

CAT Critically Appraised Topic

Titel: Zink- en koperbepaling in bloed: methode en klinische betekenis

Author: Roxane Deley

Supervisor: Dr. Apr. Steven Pauwels

Search/methodology verified by: Dr. Apr. Steven Pauwels

Date: 24/09/2024

CLINICAL BOTTOM LINE

Koper en zink zijn beide belangrijke mineralen in het lichaam, met invloed op talrijke processen en functies. Een deficiëntie van één van deze elementen kan gezondheidsproblemen veroorzaken. Ook een excès kan problemen veroorzaken, maar dit is zeldzamer. In deze CAT werd de waarde van de koper- en de zinkconcentratie in serum onderzocht voor de beoordeling van de koper- en de zinkstatus.

Koper in bloed heeft een zekere waarde als biomarker voor de koperstatus, maar er is veel interferentie door andere factoren (bijvoorbeeld acute fase processen). De koperconcentratie in bloed is betrouwbaar bij ernstige deficiëntie, maar kan matige deficiënties niet gevoelig opsporen. Door een gebrek aan andere merkers wordt koper in bloed, samen met ceruloplasmine, wel nog als voornaamste (screenings)merker gebruikt voor de diagnose van koperdeficiëntie en koperexcès. Echter, deze waarde moet steeds geïnterpreteerd worden samen met klinische symptomen, CRP en andere laboresultaten (bijvoorbeeld vitamine B12), alvorens een definitieve diagnose kan gesteld worden. Koper in bloed is geen sensitieve diagnostische merker voor de ziekte van Wilson, maar sterk verlaagd koper heeft wel een hoge positieve predictieve waarde. De koperconcentratie is opgenomen in een algoritme voor de diagnose van dit syndroom, waar deze waarde gebruikt wordt naast ceruloplasmine en urinair koper. Sterk verlaagd koper in bloed is ook een kenmerk van de ziekte van Menke. Bij dit syndroom wordt koper niet gebruikt voor de diagnose, maar wel in de opvolging.

Zink bevindt zich voor 99% intracellulair, maar zink in bloed is momenteel nog steeds de biomarker voor de zinkstatus met de meeste evidentie voor zowel zinkintake als voor het risico op klinische tekenen van zinkdeficiëntie. Er zijn wel tekortkomingen, zoals grote fluctuaties in de zinkconcentratie afhankelijk van tijdstip, voedingsstatus en inflammatiestatus. Hierdoor is de zinkconcentratie in bloed/serum moeilijk te interpreteren voor een individuele patiënt, zeker bij lichte of matige deficiënties. Andere potentiële biomarkers worden onderzocht, maar worden nog niet in praktijk gebruikt. De zinkconcentratie in serum is vooral waardevol voor de beoordeling van de zinkstatus in de populatie, waarbij IZiNCG (International Zink Nutrition Consultative Group) spreekt over een gevaar voor de volksgezondheid wanneer er bij meer dan 20% van de individuen een waarde bekomen wordt onder de cutoff. Daarnaast wordt ook de zinkintake en de groeiachterstand bij kinderen <5 jaar gebruikt om het risico op zinkdeficiëntie in een populatie in te schatten. Ondanks de beperkingen wordt zink in serum ook aangeraden in de richtlijnen voor de diagnose van zinkdeficiëntie bij individuen, maar dit steeds in combinatie met klinische symptomen en het uitsluiten van andere deficiënties en oorzaken.

Bepaling van de koper- en zinkconcentratie in serum kan op verschillende manieren gebeuren. De gouden standaard methoden zijn (vlam-)atoomabsorptiespectrometrie, Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-EOS) of ICP-massaspectrometrie (ICP-MS). Al deze methoden hebben een zeer hoge sensitiviteit en weinig interferenties. Ze hebben echter wel een hoge kost of zijn arbeidsintensief. Het gebruik van een colorimetrische methode zou een oplossing kunnen bieden. Voor koper lijkt deze methode, op basis van de literatuur en experimenten uitgevoerd in kader van deze CAT, mogelijks acceptabel te zijn. Voor zink was de afwijking op de waarden bekomen met de colorimetrische methode, te groot om de gouden standaard technieken te kunnen vervangen.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Koper en zink zijn als sporenelementen beide van essentieel belang voor het menselijk lichaam. (1) Koper is een onderdeel van de cupro-enzymes, zoals ceruloplasmine, en is actief als cofactor voor metabole processen. (1–3) Hierdoor is koper belangrijk voor allerlei functies van deze enzymen, onder andere ijzermetabolisme, antioxiderende werking, vorming en stabilisatie van bindweefsel, synthese van melatonine, neurotransmissie en energiemetabolisme. (4) Defecten in de homeostase van koper kunnen grote effecten op deze systemen veroorzaken. De ziekte van Menke is een erfelijke recessief overerfbare ziekte en wordt veroorzaakt door een defect in het absorptiemechanisme van koper. Dit syndroom wordt ook wel het 'Menkes Kinky Hair' syndroom genoemd en gaat gepaard met ernstige symptomen zoals ontwikkelingsstoornissen, neurodegeneratie, bindweefsel-, skelet- en haarafwijkingen, en met een levensverwachting van minder dan 3 jaar. (1,5)

De ziekte van Wilson is het gevolg van een autosomale recessieve overerfbare mutatie van het ATP7B gen, wat leidt tot een loss-of-function van het ATP7B proteïne. Hierdoor kan het koper in de lever niet geëxcreteerd worden naar de gal of opgenomen worden in ceruloplasmine. Als een gevolg hiervan accumuleert koper in de hepatocyten en in andere weefsels, zoals de neuronen in de hersenen. Symptomen van dit syndroom variëren, maar zijn vaak van neurologische, psychiatrische, oftalmologische of hepatische aard. Een typisch kenmerk van patiënten met de ziekte van Wilson zijn de zogenaamde Kayser-Fleischerringen in de ogen, vooral bij patiënten met ook neurologische symptomen. De heterogene presentatie en de zeldzaamheid van de ziekte, maakt de diagnose vrij moeilijk. Het merendeel van de patiënten wordt gediagnostiseerd tussen 5 en 35 jaar, en de diagnose laat vaak meer dan 2 jaar na het begin van de symptomen op zich wachten. Vroege diagnose is belangrijk om ernstige complicaties en mortaliteit te voorkomen. (1,4,6)

Verworven koperdeficiëntie kan het gevolg zijn van onvoldoende intake, onvoldoende absorptie, verhoogde noden (bijvoorbeeld bij zwangerschap) en te grote verliezen. (2) De dagelijks aanbevolen hoeveelheid koper voor een volwassen man is 1.7 mg/dag. (7) Onvoldoende inname van koper in Westerse landen komt vooral voor in kader van armoede en anorexia nervosa. Vegetarische diëten bevatten meestal wel voldoende koper, maar de opname is minder efficiënt door een hoger gehalte aan vezels en fytynezuur. Ook patiënten die langere tijd afhankelijk zijn van totale parenterale of enterale voeding (zonder kopersuppletie), kunnen een kopertekort ontwikkelen. Een onvoldoende opname kan voorkomen bij patiënten met malabsorptiesyndromen, zoals inflammatoire darmziekten zoals de ziekte van Crohn, maar ook bij patiënten met coeliakie en chronische diarree. Een voorgeschiedenis van gastro-intestinale operaties waarbij een deel van de darmen werd verwijderd of bariatrische chirurgie gaat gepaard met een verhoogd risico voor kopertekort. Teveel inname van zink kan een iatrogene reden zijn van koperdeficiëntie. In de darm treedt er bij de absorptie immers competitie op tussen de mineralen. De ziekte van Wilson wordt omwille van dit effect behandeld met hoge dosissen zink. Een tekort aan koper kan ook het gevolg zijn van een verhoogd verlies, bijvoorbeeld bij patiënten met ernstige brandwonden of dialysepatiënten. (1,2,8–10)

Belangrijke symptomen van koperdeficiëntie zijn: anemie, leukopenie (neutropenie), myelo(neuro)pathie en optische neuropathie. Ook verhoogde vatbaarheid voor infectie, hypopigmentatie en keratinisatie van huid en haar, skeletafwijkingen en bradycardie komen minder frequent voor. (1,2,9,10)

Acute kopertoxiciteit kan voorkomen bij de accidentele of suïcidale inname van hoge dosissen koper. Bij dosissen tot 1 gram, zijn symptomen vooral van gastro-intestinale aard. Hogere dosissen kunnen gepaard gaan met nausea, overgeven, hemolytische anemie, lever- en/of nierfalen, tot zelfs overlijden. (1,3,4,11,12) Koper zou ook een rol spelen in de ontwikkeling van een aantal neurodegeneratieve ziekten, zoals Alzheimer, Parkinson en Huntington. (1,3,9)

Zink heeft talloze biologische effecten in het lichaam en is ook nu nog onderwerp van meerdere onderzoeken. Globaal gezien heeft zink drie belangrijke functies: een katalyserende, een structurele en een regulatoire functie. Als katalysator van veel enzymen (met name de metalloproteïnases) is zink belangrijk voor hun activiteit. (1,13) Zink vervult zijn structurele functie vooral in de zogenaamde 'zinc finger' proteïnes, die zink binden in een tetraëdraal complex met behulp van 4 cysteïnes. De binding van zink is essentieel voor een correcte tertiaire structuur en de werkzaamheid van het proteïne. Deze proteïnen spelen een rol in de signaaltransductie, cellulair proliferatie/differentiatie, adhesie en transcriptie (als transcriptiefactor). De regulatoire functie van zink is tweeledig. Enerzijds zou zink door interactie met de Metal response element(MRE)-Binding transscriptiefactor (MTF-1), de transscriptie van genen kunnen beïnvloeden. Anderzijds zou niet-eiwitgebonden zink (Zn²⁺) een rol spelen in de intra- en intercellulaire communicatie en allerlei signaaltransductiepathways beïnvloeden. (1,13) Strikte homeostase van zink is onontbeerlijk om deze functies te waarborgen. In het lichaam zijn er meerdere systemen om de zinkconcentratie constant trachten te houden, zowel in het volledig lichaam als op cellulair niveau. Zink bevindt zich immers vooral intracellulair en voert daar ook zijn effecten uit. (1,13–17)

Zinkdeficiëntie kan ontstaan door onvoldoende intake, malabsorptie, overmatig verlies van zink en verhoogd gebruik van zink. Zeker in ontwikkelingslanden is zinkdeficiëntie door onvoldoende intake een belangrijk probleem, maar het komt ook voor in ontwikkelde landen. De aanbevolen dagelijkse hoeveelheid voor volwassen mannen is 11 mg. (7) Wereldwijd loopt naar schatting minstens 17% van de populatie een risico op onvoldoende zinkintake. (18) Andere risicofactoren voor deficiëntie zijn: een plantaardig dieet (fytynezuren hebben een negatief effect op de biobeschikbaarheid van zink), inflammatoire darmziekten, malabsorptiesyndromen (8), leeftijd (vooral jonge kinderen, adolescenten in de groeispurt en ouderen), zwangere vrouwen, vrouwen die borstvoeding geven en allerlei comorbiditeiten die gepaard gaan met een verhoogd verlies van zink (onder andere acute diarree, chronische nierinsufficiëntie, diabetes mellitus en sikkelcelziekte). (13,17,19–21) Acrodermatitis Enteropathica is een zeldzame overerfbare en ernstige vorm van zinkdeficiëntie door een defect in de absorptie, maar kan soms ook verworven zijn. Het gaat gepaard met een zeer ernstige rash met korsten en vesikels, in combinatie met andere symptomen (diarree, groeiretardatie, infecties). (14)

De symptomen van zinkdeficiëntie zijn divers en individueel sterk variabel. De BMJ Best Practice Guidelines schuiven als belangrijkste diagnostische kenmerken naar voor: vertraagde wondheling, verhoogde vatbaarheid voor

infecties, smaakstoornissen, stomatitis, Acrodermatitis Enteropathica en vruchtbaarheids- of zwangerschapsproblemen. (21) Daarnaast zijn groeiachterstand en diarree geassocieerd met zinkdeficiëntie. (13,22,23) Er is ook een associatie met levercirrose. (24)

Zinkexcess kan zowel acute als chronische toxiciteit veroorzaken. Acute effecten zoals nausea, overgeven, krampen en hoofdpijn, treden meestal op bij zeer hoge dosissen (meerdere grammen). maar emetische symptomen kunnen al optreden bij een intake van 50 mg. Chronische zinktoxiciteit kan optreden bij langdurige intakes van 150-450 mg/dag bij volwassenen. Symptomen zijn maagproblemen, verminderde immuunfunctie, verminderde HDL-cholesterol en verlaagde koperconcentratie. Koperdeficiëntie veroorzaakt symptomen zoals neuropathie. (13,16)

Het laboratorium van het Jessa Ziekenhuis in Hasselt ontvangt jaarlijks een 500-tal aanvragen voor de bepaling van enerzijds koper en anderzijds zink in bloed (serum). Deze CAT onderzoekt in welke mate serumconcentraties van deze sporenelementen een goede biomarker zijn voor de koper- of zinkstatus van patiënten en welke betekenis verhoogde of verlaagde waarden hebben. Daarnaast bekijkt deze CAT ook de verschillende methoden die gebruikt worden voor de bepaling van de serumconcentraties en hun voor- en nadelen. Tot slot werden de Randox (Parramatta, Australië) kits voor colorimetrische bepaling van koper en zink uitgetest. De resultaten worden ook kort besproken.

QUESTION(S)

- 1) Wat is de klinische waarde van de koperconcentratie in serum?
- 2) Wat is de klinische waarde van de zinkconcentratie in serum?
- 3) Met welke methode wordt de concentratie van zink en koper bepaald?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Zinc/analysis " AND "Zinc/Blood"; "copper/deficiency"; "zinc/deficiency"
- 2) Pubmed (Medline; from 1966): "zinc blood methods"; "copper blood methods"; "copper deficiency causes"; "copper blood analysis methods"; "copper deficiency diagnosis"; "copper status"; "zinc status"
- 3) International organizations: International Zinc Nutrition Consultative Group (IZINCG); National Institutes of Health (NIH); BMJ Best Practice; Mayo Clinic Laboratories; Voedingsaanbevelingen van de Hoge Gezondheidsraad (HGR); European Food Safety Authority (EFSA)
- 4) UpToDate Online

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1. Scheiber I, Dringen R, Mercer JFB. Metal Ions in Life Sciences Series. Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. 2013. 573 p.
2. Altarelli M, Ben-Hamouda N, Schneider A, Berger MM. Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment. *Nutr Clin Pract.* 2019;34(4):504–13.
3. Collins JF. Copper nutrition and biochemistry and human (patho)physiology. 1st ed. Vol. 96, *Advances in Food and Nutrition Research.* Elsevier Inc.; 2021. 311–364 p.
4. McArdle HJ. Principles of nutritional assessment. Copper. Vol. 3, *Principles of nutritional assessment.* 2023.
5. Ramani PK, Parayil Sankaran B. Menkes Disease. *StatPearls.* 2024.
6. Martínez-Morillo E, Bauça JM. Biochemical diagnosis of Wilson's disease: An update. *Adv Lab Med.* 2022;3(2):103–13.
7. Hoge gezondheidsraad (HGR). Voedingsaanbevelingen voor België - 2016. Brussel; 2016.
8. Cao L, Liang S, Yu X, Guan B, Yang Q, Ming W et al. Change in Mineral Status After Bariatric Surgery: a Meta-analysis. *Obes Surg.* 2023;33(12):3907–31.
9. National Institutes of Health (NIH). Copper [Internet]. Fact sheet for Health professionals. 2022. Available from: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-HealthProfessional/>
10. Myint ZW, Oo TH, Thein KZ, Tun AM, Saeed H. Copper deficiency anemia: review article. *Ann Hematol.* 2018;97(9):1527–34.
11. Hordyjewska A, Popiołek Ł, Kocot J. The many "faces" of copper in medicine and treatment. *BioMetals.* 2014;27(4):611–21.
12. More SJ, Bampidis V, Benford D, Bragard C, Halldorsson TI, Hernández-Jerez AF, et al. Re-evaluation of the existing health-based guidance values for copper and exposure assessment from all sources. *EFSA J.* 2023;21(1).
13. King JC, Brown KH, Gibson RS, Krebs NF, Lowe NM, Siekmann JH, et al. Biomarkers of nutrition for development (BOND)-Zinc Review. *J Nutr.* 2016;146(4):858S-885S.
14. Maverakis E, Fung MA, Lynch PJ, Draznin M, Michael DJ, Ruben B, et al. Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(1):116–24.

15. Krebs NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr.* 2000;130(5 SUPPL.):1374–7.
16. Gibson RS. Principles of nutritional assessment. Zinc. In: *Principles of nutritional Assessment.* 2023.
17. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci.* 2013;18(2):144–57.
18. IZiNCG. Promoting and assisting efforts to reduce global zinc deficiency.
19. Kodama H, Tanaka M, Naito Y, Katayama K, Moriyama M. Japan's practical guidelines for zinc deficiency with a particular focus on taste disorders, inflammatory bowel disease, and liver cirrhosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(8):1–16.
20. Chhetri SK, Mills RJ, Shaunak S, Emsley HCA. Copper deficiency. *BMJ.* 2014 Jun 17;348(jun17 2):g3691–g3691.
21. Singh P, Nee J. *BMJ Best Practice: Zinc deficiency.*
22. Workers H, Who. *Diarrhoea Treatment Guidelines Including new recommendations for the use of ORS and zinc supplementation for Healthcare Workers.* 2005.
23. Rodic S, McCudden C, van Walraven C. The Prognostic Value of Serum Zinc Levels in Acutely Hospitalized Patients: a Systematic Review. *Biol Trace Elem Res.* 2021;199(12):4447–57.
24. Nishikawa H, Asai A, Fukunishi S. The Significance of Zinc in Patients with Chronic Liver Disease. *Nutrients.* 2022;14(22):1–12.
25. Danzeisen R, Araya M, Harrison B, Keen C, Solioz M, Thiele D, et al. How reliable and robust are current biomarkers for copper status? *Br J Nutr.* 2007;98(4):676–83.
26. Harvey LJ, Ashton K, Hooper L, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of copper status in humans: A systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2009;89(6).
27. Milne D. Copper intake and assessment of copper status. *Am J Clin Nutr.* 1998 May;67(5):1041S-1045S.
28. Harvey LJ, McArdle HJ. Biomarkers of copper status: A brief update. *Br J Nutr.* 2008;99(SUPPL. 3):17–20.
29. Altarelli M, Ben-Hamouda N, Schneider A, Berger MM. Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment. *Invit Rev Nutr Clin Pract.* 2019;34:504–13.
30. Kumar N, Butz JA, Burritt MF. Clinical significance of the laboratory determination of low serum copper in adults. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(10):1402–10.
31. Twomey PJ, Viljoen A, House IM, Reynolds TM, Wierzbicki AS. Copper:caeruloplasmin ratio. 2003;12–3.
32. Twomey PJ, Wierzbicki AS, Reynolds TM, Viljoen A. The copper / caeruloplasmin ratio in routine clinical practice in different laboratories. 2009;60–3.
33. Vairo FP e., Chwal BC, Perini S, Ferreira MAP, de Freitas Lopes AC, Saute JAM. A systematic review and evidence-based guideline for diagnosis and treatment of Menkes disease. *Mol Genet Metab.* 2019;126(1):6–13.
34. Lowe NM, Fekete K, Decsi T. Methods of assessment of zinc status in humans. Vol. 89 (suppl), *The American journal of clinical nutrition.* 2009. p. 1S-12S.
35. Wessells KR, King JC, Brown KH. Development of a plasma zinc concentration cutoff to identify individuals with severe zinc deficiency based on results from adults undergoing experimental severe dietary zinc restriction and individuals with acrodermatitis enteropathica. *J Nutr.* 2014;144(8):1204–10.
36. Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: A meta-analysis of randomized controlled trials 1-3. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(6):1062–71.
37. IZiNCG. Adjusting plasma or serum zinc concentrations for inflammation. 2020;(10):1–6.
38. Killilea DW, Rohner F, Ghosh S, Otoo GE, Smith L, Siekmann JH, et al. Identification of a hemolysis threshold that increases plasma and serum zinc concentration. *J Nutr.* 2017;147(6):1218–25.
39. IZiNCG. How to deal with hemolysis for plasma/serum zinc analysis. 2018.
40. Ralstin JO, Schneider PJ, Blackstone L, Ruberg RL. Serum Zinc Concentrations: Contamination from Laboratory Equipment. *J Parenter Enter Nutr.* 1979;3(3):179–81.
41. Williams DM. Trace metal determinations in blood obtained in evacuated collection tubes. *Clin Chim Acta.* 1979;99(1):23–9.
42. Hotz C, Peerson JM, Brown KH. Suggested lower cutoffs of serum zinc concentrations for assessing zinc status: Reanalysis of the second National Health and Nutrition Examination Survey data (1976-1980). *Am J Clin Nutr.* 2003;78(4):756–64.
43. de Benoist B, Darnton-Hill I, Davidsson L, Fontaine O, Hotz C. Conclusions of the Joint WHO/UNICEF/IAEA/IZiNCG interagency meeting on zinc status indicators. *Food Nutr Bull.* 2007;28(3 SUPPL.):480–4.
44. IZiNCG. Analytical Methods for Zinc in Human Studies: Plasma, Serum, and Food Composites. *Int Zinc Nutr Consultative Gr.* 2019;1–12.
45. Tyler G. ICP-MS, or ICP-AES and AAS - a comparison. *Varian Australia Pty Ltd, Mulgrave, Victoria, 3170, Australia; 1994.* p. 1–5.
46. Van Schepdael A. *Methoden in het biofarmaceutisch onderzoek: instrumentele analyse.* 2nd ed. Leuven: ACCO; 2018.
47. ten Boekel E, de Boer BA. *Klinische chemie en hematologie voor analisten.* 3dr ed. Syntax Media; 2022.

48. IZiNCG. Comparison of laboratory instrument types for analysis of plasma or serum zinc concentration. 2020.
49. Hall AG, King JC, McDonald CM. Comparison of Serum, Plasma, and Liver Zinc Measurements by AAS, ICP-OES, and ICP-MS in Diverse Laboratory Settings. *Biol Trace Elem Res.* 2022;200(6):2606–13.
50. Beckett JM, Hartley TF, Ball MJ. Evaluation of the Randox colorimetric serum copper and zinc assays against atomic absorption spectroscopy. *Ann Clin Biochem.* 2009;46(4):322–6.
51. Handley SA, Wanandy T, Prentice L. Validation of the Randox colorimetric assays for serum copper and zinc. *Ann Clin Biochem.* 2023;0(0):1–13.
52. Marlene EM, Enrique B, Carmen AV, De Miguelsanz José Manuel M. Comparison study between colorimetric method and flame atomic absorption spectrophotometry in serum zinc status. *Nutr Clin y Diet Hosp.* 2018;38(2):128–33.
53. Arnaud J, Weber JP, Weykamp CW, Parsons PJ, Angerer J, Mairiaux E, et al. Quality specifications for the determination of copper, zinc, and selenium in human serum or plasma: Evaluation of an approach based on biological and analytical variation. *Clin Chem.* 2008;54(11):1892–9.

1) WAT IS DE KLINISCHE WAARDE VAN DE KOPERCONCENTRATIE IN SERUM?

Een goede inschatting van de koperstatus is belangrijk om koperdeficiëntie of -overload in de populatie tijdig op te sporen. Verschillende instanties zoals 'The National Academy of Sciences' en de 'EU Voluntary Risk Assessment for copper and copper compounds' stellen dat (milde) koperdeficiëntie vaker voorkomend zou kunnen zijn dan gedacht. De symptomen zijn niet éénduidig en de klinische presentatie kan verward worden met vitamine B12 deficiëntie. Tevens zijn er vragen over eventuele overmatige blootstelling aan koper door bijvoorbeeld koperen leidingen. (12,20,25)

Waarde als biomarker van de koperstatus

Koper in serum is voor 80-95% gebonden aan ceruloplasmine. De rest is reversibel gebonden aan albumine en enkele andere eiwitten. (4,25)

De waarde van koperconcentratie in serum werd onderzocht in een systematische review op basis van depletie- en suppletie studies. (26) Deze review beoordeelde koperconcentratie in serum op basis van 7 suppletie studies. Hieruit kon besloten worden dat serum koper beantwoordt aan kopersuppletie, zowel bij koperdeficiënte als bij patiënten met een normale koperstatus bij baseline. Het effect was wel groter bij koperdeficiënte patiënten. Op basis van deze gegevens besloot de review dat koperconcentratie in serum een waarde heeft als biomarker, al zijn de huidige gegevens beperkt. In dezelfde review werd ook ceruloplasmine onderzocht, echter hiervoor waren slechts 2 studies beschikbaar; volgens deze gegevens zou ceruloplasmine alleen verandering in koperstatus reflecteren bij vooraf zeer deficiënte patiënten. Ook bij andere mogelijke biomarkers zoals erythrocyt SOD activiteit of glutathion activiteit, toonde de review een slechte respons op koperdepletie/suppletie of was er onvoldoende evidentie beschikbaar om definitieve conclusies te trekken. (26)

Andere publicaties vermelden dat de koperconcentratie in serum een betrouwbare biomarker is voor ernstige koperdeficiëntie maar geen gevoelige indicator van de koperstatus bij randverlaagde waarden. (2,4,27)

Omdat het grootste deel van koper gebonden is aan ceruloplasmine, is de koperconcentratie in bloed sterk geassocieerd met de ceruloplasmineconcentratie. Net zoals koper daalt het ceruloplasminelevel bij ernstige koperdeficiëntie, waar het nog een waarde heeft, maar de respons op matige of korte termijn deficiëntie is variabel en minder gevoelig. (25,27,28)

Een van de redenen voor de lagere sensitiviteit van koper en ceruloplasmine, zijn de vele andere factoren die de serumconcentratie van deze parameters beïnvloeden. Ceruloplasmine is een acuut fase eiwit en stijgt bij infectie en inflammatie; de koperconcentratie stijgt steeds mee. Bij een verhoogd CRP is de meting van koper bijgevolg mogelijk gestoord. Zwangerschap en oestrogenen (in medicatie) hebben een effect op de ceruloplasminesynthese en zorgen voor verhoogde ceruloplasmineactiviteit en hogere gemeten koper en ceruloplasmineconcentraties. Malnutritie en andere oorzaken van verminderde proteïnesynthese kunnen een daling van de ceruloplasmineconcentratie veroorzaken en daarbij ook de koperconcentratie. (4,25,29,30) De koperconcentratie los van ceruloplasmine wordt beïnvloed door regelmatige lichaamsbeweging, roken en verschillende ziekten zoals leukemie. (4)

Meerdere alternatieve potentiële biomarkers werden al onderzocht, bijvoorbeeld de activiteit van verschillende koperafhankelijke enzymen, maar de effectiviteit van deze merkers is onvoldoende of moet nog verder onderzocht worden vóór deze in praktijk gebruikt kunnen worden. (4,25,26)

Diagnose van kopertekort

Een review uit 2019 heeft een algoritme opgesteld voor de bepaling van het koperdeficiëntierisico (zie figuur 1). Dit algoritme is gebaseerd op de koperconcentratie in het serum, de ceruloplasmineconcentratie en eventueel CRP. Op basis van dit algoritme kan beslist worden of repletie nodig is, IV of PO. Koperconcentratie in bloed wordt hier gezien als screeningstest voor deficiëntie, waarbij de diagnose van een (chronische) deficiëntie niet perse afhangt van de gemeten concentraties. Daarnaast wordt in deze review aangeraden om de diagnose te bevestigen aan te hand van koper in 24-uurs urine of Cu/Zn SOD concentratie. Ten slotte moeten bij een vermoeden van koperdeficiëntie, ook steeds andere parameters zoals vitamines, ijzer en zink nagekeken worden. (2)

De NIH benoemt ook het gebruik van koper en ceruloplasmineconcentratie voor de inschatting van de koperstatus maar benadrukt dat er geen biomarkers geïdentificeerd zijn die de koperstatus op een accurate en betrouwbare manier kan inschatten. (9)

In 2014 werd een 'practice' artikel over koperdeficiëntie gepubliceerd in de BMJ, als deel van een reeks artikelen over ondergediagnostiseerde condities. Voor de diagnose van koperdeficiëntie kijkt dit artikel naar klinische symptomen zoals anemie en neurologische symptomen en naar laboratoriumwaarden, met name koperconcentratie in serum. Daarnaast wordt ook de bepaling van vitamine B12 en zink aangeraden en eventueel neurologische onderzoeken zoals een MRI van de wervelkolom. (20)

Kortom is er een nood aan alternatieve biomarkers voor de koperstatus, maar deze zijn voorlopig niet beschikbaar, waardoor de koperconcentratie samen met de ceruloplasmineconcentratie in serum momenteel een onderdeel van de diagnose blijft.

Diagnose van exces

De diagnose van koperexces komt niet vaak voor. Er is niet veel evidentie voor biomarkers die beantwoorden aan een koperexces, of richtlijnen voor diagnose. Ceruloplasmine (en in navolging koper in serum) is geen goede biomarker omdat er veel andere factoren zijn die de waarden beïnvloeden, zoals inflammatie, oestrogenen en leeftijd. (25) De NIH richtlijn gebruikt een 'normale range' van 63.5-158.9 µg/dL voor koper in serum en 180-400 mg/L voor ceruloplasmine, maar vindt deze parameters niet ideaal. Naast laboratoriumresultaten geven zij ook een advies over de maximale koper intake per dag (Upper Limit Level). Voor een volwassen man is dat 10 mg per dag. (9) Een publicatie van de EFSA in 2023 had als doel om een acceptabele dagelijkse intake te definiëren. Als ADI werd uiteindelijk voor 5 mg/dag gekozen, omdat evidentie aangeeft dat koperretentie al kan optreden bij een chronische intake van 6-8 mg/dag. Deze limieten kunnen gebruikt worden om het risico op kopertoxiciteit in de schatten bij een mogelijke diagnose van koperexces. (12)

Ziekte van Wilson

De koperconcentratie in serum is nuttig bij de diagnose van de ziekte van Wilson. Bij Wilson disease wordt koper niet ingebouwd in ceruloplasmine, waardoor het enzymatisch inactieve apoceruloplasmine (zonder ingebouwd koper) snel gedegrademd wordt en de gemeten ceruloplasmineconcentratie daalt. (3,6,30) De serumconcentratie van koper daalt normaal gezien samen met die van ceruloplasmine. Echter deze waarde kan ook normaal of verhoogd zijn, door andere factoren zoals acuut leverfalen, chronische cholestase, zwangerschap, oestrogenen of te hoge inname van koper, die de koperconcentratie in het serum verhogen. Verlaagde koperconcentratie is bovendien ook aanwezig bij patiënten met verworven koperdeficiëntie of Menkes disease. Omwille van de lage negatieve predictieve waarde en lage sensitiviteit voor de diagnose van Wilson disease (69%-74%) wordt het gebruik van totale koperconcentratie niet aangeraden bij de diagnose van de ziekte van Wilson. Abnormaal lage koperconcentraties hebben daarentegen wel een goede positieve predictieve waarde voor Wilson, eenmaal andere oorzaken van koperdeficiëntie werden uitgesloten, en in combinatie met ceruloplasmine.

Serum koper is geen onderdeel van het Leipzig score systeem voor de diagnose van de ziekte van Wilson. Het gebruik van dit scoresysteem wordt aangeraden door de European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN), en kijkt vooral naar klinische symptomen, ceruloplasmine (verlaagd) en koper in urine (verhoogd) en de lever (verhoogd), alsook de mutatieanalyse van het ATP7B gen. In het algoritme voorgesteld door de 'American Association for the study of liver diseases' wordt de serum koperconcentratie wel gebruikt om een onderscheid te maken tussen 'likely Wilson disease' en 'very likely Wilson disease' bij een licht verlaagde of verhoogde waarde van respectievelijk ceruloplasmine of urinair koper, gezien de grote positieve predictieve waarde. (zie figuur 2) (6)

Naast het meten van koper- en ceruloplasmineconcentraties in serum, urine of leverbiopsieën, is er de laatste jaren ook aandacht voor 'relative exchangeable copper'. De theorie is dat bij de ziekte van Wilson, de totale koperconcentratie daalt in respons op de daling van ceruloplasmine, maar dat de hoeveelheid 'beschikbaar' koper toeneemt. De berekende parameter 'niet-ceruloplasmine gebonden koper' werd voorgesteld als diagnostische merker, maar is niet bruikbaar in de klinische praktijk. De berekening gaat namelijk uit van 6 koperatomen per ceruloplasmine (wat niet altijd het geval is) en de waarde is ook verhoogd bij andere aandoeningen zoals cholestase, acuut leverfalen of koper overload. In meer dan 20% van de patiënten wordt uiteindelijk een fysiologisch onmogelijk negatief resultaat bekomen. 'Relative exchangeable copper'(REC) is het percentage 'biobeschikbaar koper' in het bloed ten opzichte van de totale koperconcentratie. Het 'biobeschikbaar koper' is het gedeelte koper gebonden aan albumine maar ook aan alfa-2-macroglobuline, aminozuur en de externe structuur van ceruloplasmine. Dit kan gemeten worden aan de hand van ultrafiltratie van het serum. REC is een veelbelovende parameter met een heel hoge diagnostische performantie volgens de huidige literatuur, maar prospectieve studies zijn nodig om de betrouwbaarheid te bevestigen. (6,30-32)

Ziekte van Menke

Serum koper en ceruloplasmine waardes zijn typisch verlaagd bij het Menke syndroom. Deze waardes zijn echter ook vaak verlaagd bij gezonde kinderen jonger dan 6 maanden. Een definitieve diagnose wordt gesteld door deze resultaten te correleren met klinische symptomen, beeldvorming van hersenen en haar, een plasma catecholamine-analyse (verhoogde DOPA/DHPG ratio), en genetisch onderzoek. Vooral die laatste twee worden aanbevolen voor de (neonatale) diagnose, met een hoge graad van aanbeveling en kwaliteit van evidentie. (5,33)

Koper in serum en ceruloplasmine kunnen wel nuttig zijn bij de opvolging van de ziekte van Menke. Tijdens de behandeling moeten serum koper en ceruloplasmine nagekeken worden voor normalisatie. Behandelde patiënten moeten elke 6 maanden opgevolgd worden met een neurologisch onderzoek en koper- en ceruloplasminelevels in het serum. (33)

2) WAT IS DE KLINISCHE WAARDE VAN DE ZINKCONCENTRATIE IN?

Minder dan 1% van de totale hoeveelheid zink in het lichaam is aanwezig in het bloed, en daarvan is het grootste deel aanwezig in de erythrocyten. De functie van zink wordt bovendien voornamelijk intracellulair uitgeoefend en is sterk afhankelijk van de cellulaire homeostase en buffercapaciteit. (13,17) We mogen er dus niet zomaar vanuitgaan dat de concentratie in het serum de hoeveelheid functioneel zink weerspiegelt.

Waarde als biomarker van de zinkstatus

De zinkconcentratie in serum/plasma als biomarker voor de zinkstatus werd uitgebreid onderzocht in de systematische review van Lowe et al (2009). (34) Deze systematische review beoordeelt een biomarker op basis van de mate dat deze biomarker een verandering in de zinkstatus kan reflecteren. Op basis van 35 suppletiestudies en 10 depletiestudies concludeert men in deze review dat er een significante respons is van de zinkconcentratie in plasma/serum op veranderde intake. Er is een grotere respons bij lagere baseline concentraties. De suppletiestudies waren voornamelijk uitgevoerd op volwassenen en ouderen. De depletiestudies waren ook vooral uitgevoerd op volwassenen, en de intake was steeds maar mild verlaagd. Hierdoor konden er geen definitieve conclusies getrokken worden over het gebruik van zink bij kinderen (nochtans een belangrijke risicogroep) of ernstige tekorten in het dieet. Al bij al concludeert de studie dat zink in serum/plasma een goede merker lijkt. (34)

De 'Biomarkers of Nutrition for Development Zinc Expert Panel'(BOND) -zink review heeft eveneens de effecten van zinkdepletie en -suppletie op de concentratie zink in serum/plasma bekeken. De conclusie is gelijkaardig: de concentratie zink in serum/plasma verandert vrij snel in respons op zinksuppletie, in verhouding met de dosis. Restrictie van zink in het dieet zorgt voor verlaagde concentratie in serum/plasma, maar vooral bij een ernstige depletie of een matige depletie voor zeer lange duur. (13)

Naast een respons op veranderende intake en blootstelling, bekijkt deze review ook de relatie tussen de zinkconcentratie in plasma/serum en de klinische symptomen van zinkdeficiëntie. Bij patiënten met Acrodermatitis Enteropathica werd een duidelijke associatie gezien tussen de aanwezigheid en de ontwikkeling van klinische symptomen, en de concentratie zink in plasma. (13,35)

De derde factor waaruit blijkt dat de concentratie zink in plasma een plaats heeft als biomarker, is de functionele outcome van zinksuppletie. Het effect van zinksuppletie bij prepuberale kinderen werd nagekeken in een meta-analyse: zinksuppletie zorgt voor een significant positief effect op de lengte en gewichtstoename van de kinderen ten opzichte van de controlegroep. De concentraties van zink in het serum zijn ook significant hoger bij de suppletiegroep in vergelijking met de controlegroep en lagere initiële zinkconcentraties zouden een voorspellende factor zijn voor een groter effect op de groei. (13,36)

Wat betreft acute diarree zou naar schatting meer dan de helft van de mortaliteit van diarree gelinkt zijn aan slechte zinkintake. Het is aangetoond dat het toedienen van zinksupplementen bij de behandeling van diarree de ernst en duur kunnen verminderen en de mortaliteit bij zinktherapie daalt met 13%. Omwille hiervan beveelt de WHO en UNICEF in hun gezamenlijke 'diarrhoea treatment guidelines', het gebruik van zinksuppletie voor 10 tot 14 dagen aan, in combinatie met Oral Rehydration Therapy (ORS). Ook bij pneumonie daalt de mortaliteit met 15% met zinktherapie. Het staat echter niet vast dat deze effecten het gevolg zijn van het herstellen van een zinkdeficiëntie. Het is eveneens mogelijk dat een hoge dosis zink een farmacologisch effect heeft, onafhankelijk van de zinkstatus. (13,22)

Op basis van deze gegevens lijkt de zinkconcentratie in serum een goede biomarker te zijn voor zowel blootstelling aan zink als aan voor het risico op klinische tekenen van zinkdeficiëntie, maar zijn er ook tekortkomingen.

Tekortkomingen van zinkconcentratie in serum als biomarker

Eenzijds zijn er naast de werkelijke zinkstatus veel andere factoren die de concentratie kunnen beïnvloeden. De serumconcentraties van zink fluctueren meer dan 20% op 24 uur, afhankelijk van de voedingsstatus en het dag/nacht ritme. Zinkconcentraties dalen bij acute infecties en inflammatie, door een redistributie van zink naar de lever en een daling van albumine waaraan zink in serum voor het grootste deel gebonden is. (13,16,17) Op basis van twee andere inflammatoire markers (CRP en alfa-1-acid glycoproteïne) is het mogelijk om de inflammatiestatus te beoordelen en de resultaten eventueel te corrigeren. (37) Andere condities die een daling van albumine veroorzaken, zoals levercirrose en eiwitmalnutritie, zorgen voor een daling in de gemeten zinkconcentratie. Hemodilutie, zoals bij zwangerschap en gebruik van orale contraceptiva, zorgt ook voor een lagere gemeten waarde die niet noodzakelijk de werkelijke zinkstatus reflecteert. (13,16,17)

Zinkconcentratie kunnen vals verhoogd zijn door hemolyse van het staal door vrijkomen van het intracellulair zink. (38,39) Verlengde vaso-occlusie door te lang gebruik van een tourniquet en te lange opslag van bloed voor centrifugatie zorgt ook voor een verhoogde waarde. Zo is de zinkconcentratie in serum over het algemeen hoger dan in plasma, vermoedelijk omdat het serum langere tijd ongecentrifugeerd wordt bewaard om te stollen. Door het langere contact met de rode bloedcellen kan zink uit deze cellen lekken. Wanneer plasma even lang bewaard wordt vóór centrifugatie verdwijnt dit verschil. (13) Ook contaminatie uit de omgeving (bijvoorbeeld water, afnamebuizen, stof) tijdens de analyse kan de resultaten beïnvloeden. (40,41)

Anderzijds bevindt meer dan 99% van de totale hoeveelheid zink in het lichaam bevindt zich intracellulair. De zinkconcentraties in de weefsels zijn vele malen hoger dan deze in het serum/plasma en zijn onderworpen aan talrijke homeostasemechanisme die nog niet volledig begrepen worden. Deze mechanismen zorgen ervoor dat, zeker bij een milde tot matige zinkdeficiëntie, een systemische biomarker zoals de zinkconcentratie in serum, de zinkstatus mogelijk niet correct weerspiegelt. (13)

Meer accuratere, sensitievere biomarkers zijn nodig om de accuraatheid van de diagnoses te verbeteren. Meerdere potentiële en opkomende biomarkers, zoals zink in urine, haar en nagels, concentratie van zinkdependente proteïnen, DNA-integriteit, smaaktesten en de grootte van de 'exchangeable zinc pool', zijn reeds geïdentificeerd. (13,17,26) Er is echter meer onderzoek nodig vooraleer deze parameters kunnen ingezet worden om de zinkstatus te evalueren.

Interpretatie van bekomen waarden

De cutoff waarden voor zink in serum kan berekend worden aan de hand van populatiestudies en de sensitiviteit/specificiteit van de deze concentraties voor het ontwikkeling van deficiëntiesymptomen. Volgens (35) kan een cutoff van 50µg/dL klinische deficiëntiesymptomen bij Acrodermatitis Enteropathica detecteren met een sensitiviteit van 82% en een specificiteit van 92%. De onderste cutoff bekomen voor interpretatie van zinkconcentraties in een gezonde populatie zijn hoger, bijvoorbeeld 70µg/dL voor vrouwen en 74µg/dL voor mannen (ouder dan 10 jaar, nuchter 's morgens). (42) Deze hogere cutoffs kunnen nuttig zijn om beginnende deficiëntie aan te pakken vóór symptomen optreden. Verschillende guidelines gebruiken verschillende cutoffs, afhankelijk van hun populatie en middelen om deficiëntie aan te pakken. Cutoffs kunnen ook verschillen op basis van geslacht, leeftijd, afnametijdstip en voedingsstatus. (13)

Evaluatie van de zinkstatus van een populatie

Aangezien armoede en leven in ontwikkelingslanden, een risicofactor is voor zinkdeficiëntie, stelt het BOND-zink expert panel voor om de zinkstatus in populaties te schatten aan de hand van meerdere biomarkers. (13)

Eén van die merkers is zink in serum/plasma. Een lage gemiddelde zinkconcentratie in plasma/serum of een hoge prevalentie van individuen met een zinkconcentratie onder de cutoff, kan wijzen op een verhoogd risico op zinkdeficiëntie voor deze populatie. IZiNCG spreekt over een gevaar voor de volksgezondheid wanneer er bij meer dan 20% van de individuen een waarde bekomen wordt onder de cutoff. (18,43)

Het BOND-zink expert panel stelt naast de zinkconcentratie in plasma/serum, nog 2 andere biomarkers voor ter beoordeling van de zinkstatus: namelijk de zinkintake in het dieet, en prevalentie van stunting (groeiachterstand) bij kinderen <5 jaar.

De intake van zink kan geschat worden aan de hand van een food balance sheet die een overzicht geeft van de totale hoeveelheid zink beschikbaar in een regio, en door bij een representatieve steekproef het ingenomen voedsel gedurende 24 uur te registreren. Aan de hand van een fytinezuur-zink molaire ratio kan ook het absorbeerbaar zink geschat worden. De hoeveelheid stunting kan geschat worden aan de hand van deviatie van de lengte van kinderen ten opzichte van de referentiemediaan per leeftijd. Als cutoff voor verlaagde lengte-per-leeftijd wordt een z-score van <-2 gebruikt. Een prevalentie van meer dan 20% van zo'n verlaagde lengte-per-leeftijd bij kinderen <5 jaar, is indicatief voor een verhoogd risico op zinkdeficiëntie.

Evaluatie van de zinkstatus van een individuele patiënt

Bij een individuele patiënt moet de clinicus meerdere zaken in rekening brengen. De BOND-review raadt aan om eerst risicofactoren te identificeren die eventueel gepaard kunnen gaan met zinkdeficiëntie. Het gebruik van zinkconcentratie in plasma/serum kan hierbij nuttig zijn, maar de interpretatie moet steeds gebeuren samen met een beoordeling van de klinische (veelal specifieke) symptomen. (13)

Bij individuele resultaten moeten steeds rekening gehouden worden met factoren die het resultaat kunnen beïnvloeden, die hierboven reeds werden besproken. (16)

De richtlijn van BMJ Best Practice beveelt een combinatie aan van enerzijds een klinische evaluatie (risicofactoren en symptomen) en anderzijds de bepaling van de zinkconcentratie in serum. Ze gebruiken <60µg/dL of <70/dL als cutoff. Naast zink raden ze aan bij deficiëntiesymptomen ook andere nutriënten te testen, zoals ijzer, vitamine D, vitamine B12 en folaat. Voor de diagnose van Acrodermatitis Enteropathica kan eventueel genetische testing gebeuren. (21)

De 'Japan's practical guideline for zinc deficiency 2018' van de 'Japanese Society of Clinical Nutrition', gebruikt vier criteria voor de diagnose van zinkdeficiëntie. Het eerste criterium is de aanwezigheid van symptomen en 'tekenen' van zinkdeficiëntie, namelijk dermatitis, stomatitis, haarverlies, geen eetlust, smaakstoornissen, grotere infectievatbaarheid, anemie, hypogonadisme, groeiachterstand bij kinderen en verlaagd alkalisch fosfatase in serum (niet in het geval van leverziekte, osteoporose, chronische nierziekten of diabetes mellitus). Het tweede criterium is het uitsluiten van andere ziekten of toestanden die de bovenstaande symptomen kunnen verklaren. Het derde en belangrijkste criterium is de zinkconcentratie in het serum. Op basis van meerdere studies gebruikt deze studie een

cutoff van $<60 \mu\text{g/dL}$ voor zinkdeficiëntie en $>80 \mu\text{g/dL}$ wijst op een normale zinkstatus. Een waarde tussen 60 en $80 \mu\text{g/dL}$ noemen zij een 'marginal' zinkdeficiëntie.

Het vierde criterium voor de diagnose is de verbetering van de symptomen na zinksuppletie. (19)

Aangezien zink in serum een lage sensitiviteit heeft voor milde tot matige deficiëntie, raden beide richtlijnen aan om bij typische klinische symptomen steeds zinksuppletie op te starten, ook indien de gemeten concentratie in serum nog normaal was. (19,20)

Zinkconcentratie in het serum is dus een belangrijke factor in de beoordeling van zinkstatus bij populaties en individuele patiënten, maar moet steeds geïnterpreteerd worden in combinatie met andere factoren, zoals symptomen en intake. Nieuwe, meer accurate en gevoeligere biomarkers zouden voor een juistere diagnose kunnen zorgen, maar zijn momenteel nog niet beschikbaar.

3) MET WELKE METHODE WORDEN DE CONCENTRATIES VAN ZINK EN KOPER BEPAALD?

De meest voorkomende methoden waarmee koper en zink bepaald worden zijn: (Vlam) atomaire absorptiespectrometrie (AAS), Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-EOS), ICP-massaspectrometrie (ICP-MS) en colorimetrische methoden. (44) Elk van deze methoden wordt hieronder kort overlopen. De commerciële kits van Randox (Parramatta, Australië) voor colorimetrische bepaling van koper en zink, werden in het Jessa ziekenhuis op de Abbott Alinity-analysers (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) uitgetest en vergeleken met AAS. De resultaten van deze validatie en methodevergelijking worden hieronder ook weergegeven en besproken.

Beschikbare methoden

Atomaire absorptiespectrofotometrie

AAS is een analysetechniek gebaseerd op het principe dat atomen specifieke lichtgolven kunnen absorberen. Eerst worden de moleculen in het monster geatomiseerd; in dit geval wordt er geatomiseerd koper en zink bekomen. Het atomisatieproces gebeurt bij zeer hoge temperatuur ($2000\text{-}3000^\circ\text{C}$), in een vlam of een grafietoven. Een holle kathodelamp wordt gebruikt om exact die golflengte uit te zenden die de atomen zullen absorberen. De detector registreert de hoeveelheid geabsorbeerd licht en aan de hand van de wet van Lambert-Beer kan hieruit de concentratie berekend worden. Interferenties worden geminimaliseerd met verschillende technieken. Met behulp van een 'chopper' wordt het licht van de lamp regelmatig onderbroken om zo de variatie van licht van de vlam beter op te volgen. Bij dubbelstraaltoestel registreert men voortdurend een referentiebundel met enkel het licht van de lamp, om te kunnen corrigeren voor variatie in intensiteit van de lichtbron. De spectrale interferentie door verstrooiende deeltjes in de vlam wordt gecorrigeerd door het gebruik van Deuterium-achtergrondcorrectie. De Zeeman achtergrondcorrectie corrigeert voor achtergrondabsorptie. Interferenties door matrixeffecten en gasfaseinterferenties kunnen soms nog voorkomen. De sensitiviteit van AAS zou minder goed zijn dan die van de ICP-technieken, maar kan nog verhoogd worden door het gebruik van een grafietoven, in plaats van een vlam, wat zorgt voor langere verblijftijd in de lichtbundel en een lagere detectielimiet. (44-48)

ICP-EOS/MS

Inductief gekoppelde plasma's bereiken veel hogere temperaturen dan een vlam. Argongas wordt door een vonk van een hoogspanningsbobijn geïoniseerd en de elektronen worden versneld in een radiofrequent veld. Hierdoor wordt een betere en vollediger atomisatie bekomen met weinig interferenties. Bij ICP-EOS wordt de concentratie vervolgens bepaald met atomaire emissiespectrometrie, waarbij de hoeveelheid uitgezonden licht na excitatie van de atomen wordt gemeten. ICP-EOS heeft een hogere gevoeligheid dan Vlam-AAS, maar heeft een hogere detectielimiet dan Grafietoven-AAS. Er is vrij veel spectrale interferentie die moeilijk te corrigeren is. Veel ICP-EOS instrumenten zijn wel uitgerust met detectoren die meerdere golflengten kunnen meten en daardoor meerdere elementen tegelijk kunnen detecteren.

ICP-MS, waarbij massaspectrometrie gebruikt wordt voor de meting, is een zeer gevoelige methode met weinig spectrale interferentie. Matrixeffecten en aanwezigheid van opgeloste vaste stoffen kunnen wel nog voor problemen zorgen. Belangrijk is wel dat ICP-methoden erg duur zijn en veel expertise en goed opgeleid personeel vereisen. De zeer hoge sensitiviteit is ook meestal groter dan noodzakelijk voor de analyse van koper en zink. (44-47,49)

Van bovenstaande methoden is aangetoond dat zij een CV halen van minder dan 5%. Tussen de laboratoria onderling is er echter wel een grote variatie, met verschillen in kalibratie tot 18% tussen de afzonderlijke toestellen in verschillende laboratoria. Tuning en harmonisatie tussen de verschillende laboratoria met behulp van standaarden is essentieel voor consistente en accurate resultaten. (48,49)

Colorimetrie

Vanwege de hoge kost en het arbeidsintensieve karakter van de 'gouden standaard' methoden, is er ook onderzoek naar alternatieven. Randox (Parramatta, Australië) biedt colorimetrische testen aan die semi-automatisch kunnen uitgevoerd worden op een Corelabanalyser. De koperanalyse is gebaseerd op de vrijgave van koper gebonden aan ceruloplasmine door toevoegen van ascorbinezuur en vervolgens de vorming van een stabiel complex tussen koper en 4-(3,5-dibromo-2-pyridylazo)-N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)aniline (3,5-di-Br-PAESA). De zinkanalyse is gebaseerd op de vorming van een stabiel gekleurd complex met 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-propyl-N-sulphopropylamino)-phenol (5-Br-PAPS) in basisch milieu (pH = 9,8), na deproteïnisatie met een 370 mmol/L trichloorazijnzuur oplossing. (50,51)

In de literatuur werd deze en gelijkaardige kits al eerder uitgetest. In een artikel uit 2009 voerde men een methodevergelijking uit tussen AAS en de Randox kits op de Data Pro Analyser. 48 serumstalen werden met beide methodes gemeten en hun resultaten vergeleken. (50) Bij koper werd er een statistische significante negatieve systemische bias en positieve fixed bias waargenomen. Ook bij de zinkanalyse werden systematische en fixed bias's gezien, met bovendien veel onzekerheid omwille van een kleine concentratierange bij de gemeten stalen. Het artikel besluit dat de Randox kit voor de analyse van beide mineralen onvoldoende is, met een mogelijke verbetering bij het gebruik van serum-gebaseerde kalibratoren in plaats van waterige kalibratoren. (50)

Een tweede artikel uit 2023 onderzoekt dezelfde kit in vergelijking met vlam AAS en ICP-MS, maar gebruikte de serum-gebaseerde kalibratoren. Voor beide parameters werd aan de hand van analyse van controle materiaal en serumstalen, de juistheid, imprecisie en overeenkomst in resultaten en interpretatie van de resultaten onderzocht. Voor koper toonde de colorimetrische methode een goede overeenkomst. Bij zink was er een echter een te grote variatie op de resultaten voor klinisch gebruik, met ook geen goede overeenkomst in interpretatie van de zinkstatus. (51)

Ook andere artikels beschrijven een slechte overeenkomst in interpretatie van de zinkstatus bij vergelijking van AAS en colorimetrische methoden, en te grote afwijkingen van de targetwaarden bij het gebruik van colorimetrische methoden van zink. (52,53)

Uittesten Randox Kits

Voor het uittesten van de Randox kit in het Jessa ziekenhuis in Hasselt werden 2 levels van 2 verschillende controles (Randox en Seronorm (Billingstad, Noorwegen)) gedurende 5 dagen 5x keer uitgetest voor zowel zink als koper, om repeteerbaarheid, reproduceerbaarheid en juistheid te testen. Beide testen werden (zoals voorgeschreven in de bijsluiter) dagelijks gekalibreerd en alle stalen, controles en kalibratoren van zink werden steeds gedepteïniserd. Als kalibrator werd de waterige kalibrator gebruikt die in de kit aanwezig was. Daarnaast werden voor beide testen minstens 20 serumstalen geanalyseerd waarvan telkens ook een aliquot naar een extern labo werd verzonden, om daar bepaald te worden aan de hand van AAS.

De resultaten van de verificatie aan de hand van de controles zijn weergegeven in tabel 1 voor koper en tabel 2 voor zink. Er werd gebruik gemaakt van enerzijds Randoxcontroles en anderzijds Seronorm controles. Er werd vergeleken met de waarden in de bijsluiter van de Randox kit (na interpolatie). De toegelaten grenzen volgens de bijsluiters staan in kolom 'Limiet' en zijn groen gekleurd indien er aan voldaan wordt en oranje indien dit niet geval was. In de kolom 'EFLM' staat genoteerd aan welke biologische criteria volgens de EFLM database (zie tabel 3) voldaan werd.

Voor zowel koper als zink werd voor beide controles voldaan aan alle criteria voor repeteerbaarheid en reproduceerbaarheid.

Voor koper was de targetwaarde en het targetinterval bij de Randoxcontroles nogal onduidelijk. Voor eenzelfde controle waren in de bijsluiter verschillende targetwaarden beschikbaar, afhankelijk van de gebruikte methode en het gebruikte toestel. Voor de colorimetrische methode op de Alinity-analyser was dit 117 (93,5-141) µg/dL voor level 2. Op basis van dit cijfer werd er een bias bekomen van 24,56%, ver buiten de minimale biologische limiet voor de juistheid (5,7%) en bovendien viel het gemiddelde (145,7 µg/dL) buiten de range uit de bijsluiter. De algemene waarde voor de colorimetrische methode was echter 149 (119-179) µg/dL, waarbij de resultaten veel dichter zaten. Voor zink was deze discordantie er niet, maar waren de bekomen waarden ook niet binnen de vooraf opgestelde criteria.

Omwille van deze bezorgdheden werd beslist om aan de hand van Seronormcontroles die ook in andere publicaties gebruikt worden, duidelijkheid te scheppen over de bias. Bij koper werd er een gemiddelde waarde bekomen binnen de targetwaarden, zij het nog net buiten het minimaal biologisch criterium voor de bias. Voor zink was de bias slechts zeer nipt binnen de targetrange. Bij zink vielen de afzonderlijke resultaten ook vaak buiten de targetrange uit de bijsluiter, ook na het gebruik van een nieuwe controle of nieuwe kalibratie.

De resultaten van de methodevergelijking aan de hand van serumstalen zijn weergegeven in figuur 3 voor koper en figuur 4 voor zink.

Voor koper werd er een Pearsoncoëfficiënt groter dan 0,9 bekomen en waren bij de Passing-Bablok analyse het intercept en de richtingscoëfficiënt respectievelijk niet significant verschillend aan nul en één. Dit wijst op een goede correlatie van beide methodes zonder (in de steekproef aantoonbare) vaste of variabele bias. In de Bland-Altman grafiek werd er wel een significante negatieve bias gezien van gemiddeld -10,75 %.

Bij zink was de Pearsoncoëfficiënt kleiner dan 0,9. Dit is waarschijnlijk een gevolg van het zeer kleine interval van de zinkconcentraties. Ook bij de Passing-Bablok en de Bland-Altman analyses waren de 95%-intervallen zeer breed.

Voor koper wordt omwille van de goede reproduceerbaarheid en de aanvaardbare bias, overwogen deze test te implementeren, maar steeds samen met ceruloplasmine uit te voeren. Er was een negatieve bias bij de methodevergelijking, maar bij vergelijking van de interpretatie (tabel 4) werden geen ernstige discordanties waargenomen. Koper moet bovendien altijd met voorzichtigheid en in combinatie met andere parameters zoals ceruloplasmine en CRP geïnterpreteerd worden. Vóór deze test in routine opgestart wordt, kan eventueel de serumgebaseerde kalibrator nog uitgetest worden om de bias ten opzichte van AAS en de seronormcontroles verder te minimaliseren.

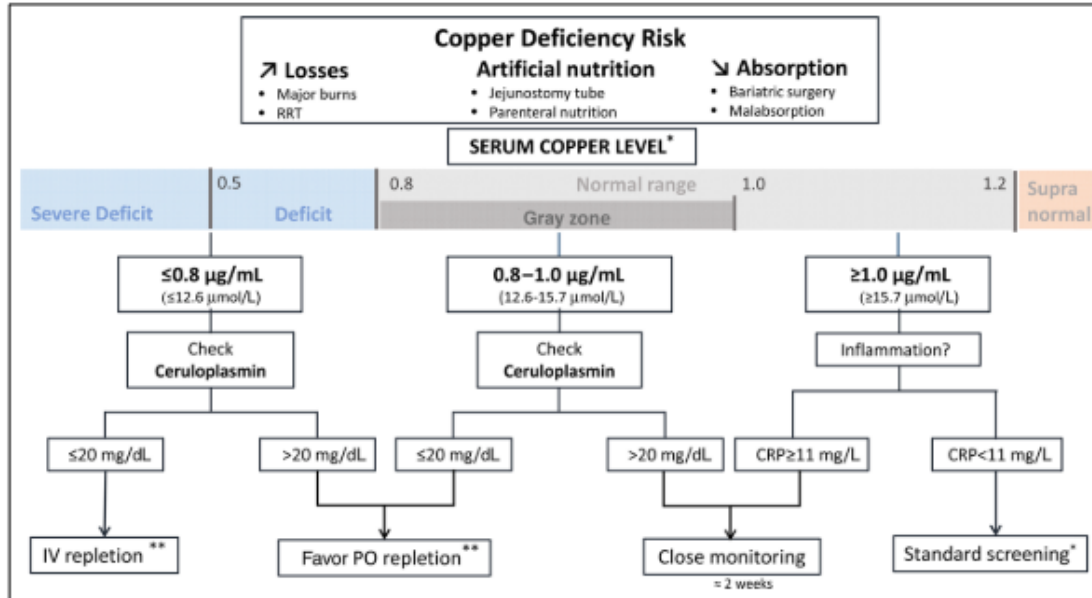
Voor zink werd, omwille van afwijkende resultaten voor de juistheid en de inconclusieve resultaten van de methodevergelijking, beslist om de test voorlopig niet uit te voeren in het Jessa Ziekenhuis. Naast de suboptimale resultaten, bleek deze test ook minder makkelijk in gebruik. De deproteïnisiestap moet manueel gebeuren voor elk staal, controle of kalibrator. Deze extra manuele stap vertraagt de routine en stelt het proces bloot aan eventuele extra fouten. Zink is bovendien erg gevoelig aan omgevingscontaminatie, waarbij er steeds met apart materiaal moet gewerkt worden.

Tijdens deze experimenten werd steeds gewerkt met wegwerpmateriaal onder de vorm van eppendorfcupjes, Alinity cupjes en pipetpunten. Deze werden niet gewassen in verdund HCl of HNO₃, zoals wel staat aangegeven in de bijsluiters. Deze beslissing werd genomen omwille van een vorig in-house experiment waarbij de resultaten niet beter waren na het wassen met zuur, mogelijks omdat neerdwarrelend stof tijdens het drogen voor extra contaminatie zorgt. Ze werden wel zoveel mogelijk van stof afgeschermd. Bovendien werden steeds blancs met water ingezet die geen klinisch significant afwijking toonden. Andere mogelijke bronnen van contaminatie zijn het water dat de Alinity gebruikt tijdens de kalibratie en de afnamebuizen waarin het serum werd verzameld en bewaard. Blancos met verschillende soorten water toonden ook geen klinisch significante verschillen. Het effect van de verschillende afnamebuizen werd tijdens deze experimenten niet onderzocht, maar eerder in-house experimenten met serum van vrijwilligers toonde acceptabele verschillen tussen de standaard serumbuizen en trace element tubes van de huidige fabrikant. Gezien de datering van deze experimenten is een update van deze testen wel wenselijk.

To DO/ACTIONS

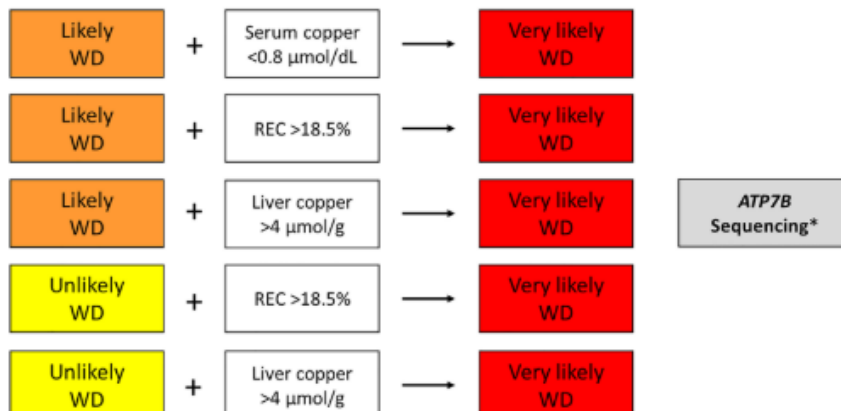
- 1) Validatie van ceruloplasmine op de Alinity-analysers.
- 2) Beoordeling van serum-gebaseerde kalibratoren voor de bepaling van koper.
- 3) Vergelijking van de gebruikte standaard serumbuizen met 'trace element' afnametubes.

FIGUREN EN TABELLEN



Figuur 1: Algoritme uit (2) voor diagnose en behandeling van koperdeficiëntie. Acute fase respons gereflecteerd door CRP moet samen met koper nagekeken worden. Laag ceruloplasmine (<math>< 20 \text{ mg/dL}</math>) heeft een bevestigende waarde. De nood voor orale of IV repletie van koper wordt beoordeeld op basis van de koperconcentratie en de aanwezigheid/afwezigheid van klinische symptomen. Een waarde in de grijze zone vereist extra aandacht bij interpretatie. (CRP= C-reactive protein; IV= intravenous; PO= oral; RRT= renal replacement therapy)

		Ceruloplasmin		
		<math>< 0.1 \text{ g/L}</math>	$0.1 - 0.2 \text{ g/L}$	> 0.2 g/L
24-h Urinary Copper	>1.6 $\mu\text{mol}/24\text{-h}$	Very likely WD	Likely WD	Unlikely WD
	0.64 – 1.6 $\mu\text{mol}/24\text{-h}$	Likely WD	Unlikely WD	Very unlikely WD
	<math>< 0.64 \mu\text{mol}/24\text{-h}</math>	Unlikely WD	Very unlikely WD	Very unlikely WD



Figuur 2: Algoritme voor de biochemische diagnose van Wilson's disease (WD) uit (6). Een totale koperconcentratie van <math>< 0.8 \mu\text{mol/dL}</math> (ongeveer 50 $\mu\text{g/dL}$) bij een intermediaire ceruloplasmineconcentratie (10-20 mg/dL) verhoogt de verdenking naar 'very likely WD', omwille van de hoge positief predictieve waarde. Een 'relative exchangeable copper'(REC) van > 18.5% of een intrahepatisch koper van > 4 $\mu\text{mol/L}$ in de afwezigheid van cholestase is ook indicatief voor 'very likely WD'. *Genetische testen zijn sterk aangeraden bij patiënten met laboratoriumresultaten suggestief voor 'very likely WD' of patiënten met 'likely WD' waarbij geen leverbiopsie kon gebeuren.

Koper (µg/dL)	Repeteerbaarheid (within run)				Reproduceerbaarheid (within lab)						Juistheid											
	Level 1		Level 2		Level 1			Level 2			Level 1				Level 2							
	CV%	limiet	CV%	limiet	CV%	limiet	EFLM	CV%	limiet	EFLM	mean	target	lower limit	upper limit	bias (abs) %	EFLM	mean	target	lower limit	upper limit	bias (abs) %	EFLM
Radox	2,29	2,87	1,61	2,80	2,11	5,52	DES	1,91	5,40	DES	97,6	104	85,6	122,4	6,13	X	145,7	117	96,3	137,7	24,56	X
Seronorm	2,4	2,84	1,43	2,32	2,3	5,48	DES	1,41	4,59	OPT	95,16	109,6	90,43	128,77	13,18	X	182,95	199,8	164,82	234,78	8,43	X

Tabel 1: Repeerbaarheid, reproduceerbaarheid en juistheid van de koperanalyse met Radox kits op Abbott Alinity. Berekend aan de hand van 5x5 analyses van Radox en Seronorm iQCs. Limieten gebaseerd op de bijsluiters van de Radox kit, de bijsluiters van de controles en de biologische criteria uit de EFLM-database. Wanneer er aan een limiet voldaan wordt is deze in het groen aangegeven, indien niet in het oranje. Indien aan de biologische criteria wordt voldaan is dit

Zink (µg/dL)	Repeteerbaarheid (within run)				Reproduceerbaarheid (within lab)						Juistheid											
	Level 1		Level 2		Level 1			Level 2			Level 1				Level 2							
	CV%	limiet	CV%	limiet	CV%	limiet	EFLM	CV%	limiet	EFLM	mean	target	lower limit	upper limit	bias (abs) %	EFLM	mean	target	lower limit	upper limit	bias (abs) %	EFLM
Radox	0,44	1,79	0,92	1,66	2,79	5,60	DES	2,81	5,38	DES	180,1	222	183,5	260,5	18,86	X	217,5	242	199,1	284,9	10,12	X
Seronorm	0,49	2,34	1,7	1,99	4,02	6,42	DES	4,26	5,87	DES	121,23	145	119,04	170,96	16,39	X	167,6	196	161,21	230,79	14,49	X

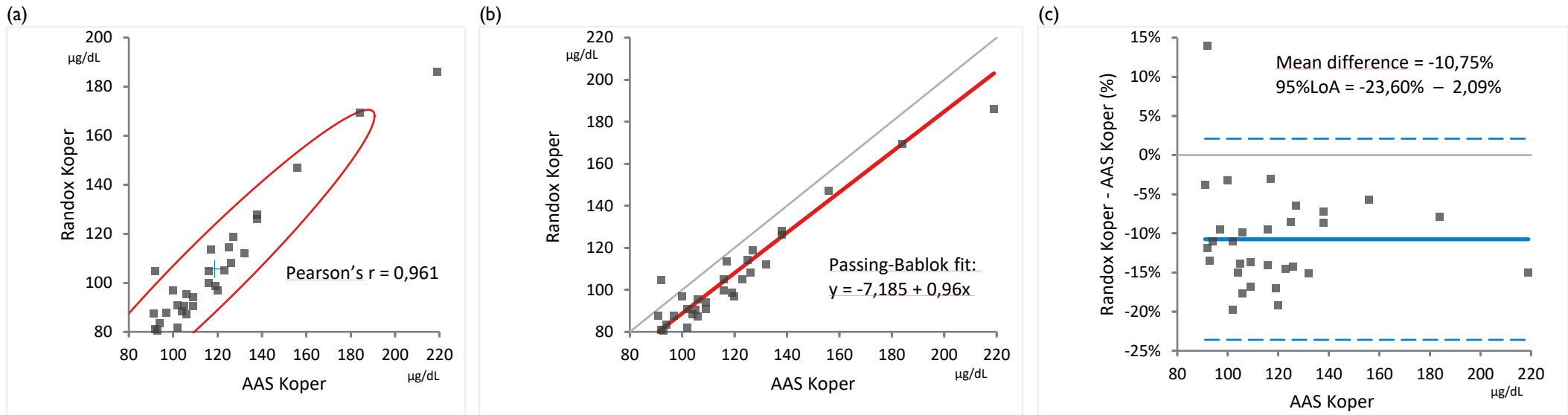
Tabel 2: Repeerbaarheid, reproduceerbaarheid en juistheid van de zinkanalyse met Radox kits op Abbott Alinity. Berekend aan de hand van 5x5 analyses van Radox en Seronorm iQCs. Limieten gebaseerd op de bijsluiters van de Radox kit, de bijsluiters van de controles en de biologische criteria uit de EFLM-database. Wanneer er aan een limiet voldaan wordt is deze in het groen aangegeven, indien niet in het oranje. Indien aan de biologische criteria wordt voldaan is dit aangegeven met OPT (optimum), DES (desirable) of MIN (minimum) indien er aan het optimum, desirable of minimum criterium werd voldaan, indien niet staat er een 'X'.

Koper	Imprecisie (CV%)	Bias (%)	Totale fout (%)	Zink	Imprecisie (CV%)	Bias (%)	Totale fout (%)
Minimum	5,6	5,7	15	Minimum	6,4	4,6	15,1
Desirable	3,8	3,8	10	Desirable	4,3	3,1	10,1
Optimal	1,9	1,9	5	Optimal	2,1	1,5	5

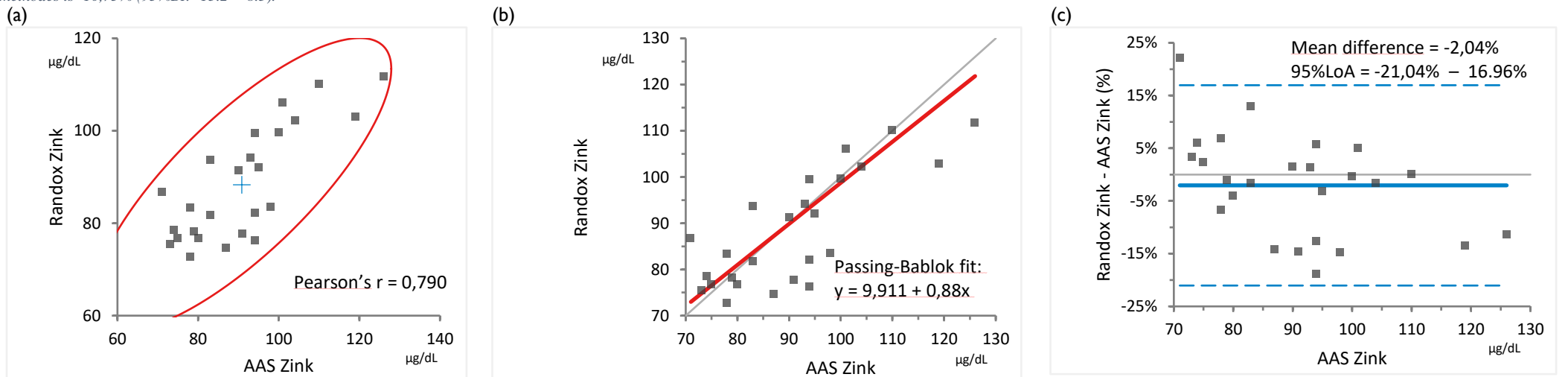
Tabel 3: Biologische criteria voor imprecisie, bias en totale fout op basis van de biologische variatie van koper en zink (uit EFLM database).

Interpretatie koperstatus	AAS		
	Koperdeficiënt	Normaal	Koperexcess
Radox Koperdeficiënt	0	1	0
Radox Normaal	0	26	1
Radox Koperexcess	0	0	2

Tabel 4: Vergelijking van interpretatie van de koperstatus van serumstalen op basis van de waarden verkregen met beide methoden. Voor de AAS resultaten werden de referentieintervallen van het externe labo gebruikt. Voor de Radox resultaten werden de referentieintervallen uit de bijsluiters gebruikt (man: 70-150 µg/dL, vrouw: 80-155 µg/dL).



Figuur 3: Methodevergelijking koper met serumstalen (N=30). (a) Scatterplot met Pearson's r correlatie. (b) Scatterplot met Passing-Bablok fit (rode lijn). Het intercept is -7,185 (95%-betrouwbaarheidsinterval (BI): -21.73-5.686). De richtingscoëfficiënt is 0,96 (95%BI: 0,836-1,063). (c) Bland-Altman plot met gemiddeld verschil (mean difference) (blauwe lijn) en de 95% Limits of Agreement (LoA) (blauwe stippellijn). Het gemiddelde relatieve verschil tussen de beide methodes is -10,75% (95%BI: -13.2 - -8.3).



Figuur 4: Methodevergelijking zink met serumstalen (N=25). (a) Scatterplot met Pearson's r correlatie. (b) Scatterplot met Passing-Bablok fit (rode lijn). Het intercept is 9,911 (95%BI): -14.70-28.34). De richtingscoëfficiënt is 0,88 (95%BI: 0,66-1,14). (c) Bland-Altman plot met gemiddeld verschil (mean difference) (blauwe lijn) en de 95% Limits of Agreement (LoA) (blauwe stippellijn). Het gemiddelde relatieve verschil tussen de beide methodes is -2,04% (95%BI: -6.05 - 1.96).