

Een patiënt met een sterk verhoogde HbA1c waarde

M.N.D. OYAERT^{1*}, C.L. HARTEVELD², I. VERSTREKEN³, H.J.B. CELEN⁴, K.J.O. DESMET^{1,5} en D.M.J. KIEFFER^{1,6}

Een caucasische man presenteerde zich met een sterk verhoogde HbA1c waarde (51,7% of 321 mmol/mol [4,0-6,3%; 20-45 mmol/mol]), gemeten met kation-uitwisselingschromatografie. Daarnaast werd een normale serum glucose (glucoseconcentratie: 6,1 mmol/l [4,1-5,6 mmol/l]) gemeten. Herevaluatie van de HbA1c waarde met een immuno-assay en affiniteitschromatografie toonde een normale concentratie (4,5% [4,0-6,0%] en 4,6% [4,5-6,1%], respectievelijk). Tevens was de serum fructosamine concentratie, een andere parameter voor de serum glycemie, normaal (203,0 μ mol/l [205,0-285,0 μ mol/l]). DNA analyse leidde tot de identificatie van een zeldzame en klinisch weinig relevante hemoglobinevariant: hemoglobine Raleigh. Een mutatie op de β -globineketen van deze variant resulteert in de substitutie van het N-terminale *Valine* door een geacetyleerd *Alanine* waardoor glycosylatie van HbA onmogelijk wordt. Deze casus illustreert één van de valkuilen in de diagnostiek en opvolging van patiënten met diabetes mellitus, aangezien deze variant samenvalt met de HbA1c piek in het chromatogram. Abnormaal verhoogde HbA1c waarden, die niet passen bij de klinische presentatie van de patiënt, dienen steeds heroverwogen te worden en zo nodig bevestigd te worden via een alternatieve HbA1c methode.

Casus

Een 66-jarige caucasische man werd doorverwezen naar het Heilig Hart Ziekenhuis te Leuven wegens aanhoudende klachten van scapulaire pijn uitstralend naar de linker arm en keel, die meer uitgesproken waren bij inspanning. De patiënt had een invaliderende claudicatio ter hoogte van het rechter been op basis van een ostiale occlusie van de arteria femoralis superficialis in de voorgeschiedenis. Hiervoor werd een femoropopliteale bypass ingreep uitgevoerd. Het klinisch onderzoek toonde eveneens een verhoogde bloeddruk. Er was ten slotte ook sprake van nicotine abus (40 pak-jaren) en hyperlipidemie. Hematologisch bloedonderzoek leverde volgende resultaten

[referentiewaarden]: hemoglobine (Hb): 4,9 mmol/l [5,2-6,6]; hematocriet: 37,0 [40,0-49,0]; MCV: 91,0 fl [82,0-96,0]; MCH: 32,0 pg [27,0-32,0]. Biochemisch onderzoek bracht een licht verhoogde glucosewaarde (6,1 mmol/l [4,1-5,6 mmol/l]) aan het licht, waarna een hemoglobine A1c (HbA1c) bepaling werd uitgevoerd. Een initiële HbA1c bepaling, uitgevoerd via kation-uitwisselingschromatografie (Bio-Rad D-10TM; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, VS), toonde een sterk verhoogde waarde van 51,7% of 321 mmol/mol [4,0-6,3%; 20-45 mmol/mol].

Omwille van deze sterk verhoogde waarde, die tevens niet correleerde met de klinische presentatie van de patiënt, werd het monster doorgestuurd naar de Universitaire Ziekenhuizen Leuven voor verder onderzoek. Om na te gaan of de hoge HbA1c waarde te wijten was aan een hemoglobinopathie, werd het materiaal geanalyseerd m.b.v. een speciaal High Performance Liquid Chromatography (HPLC) elutieprogramma op een Bio-Rad Variant ClassicTM toestel (β -thal Short Program; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Deze analyse toonde een extra piek (48,5%) in het P2-venster, met snellere elutie dan HbA. Verder werd een verlaagd HbA (45,8% [$>95,0\%$]), samen met een normaal HbA2 (2,6% [2,5-3,8%]) en HbF ($<2,0\%$) gevonden (figuur 1A). Deze resultaten suggererden de heterozygote aanwezigheid van een hemoglobinevariant met een chromatografische retentietijd identiek aan die van HbA1c. Vergelijking van het verkregen chromatogram met een chromatogram van een gekende diabetes mellitus patiënt (verhoogde HbA1c waarde van 11,6% [4,0-6,0%]) (figuur 1B), bevestigde het samenvallen van de Hb variant piek met de HbA1c piek in het P2-venster.

Om een correcte HbA1c-waarde te bekomen werd deze test tevens bepaald met behulp van een immuno-chromatografische (A1CNow+TM, Bayer Healthcare, Leverkusen, Duitsland) en een affiniteitschromatografische (AfinionTM, Axis Shield, Oslo, Noorwegen) methode. Deze resultaten brachten aanzienlijk lagere HbA1c-waarden (4,5%; 25 mmol/mol en 4,6%; 27 mmol/mol, respectievelijk) aan het licht. Bijkomende biochemische bepaling van fructosamine resulteerde in een normale waarde (203,0 μ mol/l [205,0-285,0 μ mol/l]), wat pleitte tegen een verhoogde glycosylatie van plasma eiwitten omwille van een persisterende hyperglycemie. Om de hemoglobinevariant verder te identificeren werd het materiaal voor DNA analyse doorgestuurd naar een extern laboratorium (Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden, Nederland). DNA sequentie bepaling van het β -globine gen toonde een substitutie op codon 1 (GTG naar GCG (*Valine* naar *Alanine*)), resulterend in de aanwezigheid van hemoglobine Raleigh.

Universitaire Ziekenhuizen Leuven, Laboratoriumgeneeskunde, Leuven¹; Hemoglobinopathie Laboratorium, Departement Klinische Genetica, Universiteit Leiden, Leiden²; Klinisch Laboratorium³ en Afdeling Cardiologie⁴, Heilig Hart Ziekenhuis Leuven, Leuven; KU Leuven – Universiteit van Leuven, Departement Microbiologie en Immunologie⁵ en Departement Cardiovasculaire Wetenschappen⁶, Leuven, België

Correspondentie: Matthijs Oyaert, ASO Klinische Biologie, Herestraat 49, 3000 Leuven, België
E-mail: matthijsoyaert@telenet.be

Bespreking

HbA1c

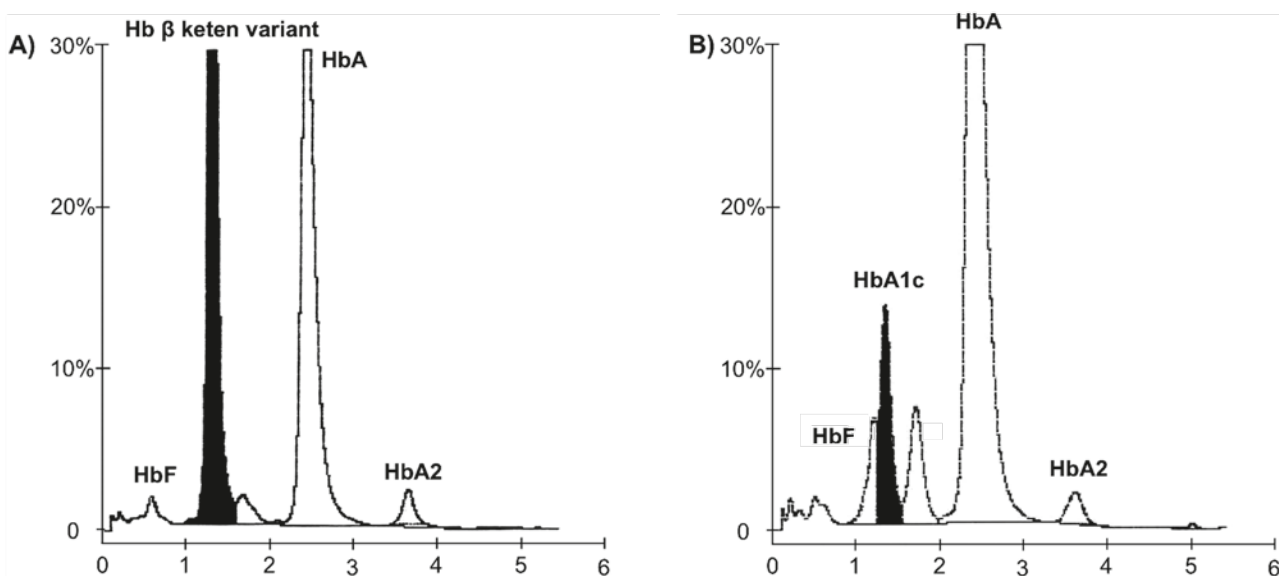
HbA1c wordt aangemaakt door de additie van een glucose molecuul aan het N-terminale *Valine* residu op de β -globineketen van HbA. Deze irreversibele glycosylatie verandert de lading en de structuur van het HbA molecuul waardoor de positieve lading wordt verminderd. HbA1c weerspiegelt de gemiddelde glucose serum concentratie over een periode van ongeveer drie maanden, de gemiddelde levensduur van een rode bloedcel. Verschillende fysiologische situaties kunnen HbA1c metingen beïnvloeden, zo kunnen hemolytische anemie of massieve bloedingen enerzijds en factoren zoals uremie, opiaat verslaving, alcohol abus, ijzerdeficiëntie, hyperbilirubinemie, en hypertriglyceridemie anderzijds aanleiding geven tot respectievelijk vals verlaagde of vals verhoogde HbA1c concentraties (1). De 'American Diabetes Association' schrijft voor om HbA1c te meten bij patiënten met diabetes mellitus zowel bij diagnose als in de follow-up, waarbij een cut-off waarde van 6,5% wordt vooropgesteld (2).

Methoden voor het meten van HbA1c kunnen onderverdeeld worden in drie groepen. Chromatografische technieken zoals kation-uitwisselingschromatografie en affiniteitschromatografie enerzijds en elektroforese technieken zoals gelelektroforese en capillaire elektroforese anderzijds, scheiden eiwitten op basis van de ladingsverdeling op het hemoglobine-eiwit. HbA1c kan gescheiden worden van HbA omwille van een verminderde lading na glycosylatie van het *Valine*-aminozuur op HbA. Post-translationele modificaties (vb. acetylatie, carbamylatie) of mutaties in het hemoglobine-eiwit zijn andere voorbeelden die de ladingsverdeling en dus ook de chromatografische retentietijd van deze eiwitten beïnvloeden (3).

Immuno-assays daarentegen gebruiken antilichamen gericht tegen het N-terminale, geglycosyleerd aminozuur op de β -globineketen van HbA om HbA1c te kwantificeren.

Een laatste, meer recente techniek maakt gebruik van detectie via massaspectrofotometrie van het N-geglycosyleerd *Valine*-aminozuur van de β -globineketen. Deze techniek wordt door de 'International Federation of Clinical Chemistry' naar voren geschoven als referentietechniek (4). Echter de hoge aanschafkost van de massaspectrometer en de expertise nodig voor het uitvoeren van deze analyse zorgen ervoor dat deze laatste techniek minder toegankelijk is voor routine laboratoria (4).

Analytische problemen bij het meten van HbA1c bij patiënten met een hemoglobinopathie worden het meest frequent waargenomen wanneer gebruik gemaakt wordt van kation-uitwisselingschromatografie. Echter, hemoglobine-varianten die glycosylatie verhinderen of mutaties in het epitoom van het N-terminale aminozuur veroorzaken, zullen ervoor zorgen dat antilichamen het geglycosyleerde hemoglobinemolecuul niet meer herkennen en op deze manier foutief verlaagde resultaten veroorzaken bij het gebruik van immunologische methoden (3). Analytische interferentie treedt beduidend minder op indien gebruik gemaakt wordt van affiniteitschromatografie, aangezien deze methode meer specifiek is voor geglycosyleerd hemoglobine (5). Anderzijds werden er verschillende hemoglobinevarianten (Hb Graz, Hb Hope, Hb Kanagawa, Hb Long Island/Marseille, Hb Okayama, Hb Old Dominion, Hb Turriff, Hb Sherwood Forest, HbA2 Niigata, Hb South Florida) beschreven die glycosylatie verhinderen en dus interfereren met de chromatografische detectie van HbA1c op basis van kation-uitwisseling (6, 7).



Figuur 1. Chromatogram van de HPLC analyse. Het chromatogram van de Hb Raleigh patiënt (A) toont de aanwezigheid van een extra piek (48,5%) samenvallend in het P2 venster daar waar ook de HbA1c gevonden wordt bij een bekende diabetes mellitus patiënt (B). Chromatogram A toont tevens een verlaagde HbA (45,8%), een normaal HbA2 (2,6%) en HbF (<1%).

Hemoglobine Raleigh en diabetes mellitus

Interferentie van hemoglobine Raleigh met de HbA1c HPLC bepaling werd voor het eerst beschreven in 1998 bij een diabetes patiënt (8). Bij hemoglobine Raleigh is er sprake van een mutatie (Thymidine naar Cytosine) op de tweede base van het codon dat codeert voor het eerste aminozuur van de β -globineketen. Dit leidt tot een substitutie van het N-terminale aminozuur van *Alanine* voor *Valine* (8). Het N-terminale *Alanine* wordt post-translationeel onmiddellijk gemodificeerd tot acetyl-*alanine* waardoor glycosylatie verhinderd wordt. Deze acetylatie zorgt voor een verminderde positieve lading in vergelijking met de positieve lading van HbA1c. Op deze manier zijn de retentietijden van HbA1c en hemoglobine Raleigh nagenoeg identiek (Figuur 1A en B). Kation-uitwisselingschromatografische technieken zullen derhalve in aanwezigheid van hemoglobine Raleigh vals verhoogde HbA1c concentraties genereren. Anderzijds is door de terminale substitutie van *Valine* naar acetyl-*alanine* interferentie mogelijk wanneer gebruik gemaakt wordt van immuno-assays. Bij het gebruik van affiniteitschromatografie is er geen sprake van analytische interferentie maar zal er evenmin een correct (i.c. vals verlaagd) resultaat gegenereerd worden aangezien hemoglobine Raleigh niet kan geglycosyleerd worden.

Wanneer extreem hoge (>15%) of lage (<4%) HbA1c waarden worden gevonden, of wanneer de HbA1c resultaten niet overeen komen met de gemeten glucose concentraties, zijn andere testen aangewezen voor diagnose of opvolging van patiënten met diabetes mellitus (2). Deze testen omvatten methoden gebaseerd op het meten van geglycosyleerde eiwitten, zoals albumine of fructosamine. Nadeel van beide laatste methoden is het gebrek aan een éénduidig correlatie van deze parameters en de gemiddelde glucoseconcentraties. Daarnaast zijn er weinig data beschikbaar betreffende hun prognostische waarde in vergelijking met HbA1c en zijn er tevens geen optimale therapeutische referentiewaarden beschikbaar. Ook werd aangetoond dat de fructosamine-waarde onderschat is in obese patiënten (daling van 25% in patiënten met een BMI > 30 kg/m²) (9, 10).

Conclusie

De huidige casus toont aan hoe de aanwezigheid van een hemoglobine variant een vals verhoogde HbA1c waarde kan genereren. Wanneer interferentie wordt vermoed, is het aangewezen om HbA1c te meten met alternatieve methoden. Clinici en laboratoriumspecialisten moeten zich bewust zijn van zeldzame, vaak klinisch onverwachte hemoglobinevarianten in populaties waar de aanwezigheid van hemoglobinevarianten laag is.

Referenties

1. Jain N, Kesimer M, Hoyer JD, Calikoglu AS. Hemoglobin Raleigh results in factitiously low hemoglobin A1c when evaluated via immunoassay analyzer. *J Diabetes Complications*. 2011; 25: 14-18.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2013. *Diabetes care*. 2013; 36: S11-66.
3. Sofronescu AG, Williams LM, Andrews DM, Zhu Yusheng. Unexpected Hemoglobin A1c results. *Clin Chem*. 2011; 57: 153-157.
4. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40: 78-89.
5. Vandewiele A, Genbrugge K, Delanghe J. Spuriously high HbA1c due to the presence of haemoglobin Raleigh: a case report and review of the literature. *Acta Clin Belg*. 2010; 65: 336-340.
6. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem*. 2001; 47: 153-163.
7. van Laer C, Hartevelde CL, Pauwels S, Desmet K, Kieffer D. Aberrant glycosylated haemoglobin (HbA1c) results leading to haemoglobinopathy diagnosis in four Belgian patients. *Acta Clin Belg*. 2014; 69: 456-459.
8. Chen D, Crimmins DL, Hsu FF, Lindberg FP, Scott MG. Hemoglobin Raleigh as the cause of a falsely increased hemoglobin A1C in an automated ion-exchange HPLC method. *Clin Chem*. 1998; 44: 1296-1301.
9. Woo J, Cockram C, Lau E, Chan A, Swaminathan R. Influence of obesity on plasma fructosamine concentration. *Clin Chem*. 1992; 38: 2190-2192.
10. Skrha J, Svacina S. Serum fructosamine and obesity. *Clin Chem*. 1991;37: 2020-2021.