

HbA1C'NİN YÜKSEK PERFORMANSLI LİKİD KROMATOĞRAFI İLE ÖLÇÜMÜNDEKİ İNTERFERANS: HEMOGLOBİN D

Mehmet Kalaycı¹, Hakan Ayyıldız¹, Mahmut Bozkurt¹, Mustafa Timurkaan²

¹Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Elazığ

²Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dahiliye Kliniği, Elazığ

ÖZET

Diyabet hastalarının tanı ve tedavi takibinde önemli bir rol oynayan HbA1C testi, klinik biyokimya laboratuvarlarında çeşitli metotlarla ölçülebilmektedir. HPLC (HPLC: High-performance liquid chromatography) ile HbA1C ölçümü günümüzde HbA1C ölçümünün altın standardı olarak kabul edilmektedir. Hastalarda hemoglobin varyantlarının varlığı günümüzde hekimlerce en çok tercih edilen testlerden biri olan HbA1C testinin ölçümünü etkilemektedir. Olgu sunumumuzda tedavi takibinde ve tanıda kullanılan HbA1C'nin ölçüm yöntemlerinden biri olan iyon-exchange HPLC yönteminin hemoglobin varyantı ile oluşmuş interferansını göstermeye çalıştık.

59 yaşında diyabet tanılı erkek hasta HbA1C ve rutin test ölçümü için laboratuvarımıza başvurdu. Hastanın

HbA1C değeri cihazımızda ölçülemedi. HbA1C kromatogramı incelendiğinde hastada anormal band varlığı tespit edildi. Hastadan tekrar numune alınarak hemoglobin elektroforezine gönderildi. Sonuçta hemoglobin D (HbD) varlığı tespit edildi.

HPLC ile HbA1C ölçümü altın standart olarak kabul edilmesine rağmen özellikle hastada hemoglobin varyantı varlığı HbA1C ölçümlerinde metoda bağlı interferansa sebep olabilmektedir. Metoda bağlı interferansların bilinişi glikozillenmiş hemoglobinin uygunsuz sonuçlarını yorumlamada kolaylık sağlayacaktır, bu yüzden klinikle uyumsuz HbA1C saptandığında kromatogramlar incelenmeli ve raporlama ona göre yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: HbA1C, interferans, HPLC, hemoglobin D, hemoglobin varyant. **Nobel Med 2016; 12(2): 66-68**

INTERFERENCE ON HbA1C MEASUREMENT BY HPLC: HB D

ABSTRACT

HbA1C test having a significant role in the treatment of diabetic patients can be measured by means of various methods in clinical biochemistry laboratories. HbA1C measurement by HPLC (HPLC: High-performance liquid chromatography) is accepted gold standard of HbA1C measurement today. The existence of hemoglobin variants in patients affects the measurement of HbA1C test, which is one of the tests most preferred by doctors today. In our case report, we tried to show the interference of ion-exchange HPLC method, which is one of HbA1C measurement methods used in monitoring and diagnosis, with hemoglobin variant.

A 59-year-old diabetic male patient applied our laboratory for HbA1C and routine test measurements. The patient's HbA1C value could not be measured in our device. Upon examining his HbA1C chromatogram, abnormal band was detected in the patient. We took sample from the patient again and sent it for hemoglobin electrophoresis. In the end, hemoglobin D (HbD) was detected.

Although HbA1C measurement by HPLC is accepted as gold standard, hemoglobin variant can cause method-based interference in HbA1C measurements. Recognising method-based interferences can facilitate evaluating inappropriate results of glycated hemoglobin, therefore if HbA1C measurement is inconsistent with clinical presentation, chromatograms should be studied and reported accordingly.

Keywords: HbA1C, interference, HPLC, hemoglobin D, hemoglobin variant. **Nobel Med 2016; 12(2): 66-68**

GİRİŞ

Son iki-üç aylık bir zaman dilimindeki kan glukoz düzeylerini yansıtan HbA1C, kronik hipergliseminin göstergesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu test diyabet hastalarının tanı ve tedavi takibinde önemli bir rol oynar, çünkü mikrovasküler ve daha az oranda olmak üzere makrovasküler komplikasyonlar ile iyi bir korelasyona sahiptir ve glisemi tedavisinin yeterliliği için standart biyobelirteç olarak kullanılmaktadır.¹

Son yıllarda HbA1C'nin tüm dünyada standardizasyonu yönündeki çalışmalar sonucunda HbA1C'nin de diyabet tanı testi olarak kullanılabileceği gündeme gelmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm laboratuvarların kullandıkları HbA1C analiz yönteminin, HbA1C için altın standart olan yüksek performanslı likid kromatografi (HPLC: High-performance liquid chromatography) yöntemine göre kalibre edilmesi şart koşulmaktadır.²

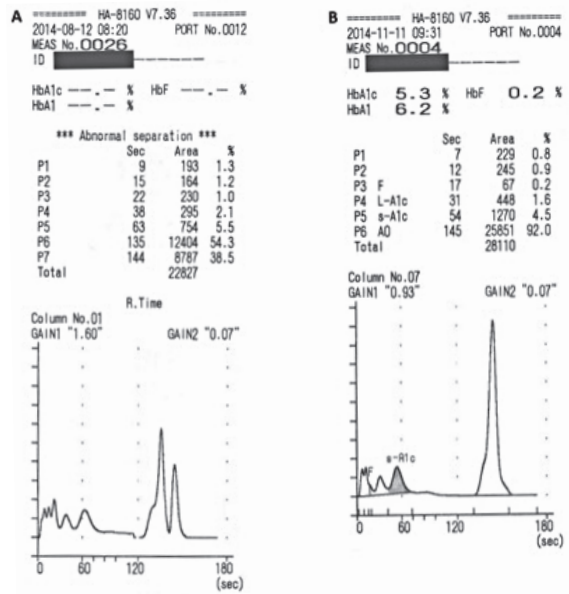
Diyabet tanısında HbA1C kullanıldığı zaman yaş, ırk, anemi ve hemoglobinopatileri göz önünde bulundurmak önemlidir. Hemoglobinopati ve anemi varlığında HbA1C düzeylerinin yorumlanmasında problem olabilir. Amerikan Diyabet Birliği, orak hücreli anemi gibi normal eritrosit dönüşümünün olmadığı anormal hemoglobini olan hastalarda, HbA1C ölçümünde anormal hemoglobinlerle interferans göstermeyen metotların kullanılabileceğini önermektedir.³ Olgu sunumumuzda tedavi takibinde ve tanıda kullanılan HbA1C'nin ölçüm yöntemlerinden biri olan iyon-değişim HPLC yönteminde hemoglobin varyant varlığının neden olduğu interferansı göstermeye çalıştık.

OLGU

59 yaşında diyabet tanılı erkek hasta HbA1C ve rutin test ölçümü için laboratuvarımıza başvurdu. Hastanın o gün çalışılan rutin biyokimya ve hemogram değerleri Tablo'dadır. Hastanın HbA1C testi ise laboratuvarımızda kullandığımız, katyon-exchange HPLC Adams A1C HA-8160 Diabetes Mode (Arkray, Inc., Kyoto Japan) cihazıyla çalışıldı. Hastanın HbA1C değeri cihazımızda ölçülemedi. Hastanın HPLC kromatogramı incelendiğinde anormal bant varlığı görüldü ve normal bir hastanın kromatogramı ile karşılaştırıldı (Şekil 1). Klinisyenle iletişime geçilip hastanın hemoglobin varyant açısından değerlendirilmesine karar verildi. Hastadan tekrar numune alınarak hemoglobin elektroforezine (minicap sebia Inc., Norcross GA) gönderildi. Sonuçta HbD varlığı tespit edildi (Şekil 2).

TARTIŞMA

Çeşitli faktörler kullanılan test metoduna göre HbA1C ölçüm doğruluğunu etkileyebilir ki Hb varyantları bunlardan biridir.^{4,5} Binin üzerinde hemoglobin var-

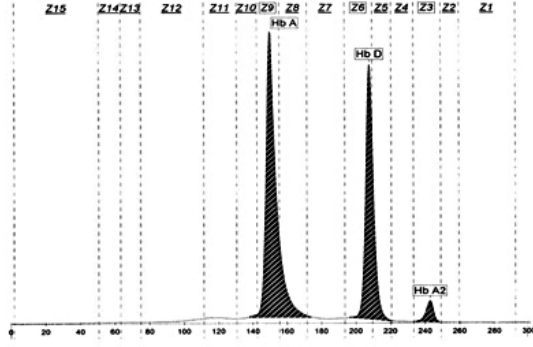


Şekil 1. A) Olgumuzun iyon-exchange HPLC ile çalışılmış kromatogramı. B) Normal bir bireyin iyon-exchange HPLC ile çalışılmış kromatogramı

Tablo. Hastaya ait hemogram ve biyokimyasal parametreler			
	Sonuç	Birim	Referans Aralığı
WBC	8,96	$\times 10^3/\mu\text{L}$	4,5-11
RBC	5,44	$\times 10^3/\mu\text{L}$	4,5-5,9
HGB	16,8	g/dL	13,2-17,4
HCT	49,9	%	39-51
MCV	91,8	fL	76-96
MCH	90,9	pg	27-32
MCHC	33,7	g/dL	30-35,5
PLT	302	$\times 10^3$	150-450
MPV	9,0	fL	8-12
Glukoz	164	mg/dL	74-110
Üre	50	mg/dL	10-50
Kreatinin	1,24	mg/dL	0,5-1,2
Kolesterol	244	mg/dL	0-200
Trigliserit	594	mg/dL	0-200
HDL-Kolesterol	34	mg/dL	35-55
AST	16	U/L	0-41
ALT	14	U/L	0-40

yantı tanımlanmıştır ve bunların birçoğu klinik olarak belirti vermemektedir. Bu yüzden klinik bulgu vermeyen Hb varyantları nedeniyle çıkan yüksek ya da düşük HbA1C değeri hastaların tanı ve tedavisinde hatalara neden olabilir.⁶ İyon-değişim HPLC elektrik yükü farklığına bağlı olarak Hb türlerini ayırır. Hb varyantları ya da glikozillenmiş türevleri HbA'dan ya da HbA1C'den ayrılmadığında hatalı HbA1C değerleri meydana gelebilir.⁷ Ülkemizde anormal hemoglobinlerle ilgili bir-

HbA1C'nin YÜKSEK PERFORMANSLI LİKİD KROMATOĞRAFİ İLE ÖLÇÜMÜNDEKİ İNTERFERANS: HEMOGLOBİN D



HEMOGLOBİN ELEKTROFOREZİ

Fractions	%	Ref. %
Hb A	58,1	
Hb D	38,8	
Hb A2	3,1	
Ratio :	1,00	T.P. :

Şekil 2. Hastaya ait hemoglobin elektroforezi.

çok toplum taramaları, klinik veya moleküler çalışmalar yapılmıştır.⁸ Anormal hemoglobinlerden ülkemiz

için önemli olanları sıklık sırasına göre HbS, HbD ve HbE'dir. Hemoglobin D birçok çalışmada HbS'den sonra en çok görülen varyant hemoglobindir.⁹ Ayrıca HbA1C cihaz interferansları NGSP sitesinde A1C için yapılan harmonizasyon çalışmasında gösterilmiştir.⁴

SONUÇ

Referans değer in alt sınırına yakın ya da referans değerden daha düşük sonuçlar veya ölçülemeyen HbA1C olduğunda Hb varyantı düşünülmelidir. Klinikle uyumsuz HbA1C olduğunda kromatogramlar incelenmeli ve raporlama ona göre yapılmalıdır. İyon-değişim metodunun interferansları bilinmeli ve tekrar sonuçları başka bir sistemde (boronat afinite, immünyokimya vb.) yapılmalıdır. HbA1C ölçümlerinde kullanılan yöntemin varyant hemoglobinin türüne göre interferans durumunun göz önünde bulundurulması, klinik laboratuvar uzmanları ve çalışanları tarafından post analitik hataları azaltmada rol oynayabilir.

* Yazarlar herhangi bir çıkar ilişkisi içinde bulunmadıklarını bildirmiştir.

İLETİŞİM İÇİN: Mehmet Kalaycı Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı, Elazığ, dr_mehmetkalayci@msn.com

GÖNDERİLDİĞİ TARİH: 02 / 07 / 2015 • KABUL TARİHİ: 03 / 09 / 2015

KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2014; 37: 81-90.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2013. Diabetes Care 2013; 36: 11-66.
3. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes mellitus. Diabetes Care 2015; 38: 8-16.
4. NGSP. Factors that interfere with GHB (HbA1C) test results. Available from: <http://www.ngsp.org/factors.asp> (Last accessed: 22.06.2015).
5. Sacks DB. Hemoglobin variants and hemoglobin A1C analysis: Problems solved? Clin Chem 2003; 49: 1245-1247.
6. Nasir NM, Thevarajah M, Yean CY. Hemoglobin variants detected by hemoglobin A1c (HbA1c) analysis and the effects on HbA1c measurements. Int J Diabetes Dev Ctries 2010; 30: 86-90.
7. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. Clin Chem 2001; 47: 153-163.
8. Dinçol G, Güvenç S, Elam D, Kutlar A. Hb J-Meerut(α 120(H3)Ala-Glu(α 1)) in a Turkish family. Int J Med Sci 2006; 3: 26-27.
9. Canatan D. Türkiye'de Hemoglobinopatilerin Epidemiyolojisi. Turk Hematoloji Derneği HematoLog 2014; 4-1.