zien dat de recovery in de monsters afneemt met een toename van de HI en bovendien dat hoe lager de concentratie van haptoglobine in de plasmapool is, hoe lager de HI is waarbij de recovery begint af te nemen. Tevens valt op dat bij de plasmapools met een lage en normale haptoglobine concentratie (0,31 g/l en 1,59 g/l respectievelijk) de recovery vanaf een bepaalde HI niet meer verder afneemt, deze lijkt een maximum te bereiken. Dit effect is niet te zien bij de plasmapool met een hoge haptoglobine concentratie (3,91 g/l). Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de hemoglobine/haptoglobine ratio in dit monster veel lager is dan bij de monsters met de lage en normale haptoglobine concentratie. Dit suggereert dat de recovery van haptoglobine in de plasmapool met een hoge haptoglobine concentratie zal gaan afnemen

Hematologisch Klinisch Chemisch Laboratorium, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

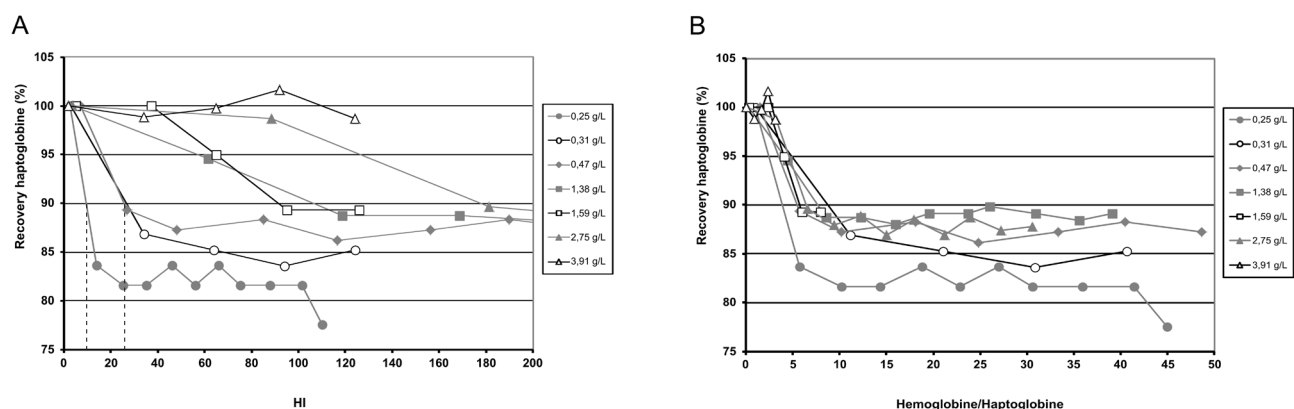
E-mail: e.h.jeninga@olvg.nl

bij een HI groter dan 120, dus naarmate de hemoglobine/haptoglobine ratio hoger wordt. Om dit nader te onderzoeken werden nieuwe monsters bereid, waarbij de verhoudingen van hemoglobine ten opzichte van haptoglobine in vier verschillende plasmapools (0,25 g/l, 0,47 g/l, 1,38 g/l en 2,75 g/l respectievelijk) gelijk werd gehouden. De resultaten hiervan zijn opgenomen in figuur 1A (grijze lijnen met dichte symbolen). Hierin is te zien dat de recovery van haptoglobine in de vier plasmapools afneemt naarmate de HI toeneemt waarna deze een minimum bereikt, in overeenstemming met de plasmapools met een haptoglobine concentratie van 0,31 g/l en 1,59 g/l. Opvallend is dat hoe lager de haptoglobine concentratie in de plasmapool is, hoe lager de HI is waarbij de minimale recovery (en dus de maximale interferentie) wordt bereikt. Dit blijkt afhankelijk te zijn van de verhouding hemoglobine ten opzichte van haptoglobine zoals te zien is in figuur 1B, waarbij de recovery van haptoglobine is uitgezet tegen de hemoglobine/haptoglobine ratio. De afname in recovery van haptoglobine bereikt een minimum, deze 'plateaufase' wordt bereikt bij een hemoglobine/haptoglobine ratio tussen de 5 en 10 voor alle haptoglobine concentraties die zijn gemeten.

Discussie

In de bijsluiters van de immunoturbidimetrische haptoglobine bepaling (Tina-quant) voor de P800-module van Roche staat vermeld dat hemolyse met deze bepaling interfereert. Dit wordt eveneens gerapporteerd in de literatuur voor zowel immunoturbidimetrische als nefelometrische bepalingen (2, 3). Ondanks dat Roche in de bijsluiters aangeeft dat hemolyse een verlaging van 10-15% van de haptoglobineconcentratie kan geven, wordt er geen hemolytische index opgegeven vanaf welke dit effect optreedt. In dit onderzoek hebben we daarom zelf de maximaal toelaatbare hemolytische index bepaald volgens het EP7-A2 protocol. Hieruit blijkt dat de mate waarin hemolyse interfereert met de haptoglobine bepaling afhankelijk is van de concentratie haptoglobine. Dat wil zeggen: van de hemoglobine/haptoglobine ratio (zie figuur 1B). Haptoglobine bindt

irreversibel vrij hemoglobine. Onze hypothese is dat de mate waarin hemolyse interfereert met de haptoglobine bepaling afhankelijk is van de mate van verzadiging van haptoglobine met vrij hemoglobine. De procentuele verlaging van de gemeten haptoglobine concentratie als gevolg van hemolyse bereikt een maximum, waarbij een hogere HI niet tot een verdere daling in haptoglobine concentratie leidt (zie figuur 1A). Dit is de concentratie vrij hemoglobine (HI), waarbij alle haptoglobine verzadigd is. Een gram haptoglobine (omgerekend 10 μ mol) bindt 20-120 μ mol hemoglobine/liter plasma afhankelijk van het haptoglobine phenotype (4). In theorie betekent dit dat haptoglobine verzadigd is bij een hemoglobine/haptoglobine ratio tussen de 2 en 12. Onze resultaten zijn hiermee in overeenstemming, aangezien de maximale afwijking in haptoglobine concentratie als gevolg van hemolytische interferentie wordt bereikt bij een hemoglobine/haptoglobine ratio tussen de 5 en 10 (figuur 1B). Opvallend is dat de maximale afwijking voor de plasmapools met een lage haptoglobine concentratie (0,25 g/l en 0,31 g/l) groter is dan 15%, terwijl dat voor concentraties $\geq 0,47$ g/l tussen de 10 en 15% ligt, hetgeen overeenkomt met wat in de bijsluiters van Roche vermeld staat. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de haptoglobine concentraties $\leq 0,31$ g/l de lower limit of detection (LOD) van de haptoglobine bepaling (0,20 g/l) naderen. Hoe dichter de haptoglobine concentratie de LOD nadert, des te kleiner wordt de signal-to-noise ratio met als gevolg dat de meting minder betrouwbaar wordt. De grotere maximale afwijkingen die worden gemeten bij de plasmapools met een lage haptoglobine concentratie kunnen mogelijk verklaard worden door de grotere CV bij deze concentraties als gevolg van de afgenomen signal-to-noise ratio's. Daarnaast is het interessant om te vermelden dat een studie van Bossuyt et al. laat zien dat de maximale negatieve interferentie (variërend van 20% tot 50%) door hemolyse bij een bepaalde haptoglobine concentratie platform onafhankelijk, maar reagens afhankelijk is (3). Mogelijk zijn de antistoffen in de reagentia, waarbij een grote negatieve



Figuur 1. (A) Recovery van haptoglobine (%) uitgezet tegen de hemolytische index (HI) voor de verschillende plasmapools. Resultaten eerste experiment (zwarte lijnen met open symbolen); resultaten tweede experiment (grijze lijnen met dichte symbolen). Om het figuur overzichtelijk te houden loopt de schaal van de x-as tot een HI van 200. Echter de punten van de plasmapools die van de x-as aflopen hebben de 'plateaufase' bereikt, zoals te zien is in (B). (B) Recovery van haptoglobine (%) uitgezet tegen de hemoglobine/haptoglobine ratio voor de verschillende plasmapools. Resultaten eerste experiment (zwarte lijnen met open symbolen); resultaten tweede experiment (grijze lijnen met dichte symbolen).

interferentie als gevolg van hemolyse wordt gezien, gericht tegen een epitoom op haptoglobine dat minder makkelijk herkend kan worden als haptoglobine een complex met hemoglobine heeft gevormd.

In ons validatieplan werd een afwijking in de haptoglobine concentratie van $\leq 10\%$ als gevolg van hemolytische interferentie als acceptabel geacht. Als dit wordt toegepast dan kan de HI op 9 ingesteld worden, omdat dat het punt is waarbij de plasmapool met de laagste haptoglobineconcentratie (0,25 g/l) een afwijking kleiner dan 10% laat zien (zie figuur 1A). Een query naar alle haptoglobine bepalingen in ons laboratorium in 2012 laat zien dat 10% van deze monsters een HI hebben hoger dan 9. Dit betekent dat het hanteren van deze grens mogelijk tot veel nieuwe bloedafnames leidt. Echter een gemeten verlaging als gevolg van in-vitro hemolyse is bij een haptoglobine concentratie van 0,25 g/l klinisch niet relevant, omdat deze waarde al onder de ondergrens van het referentiegebied (0,40-2,45 g/l) ligt. Bij een haptoglobine concentratie van 0,40 g/l daarentegen zal hemolytische interferentie leiden tot een gemeten haptoglobine concentratie onder de ondergrens met een minimum concentratie van 0,34 g/L (0,40 g/l – 15%). In feite zijn dus de gemeten haptoglobine concentraties $< 0,34$ g/l met of zonder afwijking door hemolyse altijd lager dan de ondergrens van het referentiegebied. Anderzijds zijn de haptoglobine concentraties bij gemeten haptoglobine concentraties $> 0,40$ g/l met of zonder afwijking door hemolyse in ieder geval hoger dan de ondergrens. Voor deze haptoglobine concentraties ($< 0,34$ g/l en $> 0,40$ g/l) zal een afwijking door hemolytische interferentie dus geen invloed hebben op de interpretatie en een eventuele behandeling. Het is daarom patiënt-onvriendelijk en klinisch niet relevant om bij patiënten met een haptoglobine concentratie kleiner dan 0,34 g/l of groter dan 0,40 g/l en een HI groter of gelijk aan 9 opnieuw bloed af te nemen. Bij een hemolytische index van 25 is de procentuele afwijking van de plasmapool met een haptoglobine concentratie van 0,31 g/l kleiner dan 10%. Op grond hiervan en de redenen hierboven genoemd is de hemolytisch index ingesteld op 25 voor monsters met een haptoglobine concentratie tussen de 0,34-0,40 g/l. Alle monsters met een haptoglobine concentratie buiten de 0,34-0,40 g/l hebben geen maximaal toelaatbare HI waarop ze worden afgekeurd. Op basis van bovengenoemde query is de verwachting dat met deze instelling bij slechts 0,1% van de patiënten mogelijk opnieuw bloed afgenomen zal worden.

Conclusie

De mate waarmee hemolyse interfereert met de immunoturbidimetrische haptoglobine bepaling (Tina-quant) van Roche hangt af van de concentratie haptoglobine. Het is daarom van groot belang dat bij het vaststellen van de maximaal toelaatbare hemolytische index voor deze bepaling een plasmamonster met een haptoglobine concentratie rond de klinische beslisgrens wordt gebruikt.

Referenties

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry; approved guideline - second edition. CLSI document EP7-A2 [ISBN 1-56238-584-4].
2. Ledue TB, Collins MF. Development and validation of 14 human serum protein assays on the Roche cobas® c 501. *J Clin Lab Anal.* 2011; 25: 52-60.
3. Bossuyt X, Blanckaert N. Evaluation of interferences in rate and fixed-time nephelometric assays of specific serum proteins. *Clin Chem.* 1999; 45: 62-67.
4. Hooijkaas H, Mohrmann K, Smeets LC, Souverijn JHM, Tax GHM. *Handboek Medische Laboratoriumdiagnostiek* 2013: 373-374.

Summary

Jeninga EH, Dinkelaar J, Leyte A, Haagen IA. Hemolytical index and haptoglobin determination. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2014; 39: 31-33.

Haptoglobin is a transport and acute-phase protein, which is synthesized in hepatocytes. It binds hemoglobin irreversibly and is quickly and effectively removed from the circulation by the reticulo-endothelial-system. In this way hemoglobinuria and herewith renal iron loss is prevented in the case of intravascular hemolysis (IVH). In case of IVH the haptoglobin concentration in serum/plasma will be decreased. In our laboratory haptoglobin is measured using an immunoturbidimetric assay (Tina-quant) from Roche. It is known that hemolysis can interfere with this assay, however no maximal allowable hemolytic index (HI) is indicated. For this reason we determined this HI ourselves according to the EP7-A2 protocol. In this report we show that the extent of hemolytic interference with the haptoglobin assay depends on the haptoglobin concentration and reaches a maximum. Therefore it is important to use a sample containing a haptoglobin concentration with a clinical relevant value to determine the maximal allowable HI.

Keywords: haptoglobin, hemolytic interference, intravascular hemolysis.