

İyon Değişim Kromatografisi ve İmmunoturbidimetrik Yöntemlerle Çalışılan Hemoglobina1c Sonuçlarının Karşılaştırılması

The Comparison of Ion Exchange Chromatography and Immunoturbidimetric Methods of Hemoglobina1c Results

Necati MUŞLU¹, Burak ÇİMEN¹, Gülçin ESKANDARI¹, Hakan KALAFAT¹

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Amaç: Bir halk sağlığı problemi olan Diabetes Mellitus'un kronik komplikasyonlarının oluşumu, hastanın uzun dönem kan glukoz düzeyi ile ilişkilidir. Günümüzde geçmişe yönelik ortalama glisemik durumun ve komplikasyon gelişme riskinin göstergesi olarak kan Hemoglobina1c (HbA1c) düzeylerinin ölçümü kullanılmaktadır. Rutin laboratuvarlarda sık çalışılan testler arasına giren HbA1c ölçümü için bugün kullanılan birçok farklı analiz yöntemi vardır.

Yöntem: Cobas Integra800 otoanalizöründe immünoturbidimetrik yöntemle çalıştığımız HbA1c sonuçları ile Agilent 1100 HPLC sistemi iyon değişim kromatografisi yöntemi ile elde ettiğimiz HbA1c sonuçları arasındaki ilişki değerlendirildi.

Bulgular: Cobas Integra 800 ve Agilent 1100 HPLC sistemi ile ölçülen HbA1c değerleri sırasıyla 6.06 ± 1.83 ve 6.29 ± 1.59 olarak bulunmuştur. İki yöntem sonuçları arasında, sınıf içi korelasyon katsayısı 0.9468 (%95 GA=0.9223-0.9638) ($p < 0.0001$) ve concordance korelasyon katsayısı 0.9382 ((%95 GA=0.9128-0.9563) ($p < 0.0001$)) olarak bulunmuştur. Ayrıca Bland&Altman grafiği ile ($r = -0.042$, $p = 0.672$) iki yöntem sonuçlarının uyum içinde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bu sonuçlara göre iki farklı ölçme aracının birbirleriyle uyumlu olduğu, bununla beraber her iki yöntemin farklı avantaj ve dezavantajlarının olması nedeniyle, laboratuvarın ihtiyacı ve önceliklerine göre iki yöntem arasında seçim yapılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: HbA1c, immunoturbidimetri, HPLC

Abstract

Objective: Development of chronic complications of Diabetes Mellitus, a public health problem, is related with long term blood glucose levels of the patient. Today, measurement of blood hemoglobin A1c (HbA1c) levels were used as an indicator of the risk for development of DM related complications and average retrospective glisemic status. There exist numerous different analysis methods for the determination of blood HbA1c levels in routine test laboratories.

Method: The relationship between the blood HbA1c data obtained with both immunoturbidimetric method by Cobas Integra 800 and ion exchange chromatography by Agilent 1100 HPLC system was evaluated.

Results: The mean±standart deviation of blood HbA1c levels obtained by both Cobas Integra 800 and Agilent 1100 HPLC system are 6.06 ± 1.83 and 6.29 ± 1.59 ; respectively. Among the data obtained by these two methods, the intraclass correlation coefficient and concordance correlation coefficient values were found as 0.9468 (95% CI=0.9223-0.9638); 0.9382 (95% CI=0.9128-0.9563) ($p < 0.0001$), respectively. Furthermore, it was determined that the data obtained by these two methods are in good agreements with the Bland&Altman Plot ($r = -0.042$, $p = 0.672$).

Conclusion: Based on the data obtained in this study, it can be concluded that these two different measurement tools are compatible with each other. However, the most advantageous method should be selected for operation, considering the needs and priorities of the test laboratory as both methods possess different advantageous and disadvantageous.

Key Words: HbA1c, immunoturbidimetry, HPLC

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2009;2(2):25-

Geliş Tarihi : 20.09.2009

Kabul Tarihi : 08.10.2009

Yazışma Adresi:

Dr. Necati MUŞLU

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi ,Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin

Tel : 0-324-3374300-1522

Faks : 0-324-3374305

E-posta : necatimuslu@mersin.edu.tr

Giriş ve Amaç

Diabetes Mellitus (DM), dünya nüfusunun yaklaşık %10'unu ve özellikle gelişmiş ülkelerde 65 yaş üstü nüfusun dörtte birinden fazlasını etkileyen bir halk sağlığı sorunudur. DM'un çok ciddi akut komplikasyonları olmasına rağmen, morbidite ve mortaliteden daha çok kronik komplikasyonlar sorumludur. Kronik komplikasyon gelişiminin, hastanın uzun dönemde kan glukoz düzeyinin kontrolü ile ilgili olduğu bilinmektedir. Günümüzde, açlık kan glukozu ile idrarda glukoz ve keton ölçümleri, diyabetin günlük kontrolü hakkında bilgi sağlarken, hastanın geçmişe yönelik ortalama glisemik durumunun ve komplikasyon gelişme riskinin göstergesi olarak kan hemoglobin A1c (HbA1c) düzeylerinin ölçümü kullanılmaktadır (1-4).

Normal yetişkin hemoglobini, %97 HbA (HbAo), %2.5 HbA₂ ve %0.5 HbF'den oluşmaktadır. Yapılan kromatografik çalışmalarda, HbA'nın posttransisyonel modifikasyonlar sonucu oluşmuş minör alt grupları gözlenmiştir. Karbohidratlar diğer proteinlere olduğu gibi hemoglobine de enzimatik veya nonenzimatik yollarla bağlanabilirler. HbA1 normal yetişkin hemoglobinin (HbAo) nonenzimatik olarak karbohidrat bağlanmış şeklidir ve HbA1a, HbA1b ve HbA1c olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Uluslararası Klinik Biyokimya Derneği (IFCC-International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) tarafından, HbA1'in β-zincirinde N-terminal valinin amino grubuna glukoz bağlanması ile oluşan dayanıklı yapı HbA1c olarak tanımlanmıştır. HbA1c, HbA1 'in yaklaşık %80'ni oluşturan ana glikozile hemoglobindir. HbA1a ve HbA1b ise glukoz dışında, eritrosit içerisinde daha az konsantrasyonda bulunan diğer şekerlerin HbAo'a bağlanması ile oluşan glikolize hemoglobinlerdir (4-6).

Günümüzde DM'lu hastalar için klinik önemi giderek artan HbA1c bir çok farklı yöntemle çalışılabilir. IFCC, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) ile birlikte yapılan Kütle Spektrometri (MS-Mass Spectrometry) veya kapiller elektroforez yöntemini referans yöntem olarak belirlemiştir. Rutinde kullanılan yöntemler genel olarak, glikozile hemoglobin ile glikozile olmayan hemoglobin arasındaki yük veya yapısal farklılıkları temel alırlar. Yük farklılığına göre ayırım yapan yöntemler arasında iyon değişim kromatografisi ve HPLC sık kullanılırken, yapısal farklılığa göre ayırım yapan yöntemler arasında en sık kullanılan immün temelli testlerdir (4,7,8).

Bu çalışmada, laboratuvarımızda bulunan Cobas Integra800 (CI800) otoanalizöründe elde edilen HbA1c sonuçları ile yine laboratuvarımızda bulunan Agilent 1100 HPLC sisteminde elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

Yöntem

Çalışmaya, HbA1c ölçümü istemiyle laboratuara

başvuran hastalar arasından rastgele seçilen ve yaş ortalamaları 45.2±16.3 olan 103 hasta (60 kadın, 43 erkek) dahil edildi. Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden, Cobas Integra800 (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) cihazında ticari kitler kullanılarak ve Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Germany) sisteminde Chromsystems (Chromsystems Inst, Germany) reaktifleri kullanılarak, HbA1c değerleri eş zamanlı olarak ölçüldü.

CI800 cihazında, antikoagulanlı tam kan örnekleri hemoliz edildi ve 552 nm'de absorbans artışının ölçümüne dayanan kolorimetrik yöntemle total hemoglobin ölçümü yapıldı. Bu ölçümden sonra, HbA1c'nin β-N terminal parçasına karşı geliştirilmiş monoklonal antikorların kullanıldığı immünoturbidimetrik yöntemle HbA1c konsantrasyonu ölçüldü. Sonuçta HbA1c, total hemoglobinin yüzdesi olarak verildi.

Agilent 1100 HPLC sisteminde, iyon değiştirici kromatografi yöntemi kullanılarak hemoglobin alt tipleri (HbAo, HbA1a, HbA1b, HbA1c, HbF, ve HbS) ayırt edildi ve HbA1c konsantrasyonu total hemoglobinin yüzdesi olarak verildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için yaş, cinsiyet, açlık kan glukoz düzeyleri ve CI800 ve Agilent 1100 HPLC sistemleri ile elde edilen HbA1c sonuçları ortalama±standart sapma (SS) olarak kaydedildi. Elde edilen sonuçlar için istatistiksel farklılıklar Intraclass korelasyon katsayısı (ICC) kullanılarak değerlendirildi.

Hemoglobin A1c değerleri iki farklı ölçüm yöntemi olan HPLC ve Integra cihazları ile ölçüldü. İki farklı cihazla alınan ölçümler arasında uyum olup olmadığı ICC ve Concordance korelasyon (CCC) ile test edildi ve Bland & Altman grafiği oluşturuldu. Analizler SPSS 11.5 ve MedCalc 11.0 paket programları ile yapıldı. Ayrıca, sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler (ortalama ve standart sapma) elde edildi.

Bulgular

CI800 ve Agilent 1100 HPLC sistemleri ile ölçülen HbA1c değerlerinin sırasıyla 6.06±1.83 ve 6.29±1.59 olduğu belirlendi. Hastaların eş zamanlı ölçülen kan şekeri değerlerinin 111.37±50.89 idi.

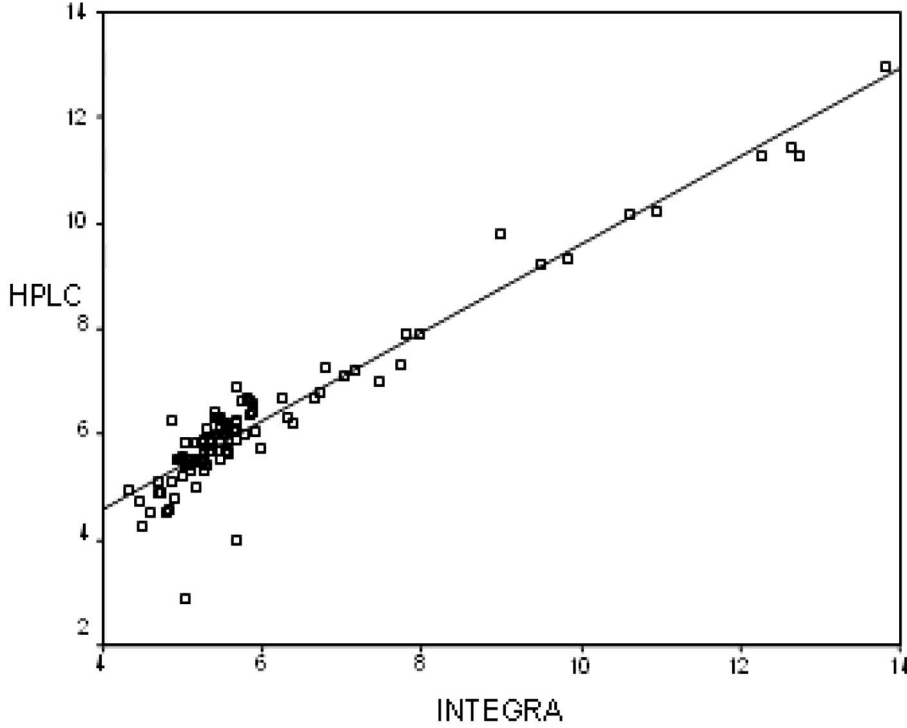
Bu çalışmada Hemoglobin A1c değerleri iki farklı ölçüm yöntemi olan HPLC ve Integra cihazları ile ölçülmüştür. ICC (Two-Way Random) ile yapıldığında korelasyon katsayısı 0.9468 (%95 güven aralığı 0.9223-0.9638) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.0001). CCC ile yapıldığında ise 0.9382 (%95 güven aralığı 0.9128-0.9563) şeklinde hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre iki farklı ölçme aracının birbirleriyle uyumlu olduğu ve HPLC veya Integra cihazlarından hangisi kullanılırsa kullanılsın benzer sonuçlar vereceği

söylenbilir (Şekil 1).

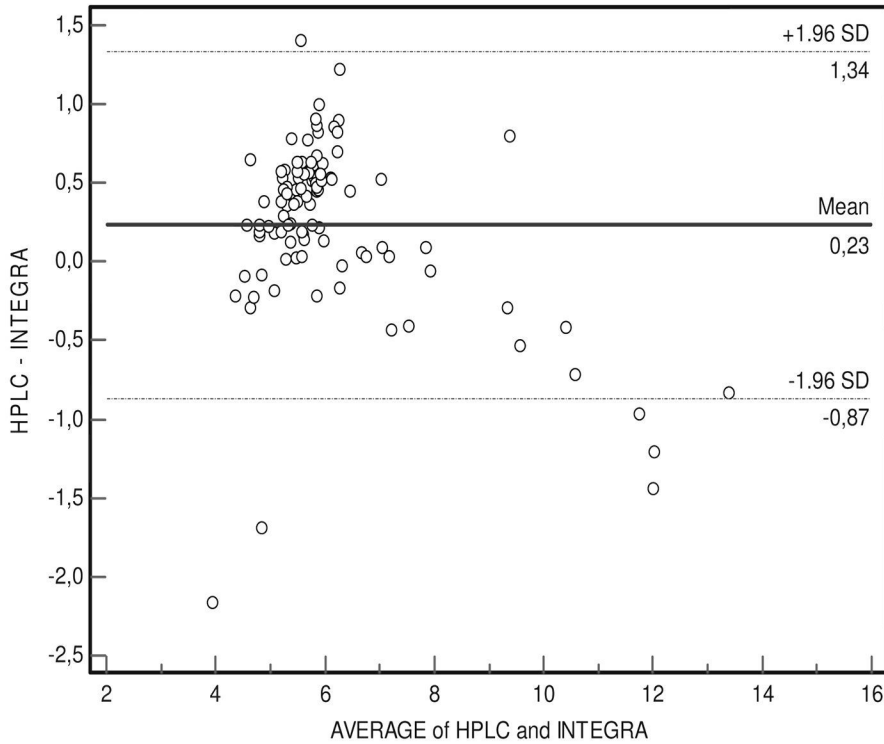
Bu ölçüm değerlerine ait Bland&Altman grafiği ise Şekil 2'de verilmiştir. Farklar ve ortalama değerleri arasındaki korelasyona bakıldığında istatistiksel olarak

anlamli bir ilişki bulunmadığı ($r=-0.042$, $p=0.672$) ve iki yöntem sonuçlarının uyum içinde olduğu belirlenmiştir.

Şekil 1: CI800 ve HPLC sistemleri ile ölçülen HbA1c değerleri arasındaki ilişki



Şekil 2: CI800 ve Agilent 1100 HPLC sistemleri ile ölçülen HbA1c değerleri arasındaki uyumu gösteren Bland&Altman grafiği.



Tartışma ve Sonuç

HbA1c ölçümleri, DM'lu hastaların uzun dönem glisemik kontrolünün ve kronik komplikasyonların gelişme riskinin bir göstergesi olarak kabul edildikten sonra hastaların tedavi yaklaşımlarının da bir parçası olmuştur. Tedavi planlanmasında açlık kan şekeri düzeyleri yanında HbA1c düzeyleri de hedef alınmaya başlamış ve HbA1c ölçümü rutin laboratuvarlardan en sık istenen testler arasında katılmıştır (4,8-10)

Laboratuvarlarda iş yükünün azaltılmasında ve sonuç verme süresinin kısaltılmasında otomatize cihazlar büyük rol oynamaktadır, ancak bir test için otoanalizörde kullanılan yöntemin, temel referans yöntemlerle uyumlu sonuçlar verebilmesi o yöntemin seçilebilmesi için en önemli şarttır.

İyon değiştirici kromatografi-HPLC sisteminde HbA1c çalışması, yöntemin yüksek spesifitesi ve sensitivitesi yanı sıra anormal hemoglobinlerin belirlenmesine yararlı olması açısından önemlidir. Ancak yöntem, pahalı cihaz ve ekipman gerektirmesi, örneğin analiz öncesinde çeşitli işlemlerden geçirilmesi ve özel personel gerektirmesi gibi dezavantajlara sahiptir. İmmunoturbidimetrik yöntemle otoanalizörde HbA1c çalışması ise kullanılan antikorların sadece HbA1c'yi tanınması nedeniyle spesifitesinin yüksek oluşu, örneklerin herhangi bir ön hazırlık gerektirmemesi, bir çok biyokimyasal analizin çalışıldığı otoanalizörde farklı personel ve ekipman gerektirmeden çalışması gibi avantajlara ve anormal hemoglobinlerin tanısında kullanılmaması gibi bir dezavantaja sahiptir (4,8,11-15).

Çalışmamızda, laboratuvarımızda bulunan iki farklı yöntemle, analiz ettiğimiz HbA1c sonuçlarının uyumunu inceledik. İyon değişim kromatografisi yöntemini temel alan Agilent 1100 HPLC sistem sonuçları ile immunoturbidimetrik yöntemi temel alan CI800 otomasyon cihazının sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu belirlendi. Bununla beraber her iki yöntemin farklı avantaj ve dezavantajlarının olması nedeniyle, laboratuvarın ihtiyacı ve önceliklerine göre iki yöntem arasında seçim yapılabilir.

Kaynaklar

1. Fleming JK. Evaluation of HbA1c on the Roche COBAS Integra800 closed tube system. *Clin Biochem* 2007;40(11):822-7.
2. Centers for Disease Control.
Erişim:
<http://www.cdc.gov/diabetes/statistics/prev/national/figpersons.htm>
Erişim Tarihi: 15.08.2009
3. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem* 1986;32:B64-B70.
4. Kurt İ. Glikozile hemoglobin (HbA1c) ölçümü ve diabetes mellitusun uzun dönem glisemik kontrolünde kullanılması. *Gülhane Tıp Dergisi* 2003;45:387-95.
5. Jeppsson JO, Kobold U, Ban J. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:78-89.
6. Alıcı S, Dülger HH. Hemoglobinlerin nonenzimatik glikozilasyonu. *Van Tıp Dergisi* 2001;8:105-9.
7. Sacks DB, Path FRC. Carbohydrates. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Elsevier Saunders Inc. 2006;837-901.
8. Coskun A, Yavuz Ö, Memisoğulları R, Yüksel HK. HbA1c ölçümünde HPLC ve turbidimetrik immüno-inhibisyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2007;1:17-21.
9. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002;48:436-72.
10. American Diabetes Association: Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:S106-S108.
11. Gillery P, Labbé D, Dumont G, Vassault A. Glycohemoglobin assays evaluated in a largescale quality control survey. *Clin Chem* 1995;41:1644-8.
12. Groche D, Hoeno W, Hoss G, Vogt B, Herrmann Z, Witzigmann A. Standardization of two immunological HbA1c routine assays according to the new IFCC reference method. *Clin Lab* 2003;49:657-61.
13. Blanckaert N, Desmet K, Geerts R. Turbidimetrik HbA1c yönteminin CobasIntegra için değerlendirilmesi. *Türk Biyokimya Dergisi* 1997;2:60-1.
14. Bary L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001;47:153-63.
15. Marshall SM, Barth JH. Standardization of HbA1c measurements: a consensus statement. *Ann Clin Biochem* 2000;37: 45-6.