

## Preanalytické interference a praktické využití sérových indexů

Beňovská M.<sup>1,2</sup>, Dastych M.<sup>1,2</sup>, Čermáková Z.<sup>1,2</sup>, Tůmová J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddělení klinické biochemie a hematologie, Fakultní nemocnice Brno

<sup>2</sup>Katedra laboratorních metod LF MU, Brno

### SOUHRN

Interference způsobené hemolýzou, chylozitou a ikterickým zbarvením vzorku představují dlouhodobý problém, který ovlivňuje kvalitu výsledků vydávaných v klinické biochemii. V laboratoři s preanalytickou automatizací bylo nezbytné nahradit vizuální popisy vzorků měřením sérových indexů (SI). V této práci jsou uvedeny komentáře popisující interference vzorku generované na základě naměřených SI a hodnoty sérových indexů pro jednotlivé metody, které po překročení vedou k nevydání výsledku tak, jak se používají na Oddělení biochemie a hematologie ve Fakultní nemocnici Brno. Vliv interferencí je také demonstrován na vzorcích pacientů.

*Klíčová slova:* interference, sérové indexy, hemolýza, chylozita, ikterus.

### SUMMARY

**Beňovská M., Dastych M., Čermáková Z., Tůmová J.: Preanalytical interference and practical use of serum indexes**

Interference caused by hemolysis, turbidity of lipemia and bilirubinemia of the sample represents a long-term problem that affects the quality of results given in clinical biochemistry. It was necessary to replace visual qualification of specimens with serum index (SI) measurement in the laboratory with preanalytical automation. This work contains comments describing sample interference generated based on measured SI and the values of serum indexes for individual methods that, when exceeded, lead to results that are no longer released, as used in the Department of Biochemistry and Hematology at the Brno University hospital (FN Brno). The influence of interference is also demonstrated on patient samples.

*Key words:* interference, serum indexes, hemolysis, turbidity, bilirubinemia.

## Úvod

Interference způsobené hemolýzou, chylozitou a ikterickým zbarvením vzorku představují dlouhodobý problém, který ovlivňuje kvalitu výsledků vydávaných v klinické biochemii.

Z kvantitativního i kvalitativního hlediska se ze jmenovaných interferencí nejvíce uplatňuje hemolýza. Podle literárních údajů tvoří hemolytické vzorky více než 3 % všech rutinních vzorků – tato hodnota je 4–5krát četnější než ostatní příčiny zabraňující změření správného výsledku (např. dodatečné vysrážení vzorku). Hemolýza je definována jako uvolnění hemoglobinu a dalších intracelulárních látek z erytrocytů po poškození buněčné membrány do plazmy. Může se vyskytovat jak *in vivo*, tak *in vitro*.

## Hemolýza

### Mechanismy působení *in vitro* hemolýzy:

1. Uvolnění hemoglobinu a dalších intracelulárních látek do séra či plazmy, které vede ke zvýšené koncentraci analytů (ALT, AST, LD, Mg, P, K) či k tzv. zředřovacímu efektu – snížení koncentrace (glukóza, bilirubin, ALP, Na, Cl).
2. Chemická interference volného hemoglobinu nebo strukturálních proteinů, enzymů, lipidů a jiných látek obsažených v erytrocytech při analytické reakci (např. ovlivnění koncentrace CK způsobené reakcí intracelulární adenylátkinázy).

3. Spektrofotometrická interference způsobující zvýšení naměřené absorbance nebo změnu hodnoty blanku, zejména při vlnových délkách, kdy hemoglobin silně absorbuje.

Uvedené vlivy se navzájem kombinují, např. u bilirubinu, Fe, lipázy a GGT. Při stanovení v alkalickém prostředí může dále docházet k denaturaci hemoglobinu, jako např. u stanovení ALP. Jednotlivé mechanismy se mohou kombinovat, a způsobovat tak nepřehlednou, složitou a těžko definovatelnou situaci. Navzdory přibližně lineární závislosti na koncentraci volného hemoglobinu byly pozorovány heterogenní a pro jednotlivé vzorky specifické vlivy [1, 2].

U sledovaných vzorků byla patrná závislost chyby způsobené interferencí na koncentraci analytů. V oblasti výrazně patologických hodnot docházelo k podstatně menšímu ovlivnění [3].

Hemolytické interference popisované u imunoanalytických metod jsou podstatně méně četné, ale také významné [1]. Příkladem je hemolýzou ovlivněné snížení koncentrace troponinu T nebo zvýšení koncentrace folátu.

V současné době neexistuje obecně platné doporučení, jak se vzorky ovlivněnými hemolýzou, popř. chylozitou či ikterickým zbarvením nakládat. Světová zdravotnická organizace (WHO) pouze doporučuje nevydávat výsledek získaný měřením „neadekvátního“ vzorku.

### Situace ve FN Brno

Na oddělení klinické biochemie a hematologie (OKBH) ve FN Brno se dlouhodobě připojuje k nálezům do laboratorního informačního systému komentář, je-li

přítomna hemolýza, chylozita nebo ikterus, případně se vybrané analyty (např. LD, K, BilD...) od určitého stupně interference vůbec neanalyzují. K tvorbě komentáře bylo dříve využíváno subjektivní vizuální posouzení vzhledu séra či plazmy po centrifugaci.

S nástupem preanalytické automatizace, kdy před vložením do preanalytického systému vidíme pouze plnou krev, se stalo nezbytným nahradit vizuální popisy vzorků měřením sérových indexů (SI).

Sérové indexy se získávají výpočtem z absorbance změřené po naředění vzorku fyziologickým roztokem při několika vlnových délkách na automatickém analyzátoru. Měření sérových indexů objektivizuje posouzení interference a usnadní práci personálu. Ideální je zjištění možné interference již v automatické preanalytické fázi. Pokud je ovšem prováděno až v analytickém systému, jak je tomu v naší laboratoři, vede současně ke zbytečné analýze parametrů, u kterých se výsledek později nevydá a jejichž stanovení bylo dříve v naší laboratoři zabráněno.

Počet vzorků, u kterých se vyskytuje hemolýza, chylozita či ikterické zbarvení, je na OKBH FN Brno poměrně významný. Hemolytické vzorky představují průměrně 10 %, z toho 7,5 % tvoří slabá hemolýza a < 1 % hemolýza silná. U statimových vzorků, které analyzujeme jako plazmu s heparinátem litným, je výskyt hemolýzy 2krát větší než u rutinních vzorků v séru. Lipemické vzorky v naší laboratoři odpovídají 2 %, z toho mléčně zkalené vzorky, které mají významnější vliv, tvoří < 0,1%. Ikterické zbarvení se v podstatném stupni vyskytuje pouze výjimečně.

Při automatickém generování komentářů na základě změřených sérových indexů se řídíme tabulkou, kterou jsme vytvořili nasbíráním vzorků zahrnujících celou škálu interferencí (20 vzorků pro každou kategorii) a jejich porovnáním s naměřenými sérovými indexy. Vznikly tak

intervaly SI odpovídající jednotlivým popisům vzorků. Přiřazení komentáře zajišťuje informační systém Infolab. Hemolýzu uvádíme od koncentrace hemoglobinu 20  $\mu\text{mol/l}$  (souhlasí s literárními údaji 18,8  $\mu\text{mol/l}$  [2]), chylozitu od lipemického indexu 35 a ikterus od 340  $\mu\text{mol}$  bilirubinu/l. Vzhledem ke složitosti kombinací tří vlivů využíváme pouze dvourozměrnou tabulku se dvěma kategoriemi pro ikterické zbarvení – tabulka 1.

Na základě praktických zkušeností víme, že u silně hemolytických vzorků, kdy je přítomen široký absorpční pík hemoglobinu, může dojít k falešnému zvýšení dalších sérových indexů, zejména indexu lipemického. Abychom popsany potenciální vliv potlačili, využíváme v tabulce v těchto případech jednoduchý komentář „silná hemolýza“.

Komentování vzhledu vzorků považujeme za nezbytnou, ale ne dostatečnou podmínku uplatňující se při vydávání výsledků ovlivněných interferencí. Dalším kritériem je rozhodnutí, od jakého sérového indexu výsledek vydat či nevydat. Dodavatelé reagentů běžně vliv interferencí u diagnostických souprav více či méně přesně popisují. Firma Roche, jejíž reagentie používáme, vydává poměrně detailní informace, od jaké výše sérového indexu je výsledek jednotlivých stanovení ovlivněn o více než 10 %. Zbývá však otázka, jak významně ovlivnění vzrůstá s dalším vzestupem SI a jak se uplatňuje u patologicky zvýšených parametrů ve srovnání s parametry v referenčním rozmezí. Při specifikaci limitů, kdy použít výsledek ovlivněný interferencí a kdy již žádnou hodnotu nevydat, je třeba blíže posoudit kvantitativní vliv interferencí na koncentraci jednotlivých analytů.

Laboratoř musí tedy učinit rozhodnutí – vydá nesprávný výsledek, nebo neposkytne lékaři žádnou informaci? Příkladem rozporuplné volby může být stanovení ALT, AST u pacienta přijatého na infekční oddělení.

**Table 1.** Ranges of measured serum indexes and comments generated for samples affected by interference

Samples with SII $\leq$ 340				
Interference	SIH $\leq$ 20	20 < SIH $\leq$ 50	50 < SIH $\leq$ 150	150 < SIH
SIL $\leq$ 35	-	light hemolysis	hemolysis	heavy hemolysis
35 < SIL $\leq$ 70	light lipemia	light hemolysis	hemolysis	heavy hemolysis
70 < SIL $\leq$ 200	lipemia	lipemia +hemolysis	lipemia +hemolysis	heavy hemolysis
200 < SIL	heavy lipemia	heavy lipemia	heavy lipemia + hemolysis	heavy lipemia + hemolysis
Samples with 340 < SII $\leq$ 1100				
Interference	SIH $\leq$ 20	20 < SIH $\leq$ 50	50 < SIH $\leq$ 150	150 < SIH
SIL $\leq$ 35	icterus	icterus	icterus + hemolysis	heavy hemolysis
35 < SIL $\leq$ 70	icterus	icterus	icterus+hemolysis	heavy hemolysis
70 < SIL $\leq$ 200	lipemia	lipemia+icterus	icterus+hemolysis	heavy hemolysis
200 < SIL	heavy lipemia	heavy lipemia	heav. lip.+hemol.	heav. lip.+hemol.
Samples with SII > 1100				
Interference	SIH $\leq$ 20	20 < SIH $\leq$ 50	50 < SIH $\leq$ 150	150 < SIH
SIL $\leq$ 35	heavy icterus	heavy icterus	icterus+hemolysis	icterus+hemolysis
35 < SIL $\leq$ 70	heavy icterus	heavy icterus	icterus+hemolysis	icterus+hemolysis
70 < SIL $\leq$ 200	lipemia+icterus	lipemia+icterus	icterus+hemolysis	icterus+hemolysis
200 < SIL	heavy lipemia + icterus	heavy lipemia + icterus	heavy lipemia + hemolysis	heavy lipemia + hemolysis

SIH – serum hemolytic index ( $\mu\text{mol}$  of Hemoglobin/l); SIL – serum lipaemic index (Turbidity); SII – serum icteric index ( $\mu\text{mol}$  of Bilirubin/l);  
 SIH – serum hemolytic index ( $\mu\text{mol}$  of Hemoglobin/l); SIL – serum lipaemic index (Turbidity); SII – serum icteric index ( $\mu\text{mol}$  of Bilirubin/l)

Jedná se o vzorek silně hemolytický. Opakovaný odběr potvrzuje, že AST bylo ovlivněno o 300 %, ALT přibližně o 100 % – přesto byly obě hodnoty do 1  $\mu\text{kat/l}$  a pro kliniky mělo v té chvíli značný význam, že se nejednalo o výsledek výrazně patologický. Protiargumentem k významu klinickému je porušená nejistota měření, kterou naše oddělení uvádí a garantuje.

V literatuře se objevují práce kvantifikující vliv hemolýzy na vzorcích s přidavkem lyzovaných erytrocytů získaných při  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  či vliv ikteru na vzorcích s přidavkem

standardu bilirubinu [2, 3]. Rovněž byly publikovány práce navrhuující po změření SI možnost odstranění důsledků hemolýzy pomocí korekčních faktorů závislých na koncentraci hemoglobinu [4], což však podle našeho názoru může být nepřesné a zavádějící.

Při tvorbě pravidel, které výsledky ovlivněné interferencí na OKBH FN Brno vydat a které již nevydat, jsme vycházeli z údajů výrobce reagentů, experimentálních výsledků získaných na vzorcích pacientů (tab. 2) a našich dlouhodobých praktických zkušeností.

**Table 2.** Relative errors caused by interference\*

Hemolysis impact	Patient No.	SIH = 183	SIH = 2	Relative error [%]	Patient No.	SIH = 409	SIH = 7	Relative error [%]
LDH [ $\mu\text{kat/l}$ ]	1	9.28	3,65	154	5	16.24	2.45	563
AST [ $\mu\text{kat/l}$ ]		1.28	0,66	94		1.67	0.31	439
CK [ $\mu\text{kat/l}$ ]		2.82	2,71	4		2.25	1.27	77
P [mmol/l]		1.86	1,34	39		1.44	0.83	73
K [mmol/l]		5.2	4,7	11		6.3	3.3	91
Fe [ $\mu\text{mol/l}$ ]		29.7	29,2	2		28.5	8.4	239
		SIH=215	SIH=5	Relative error [%]		SIH = 436	SIH = 7	Relative error [%]
LDH [ $\mu\text{kat/l}$ ]	2	12.12	3.62	235	6	15.41	3.10	397
AST [ $\mu\text{kat/l}$ ]		2.60	1.70	53		1.97	0.39	405
CK [ $\mu\text{kat/l}$ ]		2.43	1.94	25		3.21	1.27	153
P [mmol/l]		1.13	1.08	5		0.79	0.59	34
K [mmol/l]		5.8	4.6	26		8.1	4.3	88
Fe [ $\mu\text{mol/l}$ ]		29.5	30.0	-2		9.4	5.1	84
		SIH = 221	SIH = 2	Relative error [%]		SIH = 758	SIH = 18	Relative error [%]
LDH [ $\mu\text{kat/l}$ ]	3	10.64	2.93	263	7	34.53	4.12	738
AST [ $\mu\text{kat/l}$ ]		1.48	0.99	49		3.69	0.77	379
CK [ $\mu\text{kat/l}$ ]		1.14	0.14	714		3.48	1.10	216
P [mmol/l]		0.81	0.68	19		1.54	0.96	60
K [mmol/l]		6.0	4.7	28		11.2	5.0	124
Fe [ $\mu\text{mol/l}$ ]		6.2	3.6	72		36.4	25.8	41
		SIH = 269	SIH = 2	Relative error [%]		SIH = 999	SIH = 9	Relative error [%]
LDH [ $\mu\text{kat/l}$ ]	4	12.71	2.70	371	8	40.55	7.12	470
AST [ $\mu\text{kat/l}$ ]		1.55	0.37	319		3.17	1.99	59
CK [ $\mu\text{kat/l}$ ]		1.58	0.52	204		20.27	21.53	-6
P [mmol/l]		1.55	1.26	23		1.89	1.66	14
K [mmol/l]		6.5	4.1	59		12.7	5.0	154
Fe [ $\mu\text{mol/l}$ ]						27.6	19.0	45
Lipemia impact	Patient No.	SIL = 143	SIL = 48	Relative error [%]	Patient No.	SIL = 512	SIL = 33	Relative error [%]
Glu [mmol/l]	9	6.9	6.8	1	12			
LDL [mmol/l]		1.6	1.5	7		1	1.7	-41
BilD [ $\mu\text{mol/l}$ ]		2	1.6	25		40.6	38	7
Palb [g/l]		0.29	0.21	38		0.31	0.25	24
		SIL=236	SIL=79	Relative error [%]		SIL = 625	SIL = 51	Relative error [%]
Glu [mmol/l]	10	13	13.3	-2	13	10.1	13.4	-25
LDL [mmol/l]		1.3	1.3	0		2.2	2.4	-8
BilD [ $\mu\text{mol/l}$ ]		3	2	50				
Palb [g/l]		0.32	0.29	10				

Table 2., continuation

		SIL=396	SIL=8	Relative error [%]		SIL=1118	SIL=79	Relative error [%]
Glu [mmol/l]	11	8.3	6.4	30	14	16.3	16.34	0
LDL [mmol/l]		0.7	0.9	-22		0.8	0.6	33
BiID [ $\mu$ mol/l]								
Palb [g/l]		0.23	0.14	64				
Icterus impact	Patient No.	SII = 423	SII = 212	Relative error [%]	Patient No.	SII = 360	SII = 307	Relative error [%]
Krea [ $\mu$ mol/l]	15	69	75	-8	18	90	83	8
Chol [mmol/l]		1.3	1.3	0		4.4	4.3	2
		SII = 435	SII = 344	Relative error [%]		SII = 373	SII = 317	Relative error [%]
Krea [ $\mu$ mol/l]	16	118	104	13	19	55	67	-18
Chol [mmol/l]		10.5	10.8	-3		2.5	2.5	0
		SII = 816	SII = 50	Relative error [%]		SII = 399	SII = 345	Relative error [%]
Krea [ $\mu$ mol/l]	17	162	165	-2	20	112	92	22
Chol [mmol/l]		8.5	8.6	-1		19.8	19.8	0
Glu [mmol/l]		5	4.9	2				
CRP [mg/l]		31.3	31.13	1				
Mg [mmol/l]		1.26	1.41	-11				

\*Analytes, which are significantly affected for the measured index according to the reagent producer, are monitored for individual interferences. We compared patient samples with a serum index above the value for which results are no longer released at FN Brno with samples from the same patient with a low serum index drawn on the same or the following day.

**Table 3.** Values of serum indexes above which the results are automatically replaced by the appropriate text

SI hemolytic	Analyte	Text replacement of result
> 50	Ammonia, D-Bil	hemolysis
> 100	Troponin T, LDH	hemolysis
> 150	Fe, AST, K	hemolysis
> 200	P, CK	hemolysis
> 500	CB, Lipase, Mg, Myoglobin, Prealbumin, TG	hemolysis
> 700	Albumin, AMS, p-AMS, Apo B, $\alpha$ 1-AT, BiIT, Ca, Digoxin, Ethanol, Glu, HDL, Chol, CHE, IgA, IgG, IgM, KM, Lactate, LDL, Lp (a), Ferritin, Urea	hemolysis
> 1000	$\alpha$ 1- Acid Glycoprotein, ALP, ALT, CRP, C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , Crea, Glu, GGT, Procalcitonin, Transferrin, Theophylline, Vitamin B <sub>12</sub> , fT <sub>4</sub> , tT <sub>3</sub> , TSH	hemolysis
SI lipaemic	Analyte	Text replacement of result
> 200	D-Bil, Glu, LDL, Prealbumin	lipemia
> 600	ALT, AST, Ethanol, IgA, IgG, IgM, Mg, Myoglobin, Theophylline, Transferrin	lipemia
> 1000	Albumin, ApoB, $\alpha$ 1- Acid Glycoprotein, $\alpha$ 1-AT, BiIT, C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , Ca, CB, CHE, Chol, CK, Crea, Fe, Ferritin, GGT, HDL, Haptoglobin, Lactate, LDH, Lipase, P, KM, Urea	lipemia
> 2000	ALP, AMS, p-AMS, CRP	lipemia
SI icteric	Analyte	Text replacement of result
> 680	Chol, Crea, GGT, Glu, Mg, TG, CB, KM, Mg, Procalcitonin, Folate, Ferritin, fT <sub>4</sub> , tT <sub>3</sub> , TSH, Troponin T	icterus
> 1100	Albumin, ALP, ALT, AST, Ammonia, AMS, p-AMS, ApoB, $\alpha$ 1- Acid Glycoprotein, $\alpha$ 1-AT, C <sub>3</sub> , C <sub>4</sub> , Ca, CHE, CK, CRP, Ethanol, Fe, HDL, Haptoglobin, IgA, IgG, IgM, Lactate, LDH, LDL, Lipase, Lp(a), Myoglobin, Prealbumin, P, Theophylline, Transferrin, Urea, Vitamin B <sub>12</sub> , Digoxin	icterus

Z naměřených dat vyplývá, že interference způsobená chylozitou a ikterickým zbarvením je ve srovnání s hemolýzou mnohem méně významná a její důsledek není zcela jednoznačný. Na tom se podílí fakt, že tito pacienti bývají v těžkém stavu a obratem nelze získat odběr bez interference a také to, že u těchto pacientů lze očekávat kolísání měřených parametrů, případně ovlivnění způsobené křížením různých interferencí (v takovém případě nejsou výsledky uvedeny).

V současné době pracujeme s tabulkou 3. Překročili sérový index uvedenou hodnotu pro určitou metodu, uplatní se pravidlo nastavené v programu PSM (software firmy Roche) a výsledek je nahrazen komentářem hemolýza, chylozita či ikterus. Nevydaný výsledek může klinické oddělení získat na základě telefonického dotazu či může být uvolněn v individuálním případě lékařem našeho oddělení při výstupní kontrole.

Při tvorbě pravidel jsme se věnovali různým materiálům, se kterými pracujeme. Nestačí měřit indexy v séru, ale je potřeba také nastavit podmínky pro odběry plazmy (např. pro laktát nebo amoniak). U vybraných metod jsme nastavili speciální formule pro situace, kdy je interferencí ovlivněna metoda s výrazně patologickým výsledkem a vzorek je automaticky ředěn. V některých případech pro naředěné vzorky vydáváme výsledky s vyšším SI než pro vzorky neředěné. Vede nás k tomu zejména prokazatelně nižší vliv interference u patologických hodnot (viz tab. 3). Při tvorbě těchto podmínek jsme k jednotlivým metodám přistupovali individuálně (např. pro LDH je neuplatňujeme) a zohlednili jsme také mechanismus, jak se interference u daného testu uplatňuje, zda se jedná o analyt vyplavený z erytrocytu či případ, kdy hemoglobin reaguje s činidlem.

## Závěr

V případě, že laboratoř využívá preanalytickou automatizaci, je měření sérových indexů nezbytné. Nastavená pravidla, která vycházejí z naměřených interferencí a vedou ke komentování popisu vzorků či náhradě výsledků textem, jsou do jisté míry individuální a závisí na používaných analytických metodách. Při problému řešení *in vitro* interferencí je důležité, stejně jako v jiných odvětvích medicíny, zaměřit se na prevenci a snahu omezit je na minimum.

## Literatura

1. **Lippi, G., Salvagno, G. L., Montagnana, M., Brocco, G., Guidi, G. C.** Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2006, 44, p. 311–316.
2. **Lippi, G., Blackaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A., Plebani, M.** Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimen in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008, 46, p. 764–772.
3. **Trenčanská, Š.** Bakalářská práce 2009. Dostupné na [www:](http://is.muni.cz/th/215065/lf_b/Bakalarska_prace.docx) [http://is.muni.cz/th/215065/lf\\_b/Bakalarska\\_prace.docx](http://is.muni.cz/th/215065/lf_b/Bakalarska_prace.docx).
4. **Owens, H., Siparsky, G., Bajaj, L., Hampers, L. C.** Correction of factitious hyperkalemia in hemolyzed specimens. *Am. J. Emerg. Med.*, 2005, 23, p. 872–875.

Do redakce došlo 3. 5. 2010.

Adresa pro korespondenci:  
RNDr. Miroslava Beřovská, Ph.D.  
OKBH FN Brno  
Jihlavská 20  
625 00 Brno  
e-mail: [mberov@fnbrno.cz](mailto:mberov@fnbrno.cz)