

Presumptivní kombinované HPLC stanovení fetálního hemoglobinu využitím modu pro glykovaný hemoglobin

Kukačka J., Klapková E., Průša R.

Ústav klinické biochemie a patobiochemie UK 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Motol, Praha

SOUHRN

Cíl: Stanovení fetálního hemoglobinu (HbF) je důležité pro diagnostiku hemoglobinopatií a jiných onemocnění. Cílem naší práce bylo zhodnotit možnost presumptivního stanovení HbF v modu pro stanovení glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) na automatickém HPLC analyzátoru Tosoh HLC-723 G7.

Materiál a metody: K analýze HbF v modu pro stanovení HbA_{1c} bylo použito 63 vzorků nesrážlivé krve. Vzorky byly rozděleny do 3 skupin: 1. skupina (n = 24), HbF v intervalu 1–2 % z celkového hemoglobinu (Hb); 2. skupina (n = 21), HbF v intervalu 2–5 % z celkového Hb; 3. skupina (n = 18), HbF > 5 % z celkového Hb. U těchto vzorků byl zároveň kvantifikován HbF v thalasemickém modu stejného přístroje.

Výsledky: Hodnoty HbF mezi 1–2 % spolu nekorelovaly (r = 0,241). Naopak byla nalezena korelace hodnot mezi 2–5 % (r = 0,825; p < 0,001), stejně tak jako hodnot HbF > 5 % (r = 0,889; p < 0,001). Klinický význam mají především hodnoty patologické, tedy hodnoty HbF větší než 2 % z celkového Hb. Takové hodnoty stanovené v modu pro analýzu glykovaného hemoglobinu je možno pokládat za správné. Naopak hodnoty HbF pod 2 % z celkového Hb stanovené v modu pro glykovaný hemoglobin nejsou analyticky správné.

Závěr: Závěrem je možné konstatovat, že analytický mod pro stanovení glykovaného hemoglobinu na analyzátoru Tosoh HLC-723 G7 je možné použít také pro presumptivní kombinované HPLC stanovení fetálního hemoglobinu.

Klíčová slova: fetální hemoglobin, HbA_{1c}, HPLC, Tosoh HLC-723 G7.

SUMMARY

Kukačka J., Klapková E., Průša R.: Presumptive combinatory HPLC determination of fetal hemoglobin employing mode for glycosylated hemoglobin

Objective: Measurement of foetal hemoglobin (HbF) has an important clinical value in the diagnosis as well as in characterization of some Hb structural variants and other hemoglobinopathies. We evaluated presumptive HbF quantification in analytical mode for glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) on Tosoh HLC-723 G7 analyser.

Material and Methods: We analysed 63 blood samples and quantified HbF by mode for glycosylated hemoglobin. The samples were sorted to 3 groups according HbF values: group 1 (n = 24) included HbF values 1–2 % of total hemoglobin (Hb), group 2 (n = 21) included HbF values 2–5 % of total Hb, and group 3 (n = 18) included HbF > 5 % of total Hb. We simultaneously measured HbF in all samples in mode for β -thalassaemia determination on the same analyser.

Results: The HbF values between 1–2 % obtained by glycosylated mode did not correlated with results by β -thalassaemia mode (r = 0.241). The both HbF values between 2–5 % and HbF values > 5 % of total Hb correlated acceptable with results by β -thalassaemia mode (r = 0.825 and 0.889 respectively; p < 0.001). Only pathological HbF values higher than 2 % of total Hb have the clinical significance. These values measured by mode for HbA_{1c} determination is possible to take as correct. On the contrary, all HbF values lower than 2 % of total Hb, measured by mode for HbA_{1c} determination, are not reliable.

Conclusion: We conclude that analytical mode for HbA_{1c} determination is also suitable to use for presumptive combined HbF quantification on Tosoh HLC-723 G7 analyser.

Key words: Fetal hemoglobin, HbA_{1c}, HPLC, Tosoh HLC-723 G7.

Úvod

Fetální hemoglobin (HbF) ($\alpha_2\gamma_2$) je hlavní hemoglobinový komponent plodu a novorozenců. Jeho hodnoty se pohybují mezi 75–90 % celkového hemoglobinu (Hb). Během prvních měsíců života je rychle nahrazován dospělým hemoglobinem HbA ($\alpha_2\beta_2$). Přeměna těchto syntetických procesů je většinou kompletní 3–6 měsíců po narození, kdy HbF klesne pod 5 % celkového Hb. Množství HbF dále klesá až na hodnoty menší než 1 % z celkového Hb.

Velký klinický význam má stanovení HbF spolu s hemoglobinem HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) v diagnóze a charakterizaci některých strukturních variant Hb a jiných hemoglobinopatií. Samotné stanovení HbF je důležité pro

diagnózu $\delta\beta$ -thalasémie, vrozené perzistence HbF nebo při sledování pacientů léčených hydroxyureou. U některých cytotoxických látek, růstových faktorů a faktorů vyvolávajících diferenciaci, jako je butyrát a fenylacetát, bylo prokázáno, že zvyšují množství HbF v krvi [1, 2].

Cílem naší práce bylo zhodnotit možnost presumptivního stanovení HbF v modu (analytickém režimu) pro stanovení glykovaného hemoglobinu (HbA_{1c}) na automatickém HPLC analyzátoru Tosoh HLC-723 G7. Chtěli jsme zjistit, zda a za jakých podmínek lze vyšetření HbF na dostupnějším glykovaném modu použít v klinické praxi, minimálně presumptivně, tedy nalézt hodnotu (interval), která jasně odliší patologické výsledky.

Materiál a metody

HPLC systém

Všechny vzorky byly analyzovány ve dvou nezávislých modech (tzv. glykovaný a thalase-mický), se kterými pracuje analyzátor Tosoh HLC-723 G7. Tosoh HLC-723 G7 je plně automatizovaný HPLC systém, pracující s reagensy a podmínkami specificky navrženými k separaci a kvantifikaci HbA_{1c} v modu pro tzv. glykovaný hemoglobin HbA_{1c} během 3 minut nebo na modu k separaci a kvantifikaci HbA₂ a HbF během 7,5 min [3]. V thalase-mickém modu lze identifikovat i další hemoglobinové varianty jako HbS, HbC a HbD podle retenčních časů. Také v glykovaném modu lze identifikovat další varianty hemoglobinů – HbA_{1a}, HbA_{1b}, labilní frakce HbA_{1c}, HbF. Separace hemoglobinů probíhá při 25 °C na ionexové koloně (TSK-gel G7 β THAL.HSI, Tosoh pro thalase-mický mod, TSK-gel G7 HSI, Tosoh pro glykovaný mod). Eluce frakcí probíhá krokově s použitím citrátových pufrů [3] s odlišnou koncentrací solí a s odlišným pH. Eluované Hb frakce jsou detekovány při 2 vlnových délkách (415 a 510 nm). Pro stanovení HbA₂ a HbF je zavedena 1bodová kalibrace, pro stanovení HbA_{1c} 2bodová. Typický chromatografický záznam získaný z modu pro diagnostiku thalasémie a z modu pro stanovení glykovaného Hb znázorňují obr. 1a, 1b.

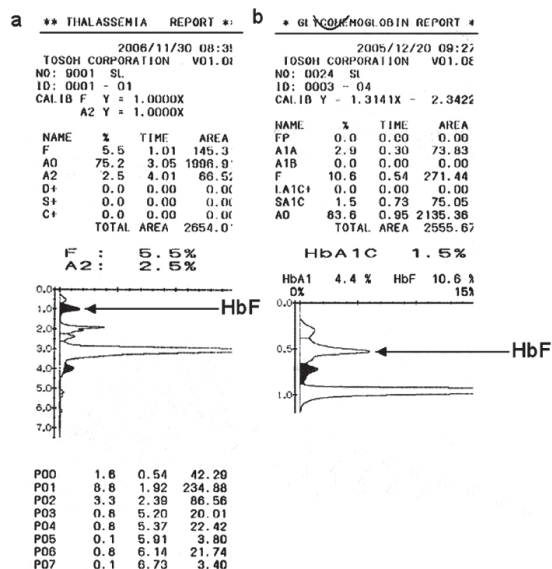


Fig. 1. Typical analysis reports obtained with Tosoh HLC-723 G7 from Hb separation by β -thalassaemia mode (1a) and HbA_{1c} mode (1b)

Analytické zhodnocení

Pro analýzu bylo vybráno 63 vzorků nesrážlivé krve (EDTA) z diabetologických ambulancí FN Motol, u nichž je stanovení HbF součástí analýzy HbA_{1c}. HbF byl u všech vybraných pacientů větší než 1 % z celkového Hb. Vzorky byly rozděleny do 3 skupin: 1. skupina (n = 24), HbF v intervalu 1–2 % z celkového Hb; 2. skupina (n = 21), HbF v intervalu 2–5 % z celkového Hb; 3. skupina (n = 18), HbF > 5 % z celkového Hb. U těchto vzorků byl kvantifikován HbF v modu pro diagnostiku thalasémie stejným přístrojem. Analýzy byly provedeny do 48 hodin po obdržení materiálu do laboratoře.

Opakovatelnost v sérii a mezi sériemi byla zhodnocena pomocí kontrolního materiálu β -thalasemia (Bio-rad,

Montreal, Canada) na 2 hladinách koncentrace HbF v modu pro stanovení HbA_{1c}. Byly stanoveny průměry měření, variační koeficienty a směrodatné odchylky opakovatelnosti (v sérii 20 měření) a opakovatelnosti mezi sériemi (každý z obou vzorků byl měřen 20 dní po sobě v singletu).

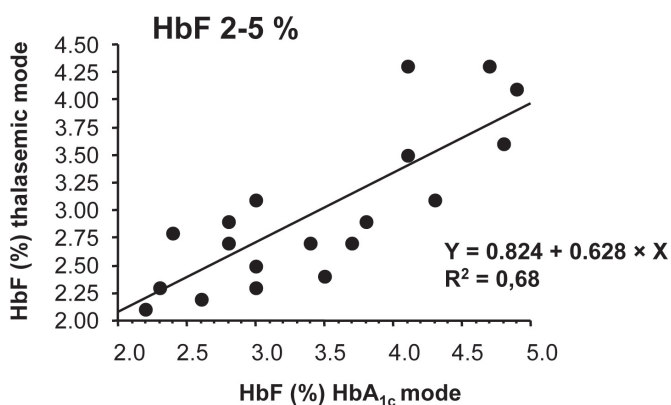
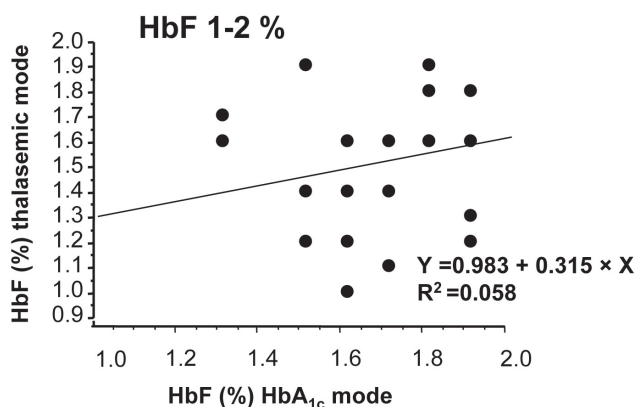
K porovnání jednotlivých modů (metod) pro stanovení HbF byla použita jednoduchá regrese k odvození směrnice regresní křivky, úseku na ose y a korelační koeficient. Data byla zpracována statistickým programem StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, USA).

Výsledky

Hodnoty HbF stanovené v modu pro glykovaný hemoglobin byly porovnány s hodnotami získanými v modu pro diagnostiku thalasémie. Výsledky získané lineární regrese pro jednotlivé skupiny hodnot jsou uvedeny v grafech 2–4. Hodnoty HbF mezi 1–2 % z celkového Hb (graf 2) spolu nekorelují (r = 0,241). Zároveň se všechny hodnoty naměřené následně v thalase-mickém modu pohybovaly v intervalu 1–2 % z celkového Hb. Hodnoty HbF mezi 2–5 % z celkového Hb (graf 3) korelují akceptovatelně (r = 0,825; p < 0,001), stejně tak jako hodnoty HbF > 5 % z celkového Hb (r = 0,889; p < 0,001) znázorněné na grafu 4.

Opakovatelnost v sérii a mezi sériemi

Souhrn výsledků opakovatelnosti v sérii a mezi sériemi analýzy HbF je uveden v tabulce 1. Byla zjištěna velmi dobrá opakovatelnost v sérii, CV u obou kontrolních materiálů byl menší než 2 %. Opakovatelnost mezi sériemi u nízké kontroly byla uspokojivá (CV = 2,2 %), pro vysokou hodnotu HbF však nedostačující (CV = 10,5 %).



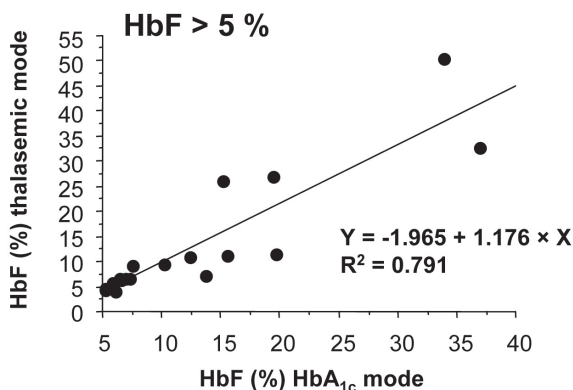


Fig. 2–4. Comparison of the fetal hemoglobin results, measured with the Tosoh HLC-723 G β -thalassemia mode and Tosoh HLC-723 G7 HbA_{1c} mode

The data were sorted to 3 intervals, 1–2 % HbF (Fig. 2), 2–5 % HbF (Fig. 3), and HbF > 5% of total hemoglobin (Fig. 4).

Diskuse a závěry

Pro stanovení HbF a HbA_{1c} jsou dostupné různé analytické techniky, nicméně jedna technika, a tou je HPLC, v této oblasti zažívá nevídanou renesanci, a to díky preciznější kvantifikaci, úspoře času a plné automatizaci a tím konkuruje klasicky užívaným metodám, jako jsou elektroforetické metody, ion-výměnná chromatografie na mikrokolonkách, radioimunodifuze nebo alkalický denaturační test. Je nutno připomenout, že se rozvíjí i další analytické techniky pro stanovení Hb variant, ať už imunochemické nebo kapilárně-elektroforetické, které však na širší rutinní využití v klinických laboratořích ještě čekají [4, 5].

Chtěli jsme zjistit, zda stanovení HbF v modu pro detekci HbA_{1c} analyzátoru Tosoh HLC-723 G7, kde jeho analýza probíhá za podmínek primárně určených pro rozdělení a detekci HbA_{1c}, je jednoduše použitelné. Z výsledků vyplývá, že při splnění určitých kritérií, probíhá analýza HbF správně. Klinický význam mají hlavně hodnoty patologické, tedy hodnoty HbF větší než 2 % z celkového Hb. Tyto hodnoty stanovené v modu pro analýzu glykovaného hemoglobinu lze pokládat za správné. Naopak hodnoty HbF pod 2 % z celkového Hb stanovené v modu pro glykovaný hemoglobin nejsou věrohodné.

Kombinované stanovení HbF má ještě jeden důležitý aspekt. Děti diabetických matek mohou mít zvýšenou koncentraci HbF a bylo prokázáno, že samotný diabetes je asociovaný s vyšší hladinou HbF. Některé studie pro-

kázaly, že u diabetu I. typu je až 3krát vyšší hladina HbF než u diabetu II. typu [6]. Příčina a mechanismus tohoto zvýšení není dosud jasný. Z těchto důvodů je důležité, aby byla v praxi pro stanovení glykovaného hemoglobinu správně zvolena taková analytická metoda, která dovede spolehlivě eliminovat interferenci glykovaného HbF. Rutinní měření HbF současně při měření glykovaného hemoglobinu HbA_{1c} by mělo vyloučit patologické zvýšení HbF a tedy i vyloučit tuto interferenci [7].

Rutinní stanovení HbA_{1c} na analyzátoru Tosoh HLC-723 G7 umožňuje kombinované stanovení HbF v současných podmínkách. Mod pro diagnostiku thalasémie je primárně určený pro stanovení hemoglobinu HbA₂, jeho provoz je ekonomicky náročnější a je vhodný pro specializovaná pracoviště s větším počtem analýz.

Literatura

1. Old, J. M. Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev.*, 2003, 17, p. 43–53.
2. Borba, R., Lima, C. S., Grotto, H. Z. Reticulocyte parameters and hemoglobin F production in sickle cell disease patients undergoing hydroxyurea therapy. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2003, 17, p. 66–72.
3. Paleari, R., Cannata, M., Leto, F., Maggio, A., Demartis, F. R., Desogus, M. F., Galanello, R., Mosca, A. Analytical evaluation of the Tosoh HLC-723 G7 automated HPLC analyzer for hemoglobin A2 and F determination. *Clin. Biochem.*, 2005, 38, p. 159–165.
4. Jenkins, M., Ratnaik, S. Capillary electrophoresis of hemoglobin. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003, 41, p. 747–754.
5. Papadea, C., Cate, J. C. T. Identification and quantification of hemoglobins A, F, S, and C by automated chromatography. *Clin. Chem.*, 1996, 42, p. 57–63.
6. Koskinen, L. K., Lahtela, J. T., Koivula, T. A. Fetal hemoglobin in diabetic patients. *Diabetes Care*, 1994, 17, p. 828–831.
7. Puukka, R., Puukka, M. Effect of hemoglobin F on measurements of hemoglobin A1c with physicians' office analyzers. *Clin. Chem.*, 1994, 40, p. 342–343.

Do redakce došlo 23. 1. 2007.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Jiří Kukačka

ÚKBP UK 2. LF a FN Motol

V Úvalu 84

150 06 Praha

e-mail: jiri.kuckacka@lf2.cuni.cz

Table 1. Analytical imprecision of HbF measurements

	n	Expected value (%)	Measured value (%)	Standard deviation	CV (%)	bias (%)
Within-run reproducibility						
Low level control	20	2.4	2.3	0.045	2	-4.2
High level control	20	8.9	7.79	0.094	1.2	-12.5
Between-run reproducibility						
Low level control	20	2.4	2.26	0.05	2.2	-5.8
High level control	20	8.9	8.55	0.9	10.5	-3.9