

Foutieve detectie van en correctie voor de carbamylpiek (#C) door de Menarini Hi-Auto A1c HA-8140 HbA_{1c}-automaat

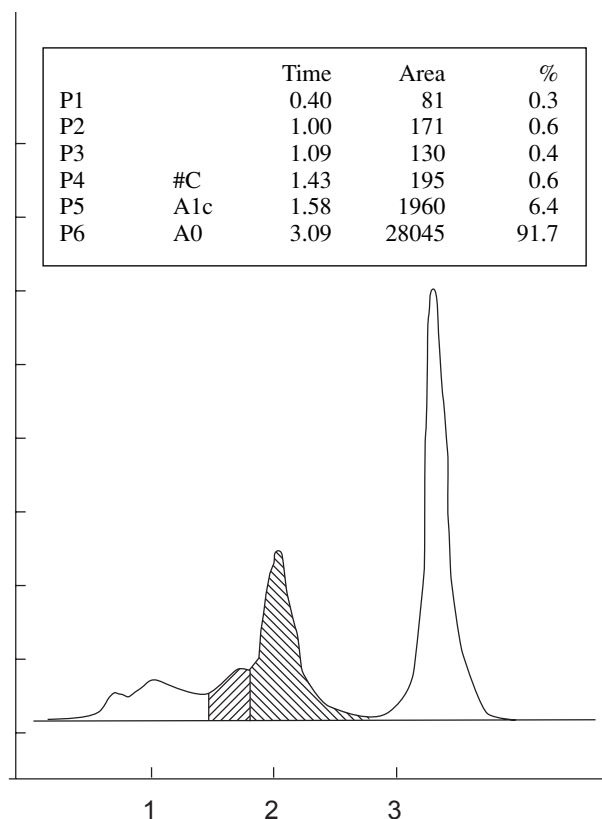
R.T.P. JANSEN, N. van DUURLING, J. LEUVERMAN en M. KNUBBEN

De HbA_{1c}-automaat van Menarini, Hi-Auto A1c HA-8140, bepaalt de fractie HbA_{1c} met een HPLC-techniek. Soms wordt een zogenaamde piek of schouder gedetecteerd vlak voor de HbA_{1c}-piek. Voor deze #C-piek, die veroorzaakt kan worden door gecarbamyleerd HbA, zou gecorrigeerd moeten worden. In dit artikel wordt aangetoond dat de reproduceerbaarheid van detectie van de #C-piek zeer slecht is. De wijze van detectie en berekening van het oppervlak van deze piek leidt tot grote schommeling in gerapporteerde HbA_{1c}-waarden als ervoor gecorrigeerd wordt. Er wordt een voorstel voor een verbeterde procedure gedaan. Totdat deze procedure is ingevoerd door de firma, wordt geadviseerd niet te corrigeren voor de #C-piek.

Trefwoorden: HbA_{1c}; HPLC; gecarbamyleerd Hb

De bepaling van geglyceerd hemoglobine heeft het laatste decennium een centrale rol gekregen bij de instellingscontrole van de diabetespatiënt. Het grote aantal aanvragen heeft geautomatiseerde bepaling noodzakelijk gemaakt. Tegelijkertijd is het gewenst omwille van standaardisering een goed gedefinieerde fractie van het geglyceerde hemoglobine te bepalen. De Hi-Auto A1c HA-8140 van de firma Menarini is een analyseautomaat voor de bepaling van de HbA_{1c}-fractie. De HA-8140 is een volautomatisch HPLC-systeem, dat uitgerust is met een cap piercing unit en barcodedetectie. Er wordt 3 µl volbloed gepipetteerd uit de primaire buis. Dit wordt gehemolyseerd met een tetrapolyfosfaatbuffer, waarna de labiele Schiffse basefractie verwijderd wordt door 2 minuten incubatie bij 48 °C. Vervolgens wordt het hemolysaat geïnjecteerd op een methacrylzuur/methacrylaat-copolymerkolom. Elutie vindt plaats met achtereenvolgens drie fosfaatbuffers. Het systeem detecteert bij elutie achtereenvolgens de pieken van HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbF, HbA_{1c}, HbA₀, HbS en HbC. De leverancier geeft de precieze samenstelling van de buffers niet op, noch hoe de piekdetectie plaatsvindt en wat de frequentie van analoog-naar-digitaal-conversie is, noch of er van een digitale filtering gebruik gemaakt wordt. Vóór de HbA_{1c}-piek komt soms een schouder-

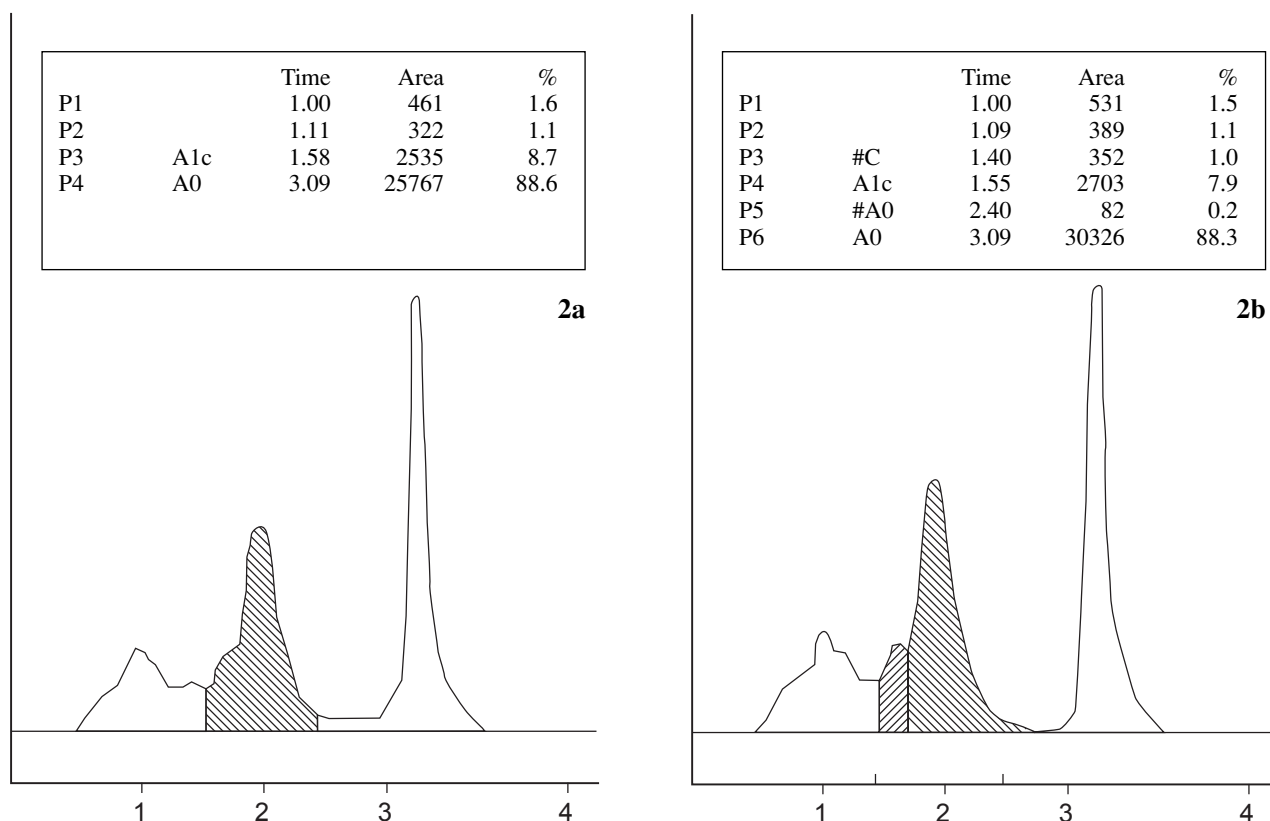
piek welke de firma karakteriseert als de “#C-piek”. In een evaluatieverslag van de HA-8140 (1) wordt slechts marginaal aandacht besteed aan deze piek. De #C-piek wordt volgens de firma veroorzaakt door gecarbamyleerd HbA (2, 3, 4). Er wordt aanbevolen het HbA_{1c}-percentage hiervoor te corrigeren (5). Correctie leidt in de meeste gevallen tot HbA_{1c}-waarden die 0,5-1,5 absolute procenten lager liggen. Uit reactie van zowel kinderartsen als internisten bleek, dat schommelingen in opeenvolgende HbA_{1c}-waarden van patiënten niet in overeenstemming waren met hun diabetesinstelling. Na het plaatsen van een nieuwe kolom bij een jaarlijkse servicebeurt bleek het aantal monsters waarbij een #C-piek gedetecteerd werd aanzienlijk toegenomen ten opzichte van daarvoor. Wij schreven dit toe aan een betere scheidingskarakteristiek van de nieuwe kolom. De #C-piek leek echter niet consequent gedetecteerd te worden, maar eerder bij toeval. Dit was reden om de detectie en de berekeningswijze van de #C-piek nog eens nader on-



Figuur 1. Oppervlakbepaling van de #C-piek (linker gearceerde piek). Correctie van de HbA_{1c}-waarde (rechter gearceerde piek) hiervoor resulteert in een waarde die 1% absoluut lager is.

Klinisch Laboratorium, St. Annaziekenhuis, Geldrop

Correspondentie: Dr. R.T.P. Jansen, Klinisch Laboratorium, St. Annaziekenhuis, Postbus 90, 5660 AB Geldrop
e-mail: r.jansen@st-anna.nl



Figuur 2. Voorbeeld van de slechte reproduceerbaarheid van de #C-piekdetectie. Hetzelfde monster werd tweemaal achter elkaar gemeten. De eerste maal (2a) werd geen #C-piek gedetecteerd, de tweede maal (2b) wel. De piekvormen verschillen nauwelijks van elkaar.

der de loop te nemen. In dit artikel wordt de wijze van correctie voor deze #C-piek bekritiseerd, waarbij de piekdetectie en oppervlakteberekening ter discussie worden gesteld.

MATERIALEN en METHODEN

Alle monsters werden geanalyseerd met de HA-8140 HPLC-analyser van de firma Menarini. De reagentia waren de door de firma geleverde hemolysewasvloeistof en drie elutiebuffers, fosfaatbuffers met respectievelijk pH 6,0, pH 7,18 en pH 5,72, anders derhalve dan vermeld in de evaluatie (1) waar sprake is van drie buffers met pH 4,8. Patiëntenmateriaal werd verkregen door venapunctie in 4ml-K3EDTA-buizen. Het hemolysaat wordt volautomatisch gemaakt door het instrument, met behulp van hemolysewasvloeistof. De kolom is een gel van de co-polymeren methacrylzuur en methacrylaatester (hydrofobe en ionenuitwisselende groepen). Gecarbamyleerd HbA werd verkregen door incubatie overnacht van patiëntenmonsters met 100 mmol/l ureum (Merck 108488) bij 37 °C.

RESULTATEN en DISCUSSIE

Na het plaatsen van een nieuwe kolom bij een jaarlijkse servicebeurt bleek het aantal monsters waarbij een #C-piek gedetecteerd werd aanzienlijk toegenomen ten opzichte van daarvoor. Wij schreven dit toe aan een betere scheidingskarakteristiek van de nieuwe kolom. Dit was reden om de berekenings-

wijze en de detectie van de #C-piek nog eens nader onder de loop te nemen. Daartoe werden de volgende onderzoeken gedaan:

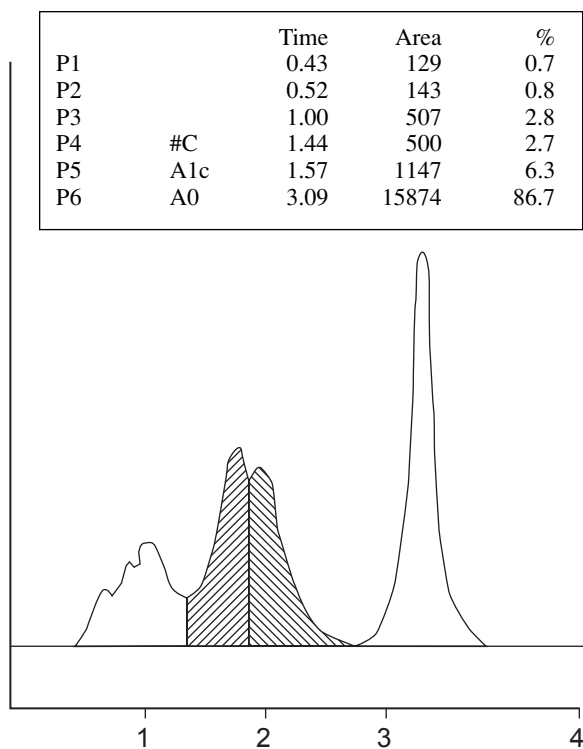
- bepaling van de invloed van de #C-piekc correctie op de HbA_{1c}-waarde
- reproduceerbaarheid van de #C-piekdetectie
- positiebepaling van de carbamyl-Hb-piek
- aanwezigheid van de #C-piek bij patiënten met hoge dan wel normale ureumconcentraties
- inschatting van de bepalingswijze van de #C-piek

Bepaling van de invloed van de #C-piekc correctie op de HbA_{1c}-waarde

Correctie van het HbA_{1c}-percentage voor de aanwezigheid van de #C-piek heeft een zeer significant effect. Bij detectie van een #C-schouder of -piek wordt gecorrigeerd voor een oppervlak als weergegeven in figuur 1. Vanuit de gedetecteerde dalen wordt een loodlijn neergelaten op de X-as. Het oppervlak tussen de loodlijnen wordt toegeschreven aan een fractie. In de meeste gevallen leidt dit tot een afname van de HbA_{1c}-waarden met 0,5-1,5 absolute procenten. Bij een standaarddeviatie van 0,1% (absoluut) is een dergelijke correctie zeer significant.

Reproduceerbaarheid van de #C-piekdetectie

Een reeks van 25 monsters waarin een #C-schouder gedetecteerd was werd tweemaal direct na elkaar geanalyseerd. Het bleek dat de detectie van de #C-piek random was: in 50% van de gevallen werd de piek opnieuw gevonden, in 50% niet. Een voorbeeld is weergegeven in figuur 2. Bij eenzelfde patiënt zal dus



Figuur 3. Patiëntenmonster overnacht geïncubeerd met 100 mmol/l ureum bij 37 °C. Op de plaats van de #C-piek verschijnt een carbamylpiek (linker gearceerde piek).

een #C-piek louter door toeval wel of niet gedetecteerd worden en de HbA_{1c}-waarde hiervoor gecorrigeerd. Bij stabiel ingestelde diabetes-type-1-patiën-

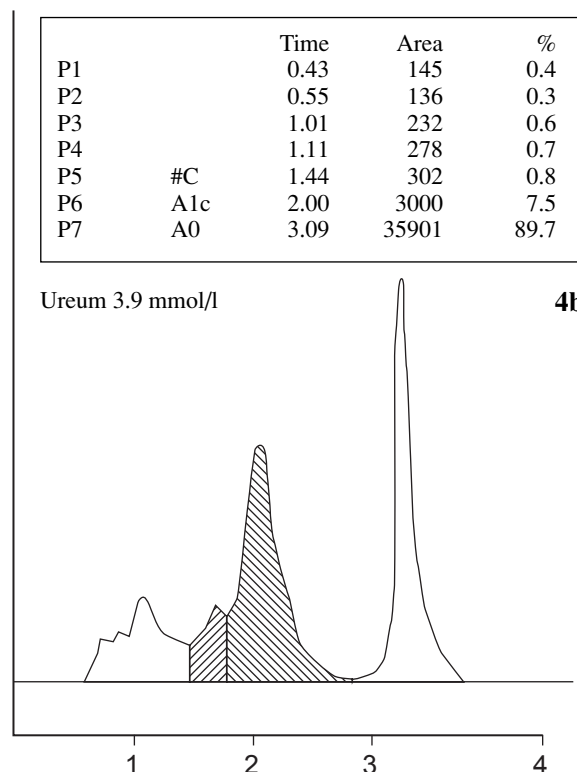
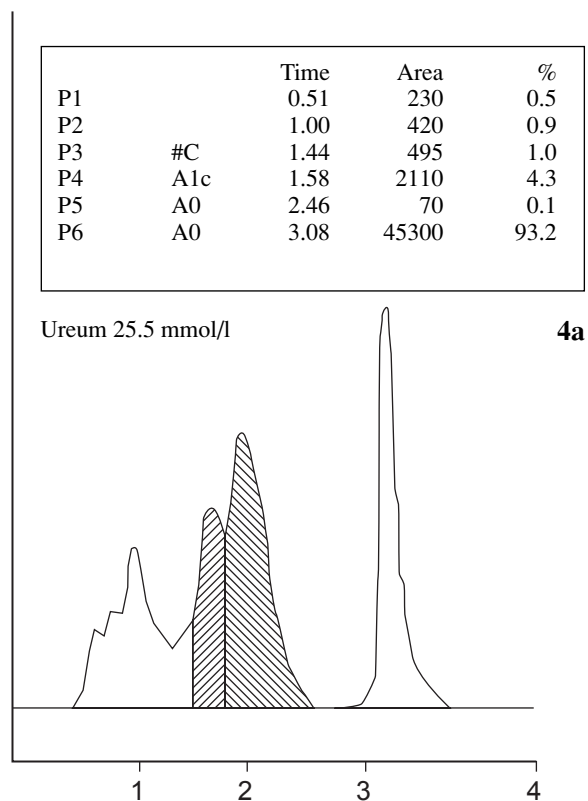
ten, met name kinderen, leidt een stijging van 0.5-1.5% in de HbA_{1c}-waarde tot aanspreken van de patiënt op zijn therapietrouw en eventueel bijstelling van zijn insulinebehandeling. Schommelingen van een dergelijke grootte door toevallige #C-correctie zijn dus onacceptabel.

Positiebepaling van de carbamyl-Hb-piek

Om zeker te weten of de #C-piek op de plaats van de carbamyl-HbA-piek ligt, werden patiëntenmonsters overnacht geïncubeerd met hoge ureumconcentraties (100 mmol/l) bij 37 °C. Uit figuur 3 blijkt dat dit leidt tot een extra piek, de carbamylpiek. Deze piek ligt inderdaad op de plaats waar een #C-piek wordt herkend.

Aanwezigheid van de #C-piek bij patiënten met hoge, dan wel normale ureumconcentraties

Het is niet duidelijk wanneer een carbamylpiek verwacht moet worden. Indien patiëntenmonsters korter geïncubeerd worden met ureum en bij kamertemperatuur, ontstaat geen piek. Bij een reeks van patiënten die bekend zijn met een hoge ureumconcentratie werd een #C-piek gevonden (figuur 4a). Een #C-piek wordt echter ook geregeld gevonden bij patiënten met een laag ureum (figuur 4b). Deze discrepante bevinding is in overeenstemming met een recente publicatie (6), waarin men juist het percentage gecarbamylerd Hb gebruikt voor inschatting van de uremische toestand van dialysepatiënten. Het blijkt dat de mate van glycering de mate van carbamylering beïnvloedt. In de publicatie wordt een formule voorgesteld om het percentage carbamyl-Hb te corrigeren voor het percentage geglyceerd Hb.



Figuur 4. De #C-piek kan aanwezig zijn bij patiënten met hoge (4a), maar ook met normale (4b) ureumconcentraties.

Inschatting van de bepalingwijze van de #C-piek

De slechte reproduceerbaarheid van de #C-piekdetectie deed de vraag rijzen hoe de piek eigenlijk vastgesteld wordt. De firma kon geen uitsluitsel geven, omdat de Japanse producent hier geen informatie over verstrekke. Ook herhaalde gesprekken met een Italiaanse deskundige van het hoofdkantoor leverden niets op. Waarschijnlijk wordt eerst een smoothingprocedure uitgevoerd om signaalruis te verminderen. Hierna wordt gedifferentieerd, waarbij een nulwaarde van de eerste afgeleide de positie van een piek of een dal aan geeft. Vanuit de piekdalen wordt een loodrechte lijn naar de tijdas getrokken. Het oppervlak wordt berekend tussen deze twee loodrechte lijnen in. Gezien de ligging en de vorm van de #C-schouder of piek leidt deze veronderstelde berekeningsprocedure tot te hoog geschatte #C-waarden, omdat het oppervlak relatief groot is door de loodrechte afkaplijnen. Als een meer geavanceerd schouderdetectie-algoritme gebruikt zou worden zal de geschatte #C-fractie lager zijn. Met de huidige techniek zal de #C-detectie ook slecht reproduceerbaar zijn. Immers, de schouder wordt alleen gedetecteerd als deze een gedifferentieerde nuldoorgang oplevert na de smoothingprocedure. Omdat de schouder zo klein is zal dit per toeval wel of niet gebeuren. De leverancier meldde dat het probleem in de opvolger van de HA-8140 opgelost zou zijn.

Voorstel verbeterde procedure

De oplossing van het geschetste probleem ligt in een gewijzigde piekdetectie- en oppervlakteberekeningsmethode. Na digitalisering moet bijvoorbeeld een vijfkanals-smoothingprocedure de systeemruis verminderen. Vervolgens kan door differentiatie de HbA_{1c}-piektop gedetecteerd worden op de plaats van de nuldoorgang. De vorm van de HbA_{1c}-piek wordt bepaald door een oplopende integraal van een Gausse kromme en vervolgens een aflopende integraal van een Gausse kromme, waarbij op de laatste de #C-schouder nog gesuperponeerd wordt. De HbA_{1c}-piek zelf (dus zonder de #C-schouder) is nagenoeg symmetrisch rond de loodlijn vanuit de top. Door de rechter helft te integreren en met twee te vermenigvuldigen wordt een goede schatting verkregen van het HbA_{1c}-piekoppervlak zonder storing van de onbekende #C-bijdrage. Met dit voorstel is zowel het probleem van het wel of niet detecteren van een #C-piek opgelost, als het overschatten van een #C-piek.

CONCLUSIE

De HA-8140 van Menarini bepaalt volautomatisch de HbA_{1c}-fractie in EDTA-bloed. Soms wordt een zogenaamde #C-piek herkend, die zich manifesteert als een schouder van de HbA_{1c}-piek. De firma Menarini adviseert het uitgeprinte HbA_{1c}-percentage te rapporteren dat gecorrigeerd is voor de #C-piek. De correctie ligt steeds in de orde van 0.5-1.5 absolute procenten. De #C-piek kan veroorzaakt worden door gecarbamyleerd HbA₁. Onze onderzoeksresultaten tonen aan dat de #C-piek random gedetecteerd wordt. Dus worden patiëntresultaten per toeval wel of niet gecorrigeerd voor de #C-fractie. Door de detectietechniek wordt bovendien een te hoge #C-fractie berekend. De voorgestelde gewijzigde detectiemethode zou dit probleem oplossen. Zolang de firma de software voor de bepalingstechniek van de HbA_{1c}- en de #C-fracties niet heeft aangepast, adviseren wij de HbA_{1c}-waarde te rapporteren die niet gecorrigeerd is voor de #C-fractie. Uitzondering moet gemaakt worden voor ernstig uremische patiënten die een evidente #C-piek (geen schouder) vertonen. Overigens beïnvloedt de mate van glycering bij deze patienten de mate van carbamylering sterk, zoals aangetoond in (6), hetgeen de interpretatie nog eens bemoeilijkt.

Literatuur

1. John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Arkay HA-8140 hemoglobin A_{1c} analyzer. *Clin Chem* 1997; 43: 968-975.
2. Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CWM, Muskiet FAJ, van der Slik W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography and enzyme immunoassay. *Clin Chem* 1993; 39: 138-142.
3. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FAJ, van der Slik W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. *Clin Chem* 1993; 39: 1717-1723.
4. Chachou A, Randoux C, Millert H, Chanard J, Gillery P. Influence of in vivo hemoglobin carbamylation on HbA_{1c} measurements by various methods. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 321-326.
5. Lenters E, Siebelder C, de Haen T, Miedema K. Invloed van gecarbamyleerd hemoglobine op verschillende methoden voor glycohemoglobine. *Abstract NTKC* 2000; 25: 77.
6. Hammouda AMA, Mady GE. Correction formula for carbamylated haemoglobin in diabetic uraemi patients. *Ann. Clin Biochem* 2001; 38: 115-119.