

Vliv hemolýzy na stanovení celkového a přímého bilirubinu

Procházka J.¹, Bořecká K.², Lánská V.³

¹Oddělení klinické biochemie, Nemocnice s poliklinikou Česká Lípa, a. s., Česká Lípa

²Oddělení klinické biochemie, Thomayerova nemocnice, Praha

³Oddělení lékařské statistiky, IKEM, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Cílem studie bylo vlastním experimentem ověřit vliv různého stupně hemolýzy (indexu H) na stanovení koncentrace celkového a přímého bilirubinu a určit mezní úroveň hemolýzy, do které lze výsledek koncentrace bilirubinu vydat pouze s doplňujícím komentářem.

Materiál a metody: K patientským vzorkům sér s nízkou primární hemolýzou a rutinně stanovenou koncentrací bilirubinu celkového a přímého v rozsahu nízkých až vysoce patologických hodnot jsme přidali hemolyzát a vytvořili různé stupně hemolýzy. Následně jsme opakovaným měřením zjistili odchylku od původních hodnot koncentrace bilirubinu a výsledky statisticky (metodou nejmenších čtverců a metodou kontrastu v analýze rozptylu) zpracovali.

Výsledky: Zjistili jsme negativní bias u celkového i přímého bilirubinu v závislosti na stoupajícím stupni hemolýzy. Ve vzorcích s vysokou hemolýzou se ale také projevil vzestup primární koncentrace bilirubinu, pravděpodobně způsobený zvýšením absorbance vlastního hemoglobinu, tedy přímou fotometrickou interferencí. Tento vzestup byl markantní především u přímého bilirubinu, ve vzorcích s nízkou primární koncentrací přímého bilirubinu. Odvodili jsme mezní stupeň hemolýzy pro stanovení jak celkového (H index 95), tak přímého bilirubinu (H index 53) metodou užívanou v naší laboratoři.

Závěr: Experimentem vycházejícím z rutinní laboratorní praxe jsme ověřili vliv hemolýzy na koncentraci celkového a přímého bilirubinu a určili mezní stupeň hemolýzy, od kterého nelze výsledek koncentrace bilirubinu vydat.

Klíčová slova: bilirubin, hemolýza, sérové indexy.

SUMMARY

Procházka J., Bořecká K., Lánská V.: Haemolysis influence on the determination of total and direct bilirubin

Objective: We tested an effect of hemolysis (H index) on concentrations of total and direct bilirubin to determine the threshold level of hemolysis, until which quantitative results can be issued only with an additional comment.

Materials and Methods: We added haemolysate to serum samples with low primary concentration of total or direct bilirubin and created different degrees of hemolysis. Then we established a deviation from original values of bilirubin concentration by repeated measurement and statistically processed (by the least squares method and by the contrast method in the analysis of variance).

Results: We found negative bias in the case of both total and direct bilirubin. However a rise of primary bilirubin concentration was expressed in samples with high hemolysis, caused probably by increased absorbance of hemoglobin, then by direct photometric interference. The rise was significant mainly in samples with low original concentration of direct bilirubin. We deduced the threshold level of hemolysis for measurement of total (H index 95) and direct bilirubin (H index 53) by method used in our laboratory.

Conclusion: We have verified the effect of hemolysis on concentrations of total and direct bilirubin by the experiment based on routine laboratory practice. We have determined the threshold level of hemolysis, until which quantitative results cannot be issued.

Keywords: bilirubin, hemolysis, serum indices.

Úvod

Hemolýza je definována jako rozpad erytrocytů provázený uvolněním hemoglobinu a dalších intracelulárních látek do extracelulárního prostoru v krvi. Může vznikat přímo v organismu = in vivo (např. hemolytická anémie), nebo častěji, mimo organismus = in vitro (v průběhu všech částí preanalytické fáze, tzn. při odběru vzorku, transportu nebo skladování). Hemolýza různými mechanismy interferuje se stanovením některých analytů: vylití intracelulárních analytů do séra/plazmy a vzrůst jejich koncentrace (K, LD, AST, Mg a další); interference červeného zabarvení volného hemoglobinu při fotometrických analýzách zvýšením absorbance v oblasti vlnových délek viditelného spektra 300 - 500 nm, charakteristicky při 415 nm; působení hemoglobinu jako pufru, tj. změ-

na pH činidla a ovlivnění průběhu reakce (ALP, albumin); dále může hemoglobin reagovat s některým činidlem, rozkládat ho, a tím snižovat výsledek měření (reakce s NO₂ u stanovení bilirubinu). Mechanismy výsledného ovlivnění výsledku se kombinují a závisí na stupni hemolýzy a koncentraci bilirubinu ve vzorku [1-8].

Měření koncentrace bilirubinu celkového a přímého patří k nejčastěji požadovaným rutinním biochemickým analýzám. Vzhledem k principu stanovení azokopulační diazoreakcí s následným fotometrickým měřením intenzity vzniklého zabarvení [7] může být výsledek výrazně ovlivněn hemolýzou předloženého vzorku krve. Od určitého stupně hemolýzy je vhodné výsledek měření koncentrace bilirubinu nevydávat a požádat o nový odběr, což je nepříjemné jak pro zdravotnický personál, tak především pro pacienta.

Pro kvantifikaci hemolýzy, chylozity a ikterity vzorku lze využít automatické semikvantitativní měření tzv. sérových indexů (H = hemolýza, I = ikterity a L = lipémie), což je přesnější, než posuzování kvality vzorku pozorováním okem. Hemolýza je viditelná okem od koncentrace volného hemoglobinu cca 1,00 g/l, je obtížné rozlišit jednotlivé stupně hemolýzy, zatímco rozsah automatického semikvantitativního měření indexu hemolýzy je 5 až 1 200 (odpovídá koncentraci hemoglobinu 0,05 - 12,00 g/l) [1, 7].

Evropská směrnice pro in vitro diagnostiku (IVDD) stanovuje povinnost výrobců reagensů definovat odpovídající interference a omezení. Příbalový leták fy Roche pro přístroj Modular udává možnost stanovení celkového bilirubinu bez významné interference až do H indexu 1 000 (odpovídá 10,00 g/l nebo 621,0 μmol/l hemoglobinu), pro přístroj Cobas c501 ale pouze do H indexu 50 (odpovídá přibližně 0,50 g/l nebo 31,0 μmol/l hemoglobinu) při koncentraci bilirubinu do 17 μmol/l, u novorozeneckých sér při koncentraci bilirubinu 150 μmol/l do H indexu 400 (= 4,00 g/l nebo 248,4 μmol/l hemoglobinu). Pro bilirubin přímý je shodně u obou analyzátorů uvedena možnost stanovení bez významné interference do H indexu 25 (odpovídá přibližně koncentraci hemoglobinu 0,25 g/l nebo 15,6 μmol/l) [7].

V 1. pololetí 2012 byl na OKB Thomayerovy nemocnice v Praze změřen index hemolýzy celkem u 47 840 patientských vzorků, koncentrace hemoglobinu ≤ 0,50 g/l byla zjištěna u 45 776 vzorků (95,7 %), koncentrace hemoglobinu v intervalu 0,5 - 3,00 g/l u 1 856 vzorků (3,9 %) a koncentrace hemoglobinu ≥ 3,01 g/l u 208 vzorků, což je 0,4 % celkového počtu. V následujícím období se stav mírně zlepšil, přesto je hemolýza bohužel velmi častým problémem kvality vzorku, se kterým se musíme v laboratoři potýkat, což koresponduje též s údaji z literatury [3-6, 8].

Vzhledem k nejednotnosti firemních údajů o přípustném stupni hemolýzy jsme se rozhodli vlastním experimentem ověřit vliv hemolýzy na stanovení bilirubinu celkového i přímého a určit mezní stupeň hemolýzy, od kterého nelze kvantitativní výsledek vydat.

Materiál a metody

Pro měření závislosti hodnoty celkového a přímého bilirubinu na hemolýze byly vybrány patientské vzorky sér z rutinního provozu s vyžádaným vyšetřením bilirubinu (s koncentrací bilirubinu v rozsahu od nízkých do vysoce patologických koncentrací) a nízkou primární hemolýzou (index H méně než 18 = koncentrace hemoglobinu 0,18 g/l nebo 11,2 μmol/l). Podle koncentrace bilirubinu pak byly vytvořeny 4 skupiny pro celkový bilirubin a 3 skupiny pro bilirubin přímý – viz Tabulka 1 a 2.

Přídavkem 5 μl hemolyzátu (vhodným ředěním předem připraveného) k 100 μl séra bylo dosaženo 4 různých stupňů hemolýzy (H index cca 35, 90, 170 ≥ 500), což bylo ověřeno měřením.

Hemolyzát byl připraven zmrazením a následným rozmrazením patientských vzorků plné krve. Pro přípravu různého stupně hemolýzy bylo pipetováno:

- 1 000 μl fyziologického roztoku a 5 μl hemolyzátu plné krve pro přípravu vzorků s indexem hemolýzy cca 35,
- 1000 μl fyziologického roztoku a 50 μl hemolyzátu plné krve pro přípravu vzorků s indexem hemolýzy cca 90,
- 1000 μl fyziologického roztoku a 400 μl hemolyzátu plné krve pro přípravu vzorků s indexem hemolýzy cca 170,
- 1000 μl fyziologického roztoku a 1500 μl hemolyzátu plné krve pro přípravu vzorků s indexem hemolýzy ≥ 500.

Vzorky byly na požadovanou hodnotu H indexu upraveny následným ředěním fyziologickým roztokem nebo přídavkem hemolyzátu. Vzhledem k tomu, že přídavek hemolyzátu nebo fyziologického roztoku činil pouze cca 4 - 5 % celkového objemu vzorku (minimální diluce), nebyla koncentrace bilirubinu původních patientských vzorků znovu analyzována s přídavkem stejného množství fyziologického roztoku.

Měření koncentrace bilirubinu celkového a přímého bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Cobas c501 (Roche) soupravami Roche Bilirubin Total DPD Gen. 2 (diazometoda: nepřímý bilirubin je uvolněn detergentem, celkový bilirubin pak reaguje přímo s 3,5-dichlorofenyldiazoniou solí v prostředí kyselého pufru za vzniku červeného azobilirubinu; intenzita červeného zbarvení je přímo úměrná koncentraci celkového bilirubinu) a Bilirubin Direct (diazometoda: přímý bilirubin reaguje s 3,5-dichlorofenyldiazoniou solí v prostředí kyselého pufru za vzniku červeného azobilirubinu; intenzita červeného zbarvení je přímo úměrná koncentraci celkového bilirubinu). Měření sérových indexů bylo provedeno na biochemickém analyzátoru Cobas c501 soupravou Serum Index Gen. 2. Principem testu je naředění vzorku pacienta fyziologickým roztokem (0,9% NaCl) a stanovení absorbance bichromatickým měřením pro hemolýzu při 570 a 600 nm s korekcí na překrývání interferenčního spektra. Hodnoty sérových indexů pro jednotlivé metody, od kterých může docházet k ovlivnění analýz, jsou uvedeny výrobcem v příbalových letáčích k reagensům.

Statistické zpracování: k odhadu křivek (obr. 2 a 4) byla použita metoda nejmenších čtverců, k testování shody křivek byla použita metoda kontrastu v analýze rozptylu.

Výsledky a diskuse

Výsledky měření koncentrace celkového bilirubinu při různých stupních hemolýzy jsou shrnuty v Tabulce 1 a na obr. 1 a 2.

Výsledky měření koncentrace přímého bilirubinu při různých stupních hemolýzy jsou shrnuty v Tabulce 2 a na obr. 3 a 4.

Provedeným experimentem jsme zjistili zřetelný pokles naměřených hodnot celkového i přímého bilirubinu v závislosti na zvyšujícím se stupni hemolýzy, což odpovídá principu interference hemoglobinu, uváděnému v literatuře [1, 3, 7-8]. Nicméně z obr. 2 je patr-

Table 1. Effect of different hemolysis degrees on the concentration of total bilirubin

Bilirubin total [μmol/l]	n	Hemolysis (H index)	Average bias [μmol/l]	Average bias [%]	Bias maximum [%]	Bias minimum [%]
x ≤ 19.0	15	H ≈ 35	-0.7	-7.8	-22.5	0.0
		H ≈ 90	-1.6	-16.5	-35.3	7.1
		H ≈ 170	-2.2	-21.6	-38.7	4.8
		H ≥ 500	-2.7	-30.0	-46.7	-9.7
19.0 < x ≤ 30.0	16	H ≈ 35	-1.4	-6.1	-13.5	-1.8
		H ≈ 90	-2.4	-10.3	-22.3	-0.9
		H ≈ 170	-4.1	-18.1	-32.7	-8.9
		H ≥ 500	-4.9	-21.6	-45.8	-5.8
30.0 < x ≤ 140.0	16	H ≈ 35	-2.0	-3.5	-13.2	0.3
		H ≈ 90	-5.1	-7.8	-15.8	-3.1
		H ≈ 170	-8.4	-12.8	-22.9	-8.1
		H ≥ 500	-12.8	-19.1	-33.2	-7.7
140.0 < x	16	H ≈ 35	-6.6	-3.0	-7.2	-0.8
		H ≈ 90	-12.3	-5.9	-9.3	-3.1
		H ≈ 170	-17.6	-9.1	-14.6	-4.7
		H ≥ 500	-31.5	-16.2	-24.7	-10.8
Total	63	H ≈ 35	-2.7	-5.0	-22.5	0.3
		H ≈ 90	-5.4	-10.0	-35.3	7.1
		H ≈ 170	-8.2	-15.3	-38.7	4.8
		H ≥ 500	-13.2	-21.6	-52.3	-5.8

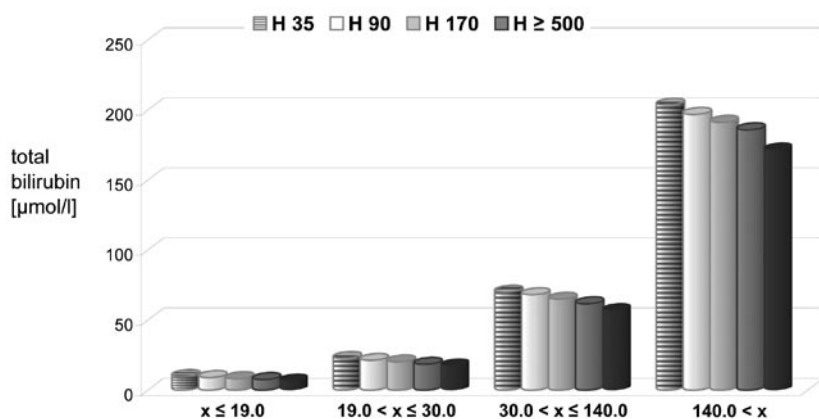


Fig. 1 Dependence of total bilirubin on hemolysis (H = H index, index of hemolysis); four groups according to total bilirubin concentration: less than 19.0 μmol/l; between 19.0 and 30.0 μmol/l; between 30.0 and 140.0 μmol/l and greater than 140.0 μmol/l.

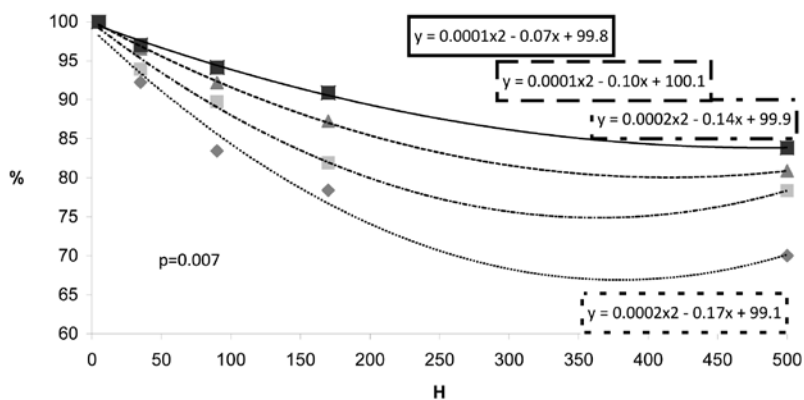


Fig. 2 Dependence of total bilirubin on hemolysis (H = H index, index of hemolysis) – relative change; curves according to groups of total bilirubin concentration: less than 19.0 μmol/l, between 19.0 and 30.0 μmol/l, between 30.0 and 140.0 μmol/l, and greater than 140.0 μmol/l.

Table 2 Effect of different hemolysis degrees on concentration of direct bilirubin

Bilirubin direct [μmol/l]	n	Hemolysis (H index)	Average bias [μmol/l]	Average bias [%]	Bias maximum [%]	Bias minimum [%]
x ≤ 11.0	20	H ≈ 35	-0.4	-6.7	4.0	-18.8
		H ≈ 90	-1.4	-26.1	0.0	-39.5
		H ≈ 170	-1.8	-30.9	16.7	-54.5
		H ≥ 500	3.3	74.3	159.6	-11.9
11.0 < x ≤ 40.0	15	H ≈ 35	-2.1	-8.2	1.8	-17.7
		H ≈ 90	-4.0	-17.3	-6.1	-26.5
		H ≈ 170	-6.3	-28.5	-16.8	-43.0
		H ≥ 500	-5.9	-24.8	7.1	-45.0
40.0 < x	15	H ≈ 35	-6.4	-5.1	-0.3	-9.9
		H ≈ 90	-14.0	-11.8	0.3	-19.0
		H ≈ 170	-22.2	-19.8	-11.3	-30.5
		H ≥ 500	-33.8	-29.4	-9.8	-44.0
Total	50	H ≈ 35	-2.7	-6.6	4.0	-18.8
		H ≈ 90	-6.0	-19.2	0.3	-39.5
		H ≈ 170	-9.3	-26.9	16.7	-54.5
		H ≥ 500	-10.6	13.5	159.6	-45.0

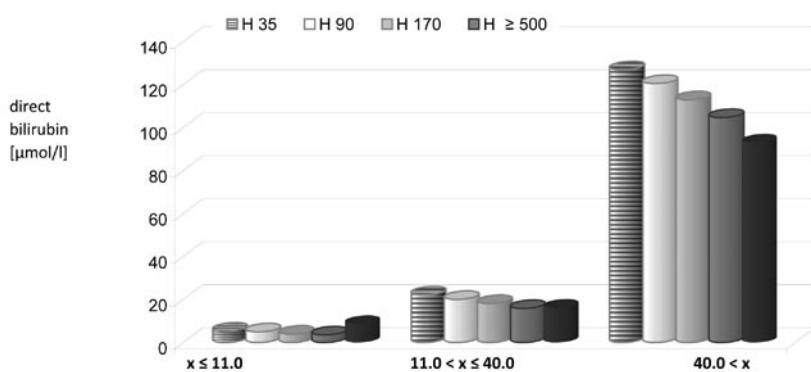


Fig. 3 Dependence of direct bilirubin on hemolysis (H = H index, index of hemolysis); three groups according to direct bilirubin concentration: less than 11.0 μmol/l; between 11.0 and 40.0 μmol/l; and greater than 40.0 μmol/l.

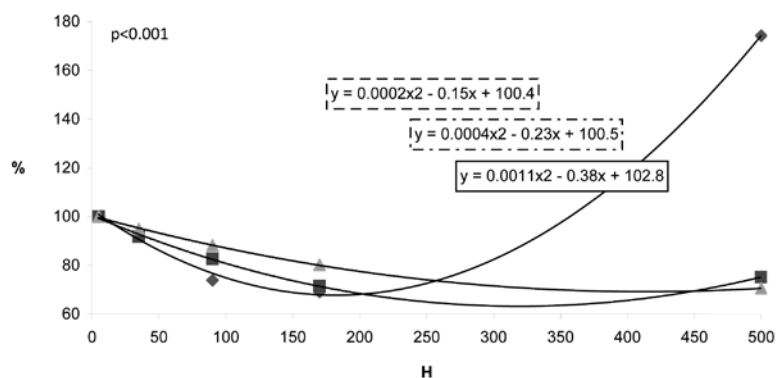


Fig. 4 Dependence of direct bilirubin on hemolysis (H = H index, index of hemolysis) – relative change; curves according to groups of direct bilirubin concentration: less than 11.0 μmol/l, between 11.0 and 40.0 μmol/l, greater than 40.0 μmol/l.

né, že cca u hemolýzy H 200 dochází k ohybu přímek (lineární závislosti koncentrace celkového bilirubinu na hemolýze) a postupnému vzestupu hodnot celkového bilirubinu.

Ještě zřetelnější je tento trend na obr. 4, kde ve skupině s nízkou koncentrací přímého bilirubinu (do 11,0 $\mu\text{mol/l}$) byla do indexu H cca 100 zjištěna rovněž přibližně lineární závislost na hemolýze (pokles hodnot se vzrůstající hemolýzou), avšak s nárůstem indexu hemolýzy nad 100 dochází k ohybu křivky a postupnému vzestupu hodnot přímého bilirubinu, který je již velmi markantní u silné hemolýzy, tj. H indexu více než 500 (+ 174 %). Tento falešný nárůst koncentrace přímého i celkového bilirubinu je pravděpodobně způsobený přímou fotometrickou interferencí (nárůstem absorbance) vysoké koncentrace volného hemoglobinu v séru.

Z obr. 2 a 4 je také zřejmé, že stupeň interference hemolýzy je v závislosti nejen na velikosti hemolýzy (koncentraci volného hemoglobinu), ale též v závislosti na koncentraci bilirubinu. Při nízkých koncentracích bilirubinu působí hemolýza relativně velkou změnu výsledku, tzn., že koncentrace bilirubinu ve fyziologických mezích jsou nejvíce vulnerabilní vůči hemolýze. Z klinického hlediska by především vzorky s koncentrací bilirubinu kolem horní referenční meze neměly být hemolytické.

Jako klinicky významnou změnu koncentrace bilirubinu vlivem hemolýzy jsme určili změnu o 10 a více % (též s přihlédnutím k intraindividuální variabilitě bilirubinu a v neposlední řadě k analytické chybě systému). Z odhadnutých křivek jsme jednoduchým výpočtem určili jako mezní stupeň hemolýzy index H $94,5 \approx 95$ (= 0,95 g/l nebo 59,0 $\mu\text{mol/l}$ hemoglobinu) pro stanovení celkového bilirubinu a index H $52,5 \approx 53$ (= 0,53 g/l nebo 32,9 $\mu\text{mol/l}$ hemoglobinu) pro stanovení přímého bilirubinu. Při vyšší hemolýze nahrazujeme kvantitativní výsledek textem „hemolýza“. Při hodnotách H indexu nižších než mezní ke kvantitativnímu výsledku koncentrace bilirubinu připojujeme komentář „slabá hemolýza“ (od koncentrace H indexu $32 = 0,32 \text{ g/l} = 19,9 \mu\text{mol/l}$ hemoglobinu) [3-4].

Závěr

Semikvantitativní měření sérových indexů včetně indexu hemolýzy pokládáme za nezbytné pro posouzení vhodnosti biologického materiálu ke zpracování. Po zhodnocení výsledků měření, vzhledem k vypočte-

ným statistickým parametřům, jsme určili mezní stupeň hemolýzy pro stanovení celkového i přímého bilirubinu metodou užívanou v naší laboratoři. Při vyšší hemolýze by vzhledem k prokazatelně významnému ovlivnění neměl být kvantitativní výsledek koncentrace bilirubinu vydán. Primární snahou ale zůstává prevence problému a snížení množství hemolytických vzorků biologického materiálu předcházením chybám v preanalytické fázi.

Literatura

1. **Trenčanská, Š.** Ovlivnění biochemických analýz stavem biologického materiálu (hemolýza, ikterita, chylozita), bakalářská práce 2009, dostupné na webu: http://is.muni.cz/th/215065/lf_b/Bakalarska_prace.pdf.
2. **Autorský kolektiv.** Preanalytická fáze, Česká společnost klinické biochemie ČLS JEPa SEKK s.r.o., 2005, ISBN 80-239-5198-X, str. 11-17.
3. **Beňovská, M., Dastych, M., Čermáková, Z., Tůmová, J.** Preanalytické interference a praktické využití sérových indexů. *Klin. Biochem. Metab.*, 2010, 18 (39), 3, p. 144-148.
4. **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.
5. **Lippi, G., Blanckaert, N., Bonini, P., Green, S., Kitchen, S., Palicka, V., Vassault, A., Plebani, M.** Hemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimen in clinical laboratories. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2008, 46, p. 764-772.
6. **Guder, W. G., Narayanan, S., Wisser, H., Zawta, B.** Samples: From the Patient to the Laboratory, 3rd edition Weinheim: Wiley – VCH 2003, 102 p. ISBN 3 527 30981-0.
7. Příbalové informace souprav Bilirubin Total DPD Gen. 2 a Total Bilirubin liquid, Bilirubin Direct a Serum Index Gen. 2.
8. **Bicanová, A., Grofová, P., Racek, J.** Vliv hemolýzy na klinicko-biochemická vyšetření. *Biochem. Clin. Bohemoslov.*, 17, 1988, p. 517-528.

Autoři sdělení děkují firmě Roche s.r.o. za laskavé poskytnutí podpory pro provedení prezentovaných experimentů.

Do redakce došlo 3. 7. 2013

Adresa pro korespondenci
Ing. Jaroslav Procházka
Nemocnice s poliklinikou Česká Lípa, a.s.
Purkyňova 1849
470 77 Česká Lípa
e-mail: jaroslav.prochazka@nemcl.cz