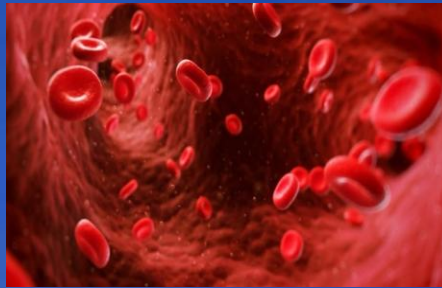
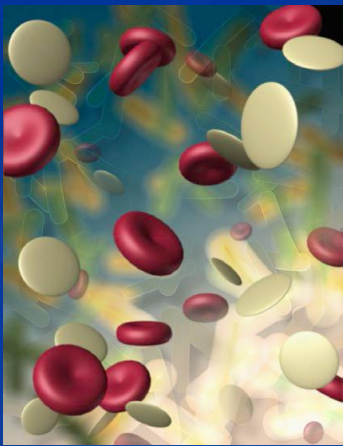


# ZNAČAJ HEMOLIZE “*IN VIVO*” I “*IN VITRO*” ZA VALIDNOST KLINIČKIH REZULTATA



***Prim. dr. sc Emina Čolak***

Centar za medicinsku biohemiju,  
KCS, Beograd



# Definicija interferencije i posledice

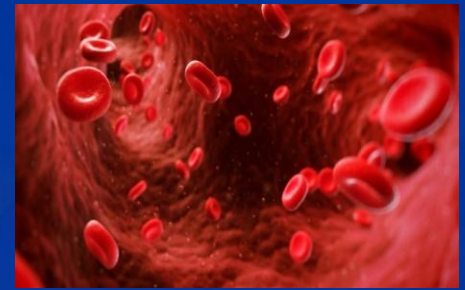
- Supstanca ili proces utiče na vrednost nekog analita
- naručivanje dodatnih analiza
- poskupljivanje cene koštanja lečenja
- pogrešna dijagnoza
- pogrešno lečenje
- loš ishod lečenja



# Vrste interferencija

- **Endogene** (od supstanci koje se prirodno nalaze u biol. materijalu):
  - a) hemoglobin, bilirubin, lipidi, proteini, antitela
  - b) supstance koje daju unakrsnu reakciju sa analitom (bikarbonati sa hloridnom elektrodom, ketoni sa Jaffeovom reakcijom)
- **Egzogene** (sups. koje se ne nalaze prirodno u biol. materijalu):
  - a) lekovi (sami, metabol. ili aditivi)
  - otrovi, tečnosti za iv. aplikaciju, konzervansi,
  - b) uticaj transporta, čuvanja, centrifugiranja, sporo koagulisavanje, carry-over kontaminacija

# Definicija hemolize



- Cepanje membrane ER-oslobađanje Hb i drugih konstituenata
- Podela prema mestu nastanka:
  - hemolize “in vivo”
  - hemolize “in vitro”
- Uočljiva tek nakon centrifugiranja krvi
- prevalenca 3-4% od svih uzoraka
- Hemolitični uzorci: 40-70% svih uzoraka za odbacivanje



# Klasifikacija hemolize (po Lippi-u)

Klase	Konc. slobodnog hemoglobina	Boja seruma
Ne-hemolizovan uzorak	<0,05 g/L	žuta
Slaba hemoliza	0,05-0,3 g/L	Jače žuta ili slabo roze
Srednje jaka	0,3-0,6 g/L	Svetlo crvena-roze
Izražena hemoliza	0,6-3,0 g/L	Crvena boja
Vrlo izražena hemoliza	>3,0g/L	Jaka crvena ili bordo boja



g/L 0 0.50 1.50 2.50 5.25

# Uzroci hemolize “in vivo”

## 1. Nasledna hemolitička anemija

### a) defekti u sintezi Hb

- talasemije
- “sickle cell disease”

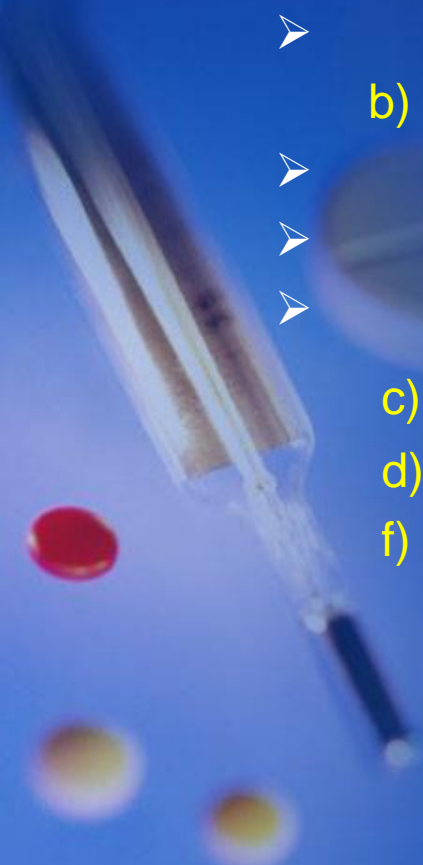
### b) defekti u membrani ER

- nasledna sferocitoza
- nasledna eliptocitoza
- paroksizmalna noćna hemoglobinurija (PNH)

### c) defektan metabolizam ER

### d) deficit glukoza-6-fosfat dehidrogenaze

### f) deficit piruvat-kinaze





# Uzroci hemolize “in vivo”

## 2. Stečena hemolizna stanja

### a) imunološki faktori

- infekcije mikoplazmom pneumonije
- autoimune hemolizne anemije
- autoimune bolesti (SLE, HLL)

### b) hipersplenizam

### c) opekotine

### d) infekcije (malaria, klostridijum..)

### e) mehanička oštećenja ER u cirkulaciji

- DIK
- HAS (hemolizni anemijski sindrom)
- trombotična trombocitopenijska purpura (TTP)
- veštački srčani zalisci
- HELLP sindrom (hemoliza, povećani jetreni enzimi, niski trombociti)

### f) transfuzija krvi od nekompatibilnog donora

### g) lekovi, toksini, dr.

# Uzroci hemolize “in vitro”

## 1. Uzroci vezani za pacijente

- slabe vene
- neadekvatan pristup venama

## 2. Uzroci vezani za flebotomičara

- veština operatera
- mesto uboda (neadekvatno)
- traumatska venepunkcija
- veći broj pokušaja venepunkcije
- promašena vena (u toku v.punkcije igla izašla iz vene)
- uzimanje krvi iz hematoma
- vlažno mesto uboda
- produženo vreme držanja poveske
- suviše stegnuta poveska
- nedovoljno napunjena epruveta





# Uzroci hemolize “in vitro”

## 3. Uzroci vezani za sistem venepunkcije

- korišćenje neadekvatnog sistema
- uzimanje krvi iz iv. katetera ili braunile
- uzimanje pomoću “butterfly” sistema
- igle sa malim promerom
- parcijalna opstrukcija vena
- uzimanje lancetom (kod dece)

## 4. Rukovane uzorcima

- ne mešanje ili nedovoljno mešanje uzorka
- preterano mešanje ili mućkanje
- transfer krvi u sekundarnu epruvetu (syringe)



# Uzroci hemolize “in vitro”

## 5. Transport uzorka

- poreklo uzorka (transport sa drugih klinika ili institucija)
- način transporta (pneumatska tuba ili kurir)
- uslovi transporta (mehaničko oštećenje, vreme, temperatura, vlažnost)
- direktan kontakt epruvete sa ledom

## 6. Postupci sa uzorcima

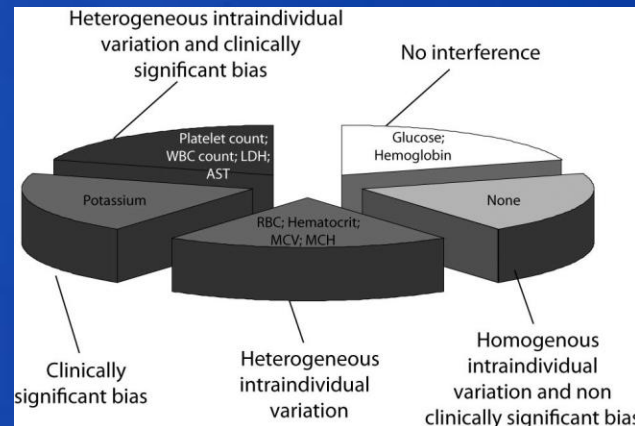
- kasno centrifugiranje
- neadekvatni uslovi centrifugiranja (snaga, vreme, temp.)
- slab integritet membrane ER

## 7. Čuvanje-skladištenje uzoraka

- uslovi čuvanja (temp. vreme)

# Mehanizmi interferencije hemolize

1. **Spektrofotometrijska** interferencija (apsorpcija na istim talasnim dužinama: 570-650, 340-403 nm, ALP, GGT)
2. **Hemijska** interferencija (uticaj na tok hemijske reakcije; reakcija dijazotiranja, uticaj AK na CK)
3. **Uticaj ćelijskih konstituenata** ER: LDH (160x), K (22x), Mg (3x), AST
4. **Diluciona interferencija** – kontaminacija seruma/plazme intraćelijskom tečnošću (kontaminacija sa Na i Cl)



# Parametri na koje utiče hemoliza

## Pozitivan efekat

### Parametar

AST  
ALT  
Kalcitonin  
CK  
Kreatinin  
D-dimer  
Folati  
Fe  
LDH  
Lipaza  
Magnezijum  
Fosfor  
Kalijum  
PSA  
PT  
Urea  
Troponin I

### Uzrok

ćelijsko oslobađanje  
ćelijsko oslobađanje  
proteoliza  
analitička interferencija  
analitička interferencija  
osloba. tromboplastič.sup  
ćelijsko oslobađanje  
analitička interferencija  
ćelijsko oslobađanje  
analitička interferencija  
ćelijsko oslobađanje  
ćelijsko oslobađanje  
ćelijsko oslobađanje  
ćelijsko oslobađanje  
analitička interferencija  
osloba. tromboplast. sup.  
ćelijsko oslobađanje  
analitička interferencija

## Negativan efekat

### Parametar

ACTH  
aPTT  
Antitrombin  
Albumin  
ALP  
T. bilirubin  
Cl  
Kortizol  
Fibrinogen  
GGT  
Gastrin  
Glukagon  
Glukoza  
Haptoglobin  
Homocistein  
Insulin  
Parathormon  
Natrijum  
Testosteron  
Troponin T  
Vitamin B12

### Uzrok

proteoliza  
oslob. tromboplast. sup.  
analit. interferencija  
dilucija  
analit. interferencija  
analit. interferencija  
dilucija  
analit. interferencija  
oslob. tromboplast. sup.  
analit. interferencija  
proteoliza  
proteoliza  
dilucija  
analit. interferencija  
analitička interferenc.  
proteoliza  
proteoliza  
dilucija  
analit. interferencija  
analit. interferencija  
analit. interferencija

# Preporučena procedura za identifikaciju i rukovanje sa hemolizovanim uzorcima



# Mehanizmi korekcije interferencija

## I- Korekcija hemijske interferencije

1. **Dilucija** (kada intenzitet boje ne interferira sa bojom kompleksa, tj. interferent ne reaguje na isti način kao analit)
2. **Korišćenje specifičnih biohemijskih metoda** (heksokinaza, glukoza-oksidaža, uraza, urikaza, holest. oksidaža, imunoeseji)
3. **Kinetičke metode u dve tačke** (drugačija reakcija interferenta i analita),
  - interferent sporije reaguje od analita.
  - Meri se promena apsorbancije analita u vremenu (kreatinin-Jaffe)



# Mehanizmi korekcije interferencija

## II- Korekcija spektralne interferencije

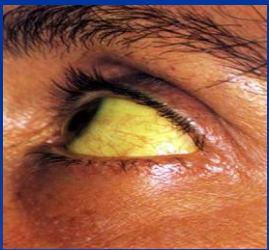
1. **Slepa proba uzorka** (uzorak + diluent). Eliminira se uticaj boje

### 2. Bihromatska analiza

- razlika apsorbanca analita i interferenta
- simultano merenje apsorbanca reakcione smeše na dve  $\lambda$
- otkloni se "efekat pozadine"
- $\lambda_1$ -apsorbanca interferenta i analita
- $\lambda_2$ -apsorbanca samo interferenta
- $\Delta\lambda$ -je apsorbanca analita

### 3. Kinetička analiza

- merenje apsorbanca u dve vremenske tačke
- 1. tačka-inicijalno čitanje kada nije stvorena boja **kompleksa-boja potiče samo od interferenta**
- 2. tačka-sek. čitanje. nakon reakcije: boja potiče od analita i interferenta -  **$\Delta\lambda$ -je apsorbanca analita**
- slepa proba nije nužna (analizatori)



# IKTERUS–ENDOGENA INTERFERENCIJA

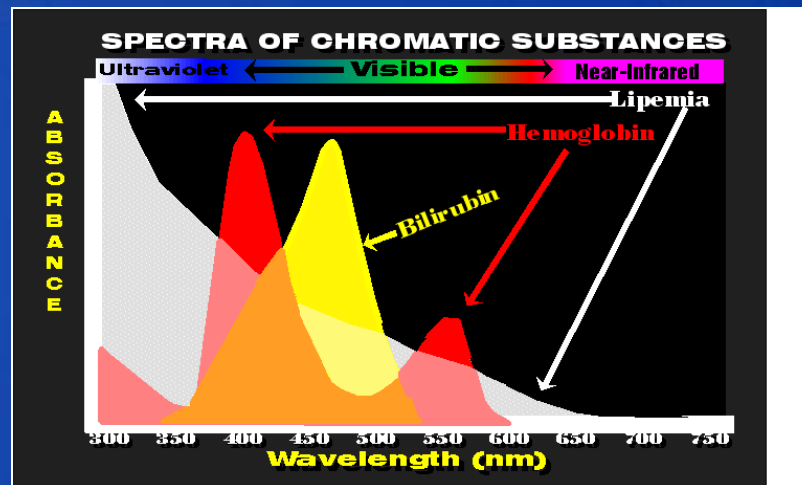
- **HIPERBILIRUBINEMIJA-IKTERUS**
- Katabolizam hema
- **Uzrok** hiperbilirubinemije:
  - - **hepatičke/opstruktivne**– (↑konjugovani bilirubin)
  - - **hemolitične** bolesti - (↑nekonjugovani-direktni bilirubin)
- Detekcija ikteričnog uzorka-nakon centrifugiranja
- Oko nije dovoljno osetljivo
- Automatska detekcija ikterusa
- Ikterus interferira sa pdeđivanjem: **kreatinina, glukoze, holesterola, Tg, P, mok. kiseline, proteina**



μmol/L 0 29.1 112.9 273.6 513

# IKTERUS–ENDOGENA INTERFERENCIJA

- **1. HEMIJSKA** interferencija-reakcija sa reagensom
  - -negativna interferencija: kreatinin
  - -reakcija sa peroksidazom: reakcije za određivanje glukoze, holesterola, triglicerida i mokl.kis.
  - - reaguje sa fosfomolibdatom u UV metodi određ. P
- **2. SPEKTROFOTOMETRIJSKA** interferencija- na talasnim dužinama od 340-500 nm



# Mehanizmi korekcije interferencija

1. **Slepa proba uzorka** (uzorak + diluent). Eliminira se uticaj boje

## 2. Bihromatska analiza

- razlika apsorbance analita i interferenta
- simultano merenje apsorbance reakcione smeše na dve  $\lambda$
- otkloni se “efekat pozadine”
- $\lambda_1$ -apsorbanca interferenta i analita
- $\lambda_2$ -apsorbanca samo interferenta
- $\Delta\lambda$ -je apsorbanca analita

## 3. Kinetička analiza

- merenje apsorbance u dve vremenske tačke
- 1. tačka-inicijalno čitanje kada nije stvorena boja **kompleksa-boja potiče samo od interferenta**
- 2. tačka-sek. čitanje. nakon reakcije: boja potiče od analita i interferenta -  **$\Delta\lambda$ -je apsorbanca analita**
- slepa proba nije nužna (analizatori)

# ZNAČAJ LIPEMIJE ZA VALIDNOST BIOHEMIJSKIH ANALIZA

*Prim.dr.sc Emina Čolak*

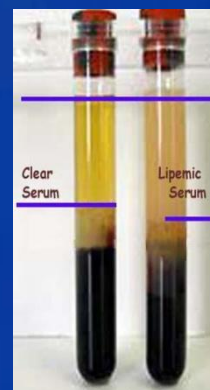
Centar za medicinsku biohemiju, KCS,  
Beograd



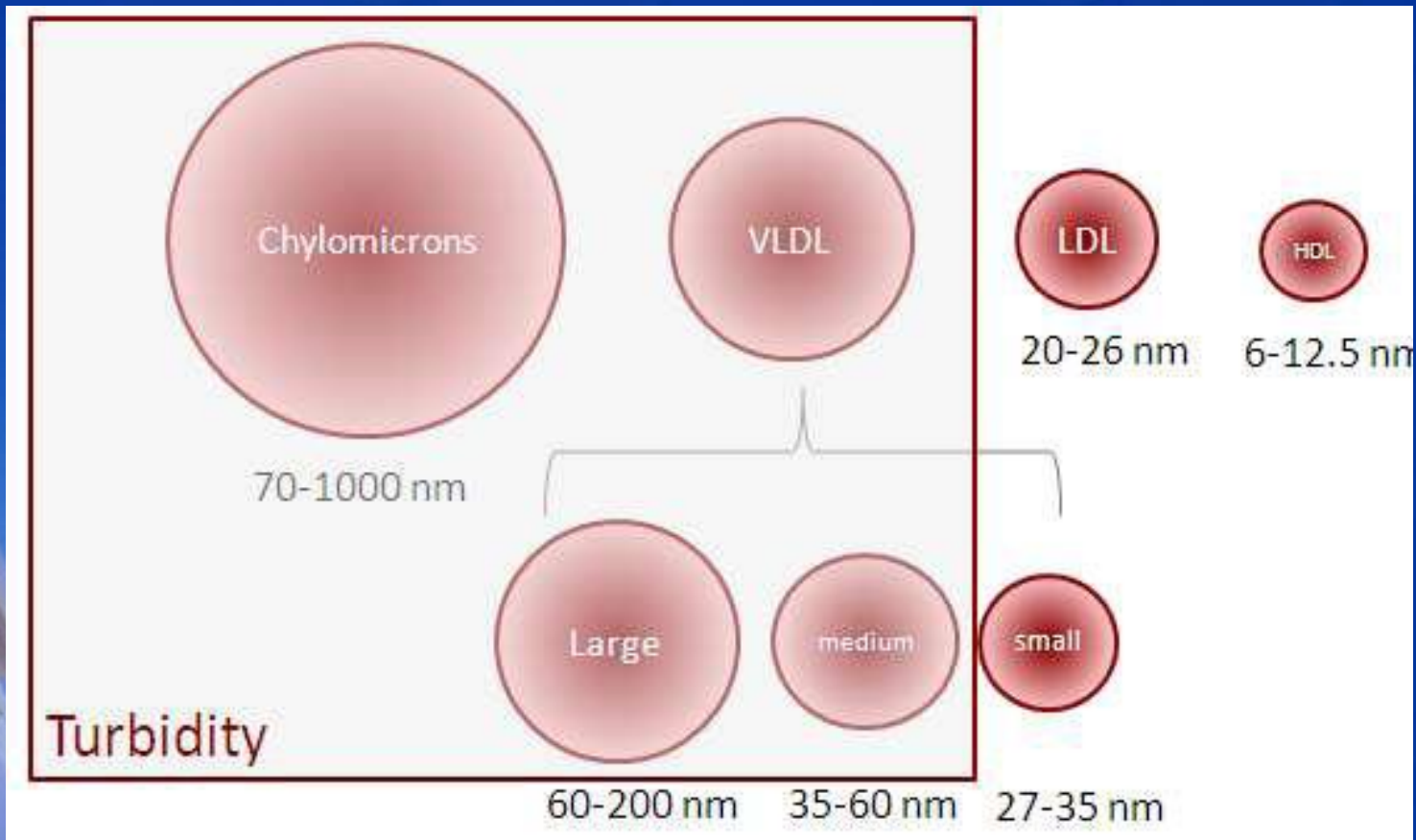


# FREKVENCIJA LIPEMIJE

- Definicija: **zamućenje uzorka** izazvano akumulacijom lipoproteinskih čestica
- **0,5-2,5% uzoraka** (vrste laboratorije, vrste ustanove, odnos ambulantnih i hospitalizovanih pacijenata, vrste patologija)
- **Izvor greške**
- **Analitička interferencija** (odstupanje od tačne vrednosti analita)







# Uzroci lipemije

- **Preanalitički faktori**



neadekvatno vreme  
uzorkovanja

- 

- 



upotreba lekova  
(Intralipid- emulzija za parenteralnu  
ishranu,estrogeni, oralni kontraceptivi,  
inhibitori proteaza, predoziranje lipof. lek.)

- **Patološka stanja**

- Akutni pankreatitis, alkoholizam, hronično oštećenje bubrega, hipotireoza, multipli mijelom, primarna ciroza, insulinska rezistencija, diabetes mellitus

# UZROCI LIPEMIJE (2)

- **FIZIOLOŠKI**-postprandijalna lipemija
- **PARA-FIZIOLOŠKI**-Intravenozna administracija lipida kod kritičnih pacijenata kao vid ishrane
- **METABOLIČKI POREMEĆAJI**  
(Hipertrigliceridemija)
- **DRUGI RAZLOZI** (patološki razlozi)

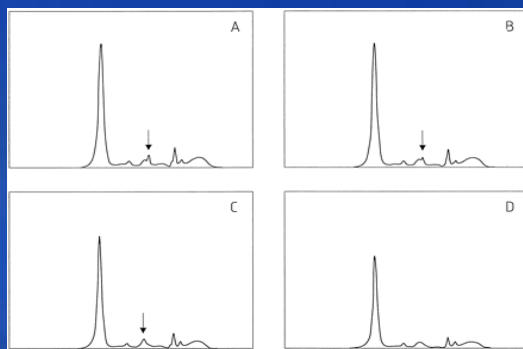


# WG-PC/EFCC: HARMONIZACIJA PREANALITIČKIH POSTUPAKA

- Vreme od poslednjeg obroka do uzorkovanja krvi
- Italija -8h
- Austrija-10-16h
- Srbija 12-14h
  
- Harmonizacija instrukcija za pripremu pacijenata za lab. određivanja;
- upoznati lekare, biohemičare i pacijente

# MEHANIZMI INTERFERENCIJE

- Fizička
- Hemijska interferencija
- kapilarna elektroforeza proteina  
(povećana  $\alpha_2$  frakcija globulina)

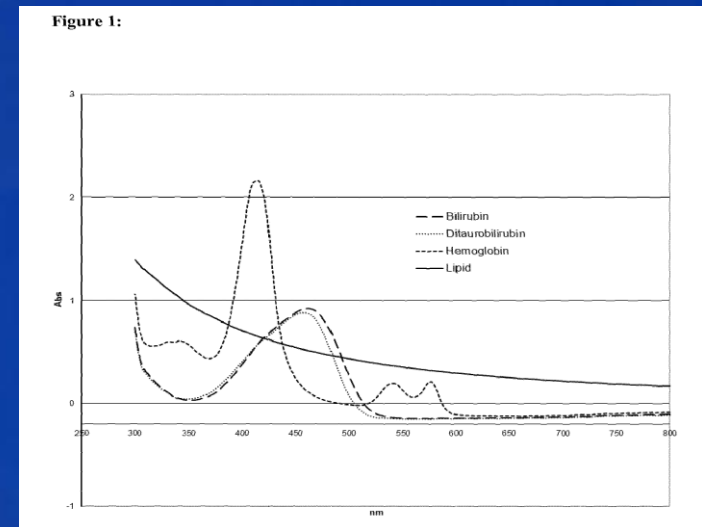


Bossuyt X, et al. Serum protein electrophoresis  
by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system  
Clin Chem. 1998;(4):749-59.

- interferencija sa reakcijama antigen-  
antitelo (blokiranje vezivnih mesta za antitela)

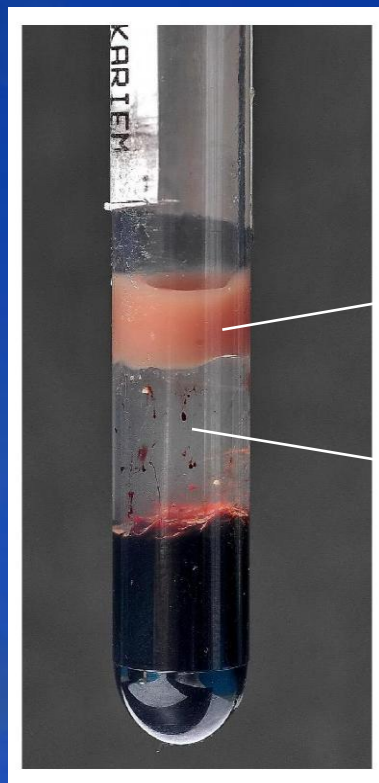
# INTERFERENCIJE SA SPEKTROFOTOMETRIJSKIM ODREĐIVANJEM

- Apsorpcija svetlosti lipida **obrnuto** proporcionalna  $\lambda$  (300-700 nm)
- Pogodne metode koje koriste **nižu talasnu dužinu** (npr. 340 nm, 405 nm)
- Određivanje AST, ALT, glukoze, r. redoks **NADH/NAD** kao indikatorsku r.
- Smer interferencije:
- Zavise od  $\lambda$ , **smera r.** ( $\downarrow \uparrow$ ),  
Upotreba **slepe probe**  
Za isti parametar  
interferencija se razlikuje  
od metode do metode
- Smetnje kod turbidimetrijskih i nefelometrijskih određivanja





# GREŠKE U VREDNOSTI ANALITA ZBOG NEHOMOGENE DISTRIBUCIJE KONSTITUENATA



Distribucija čestica:  
prema gustini  
(gore-čestice niže gustine)

hidrofobna faza  
lažno ↓ hidrofилnih analita

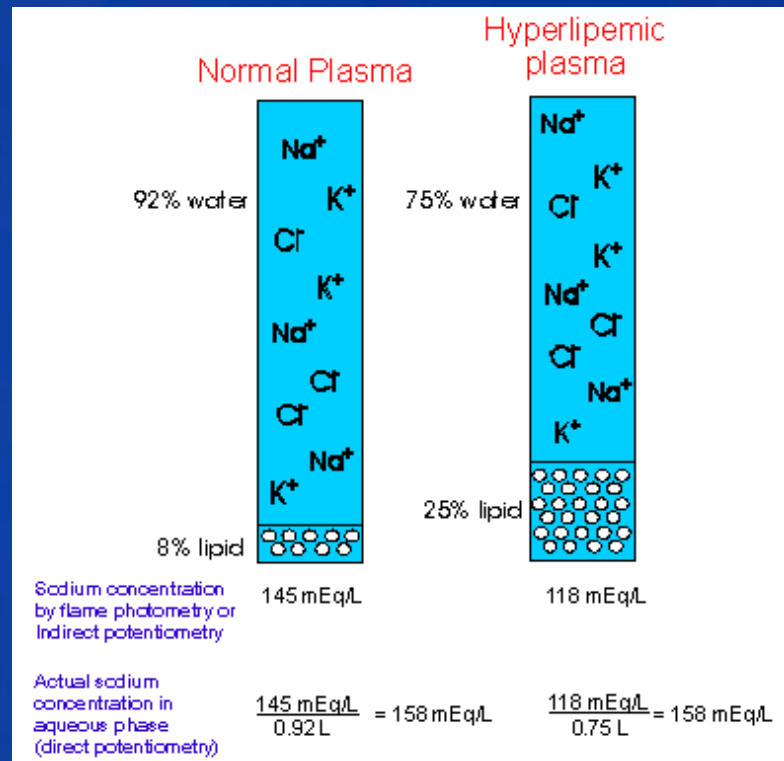
hidrofilna (vodena faza)  
lažno ↓ hidrofobnih analita

Greška u određivanju na  
aparatu  
zbog senzora za tečnost

# EFEKTI DISTRIBUCIJE ČESTICA

Lažno niske vrednosti hidrofilnih analita (plamena fotometrija i indirektna potenciometrija-jer mere konc. analita na ukupni vol. seruma

Direktna potenciometrija-prave vrednosti (izdate na vol. vodene faze)



# METODE DETEKCIJE LIPEMIJE

- Vizuelne metode

serum: TG>3,4 mmol/L

puna krv: TG>11,3 mmol/L



TG: (mmol/L) 1,25 1,75 2,22 3,09 5,06 8,86

- heterogeni rezultati vizualizacije (ako je uključeno više lab.teh)
- Lipemijski indeks

# ODREĐIVANJE LIPEMIJSKOG INDEKSA

- Preko konc. triglicerida (dobro slaganje kada je konc. triglicerida pratila izgled-zamućenje seruma;  $r^2=0.999$ , i  $r^2=0,239$ -gde konc. TG nije pratila stepen zamućenja seruma)
- **Pozitivna interferenca:** prisustvo glicerola u uzorku (↑TG, a ↓LI, usled prevelike konzumacije piva ili **mutacije gena za glicerol kinazu**)
- AUTOMATSKO ODREĐIVANJE LI ( na svim automatskim platformama)
  - apsorpcija svetlosti je proporcionalna konc. lipida
  - kombinacija 2 ili više talasnih dužina
  - Beckman-Coulter  $\lambda=660/800\text{nm}$
  - Cobas  $\lambda=660/700$
  - Architect  $\lambda=510/524; 572/604; 628/660; 524/804$

# AUTOMATSKO ODREĐIVANJE LI

- PREDNOSTI:

- ✓ niža cena koštanja
- ✓ velika brzina
- ✓ visoka reproducibilnost
- ✓ kratak "turn-around-time"

- NEDOSTACI:

- ✓ lažno pozitivni rezultati ( $\uparrow$ LI) turbiditet drugog uzroka)
- ✓ niski TG a visoki paraproteini (M)
- ✓ prisustvo kontrastne boje (Patient Blue V dye) kod operacije kancera

# NAČINI IZRAŽAVANJA LI

- **SEMI-KVANTITATIVNE SKALE** (dobra korelacija sa vizuelnim pregledom uzorka)
  - ✓ Beckman-Coulter: 0-5
  - ✓ Siemens: 1-6
- **KVALITATIVNA skala** –kontinuirana gradacija – bolje odgovara intralipidnoj koncentraciji u testovima simulacije (Abbott i Roche), bolje odražava intenzitet interference i stepen uticaja na rezultat
- **POTREBNO USKLAĐIVANJE “HARMONIZACIJA” NAČINA PRIKAZIVANJA REZULTATA**

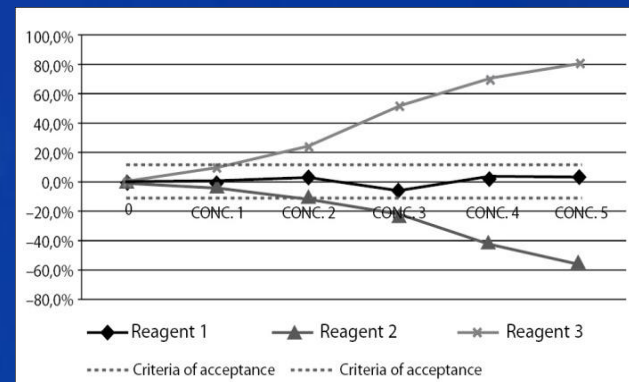


# OTKLANJANJE LIPEMIJE

- **ULTRACENTRIFUGIRANJE** (zlatni standard)  
(snaga: rpm= 100.000-2.000.000xg)
    - skupo, zametno
  - **BRZO CENTRIFUGIRANJE** (rpm=10.000xg)
    - uspešan kod hilomikrona,
    - manje efikasan za VLDL čestice (ponavljati više puta)
    - odvojiti infranatant (za određivanje hidrofilnih analita; nepogodan za hormone, lekove i hidrofobne materije distribuirane u hidrofobnom sloju)
  - **EKSTRAKCIJA** polarnim rastvaračima (PEG, ciklodekstrin)
    - **LIPOCLEAR**-ne-jonski polimer (StatSpin, Norwood MA, USA)
    - bistar supernatant
- PAŽNJA: ↓ recovery (<85%) P, GGT, CK-MB i CRP i ↑ recovery(>124%) za TnT
- **RAZBLAŽIVANJE** –za parametre distribuisane u lipidnom sloju
  - Stepen razblaživanja-dok se ne otkloni turbiditet, ali da analit ostane u granicama analitičkog merenja (2-3x)

# TESTIRANJE INTERFERENCE

- **Obaveza proizvođača testova** (detaljne informacije o interferencijama, koje su supstance i u kojoj konc. korišćene za simulaciju lipemije, dobijene konc. analita i nagib krive).
- -nedostatak interference (naznačiti najveću upotrebljenu konc. interferenta)
- -pojava interferencije (najmanja konc. interferenta koja izaziva interferenciju)
- (1) **Upoređivanje testirane metode sa referentnom metodom** (manje dostupna)
- Izračunavanje “biasa” između dve metode
- (2) **Obrada nativnog uzorka+ dodatak interferenta** u rastućim koncentracijama, izračunavanje “bias-a”
- **interferogram**: x-osa-rastuće konc. Interferenta, y-osa-nagibi krivih u poređenju sa nativnim uzorkom
- **Interferent**: - lipemični uzorci pacijenata
  - standardizovani rastvori lipida (**10%, 20%, Intralipid®**, Fresenius, Kabi AB, Uppsala, Sweden) (sojino ulje, žumance, fosfolipidi, glicerol, TG sa linolnom, oleinskom, palmitinskom, linolenskom i stearinskom kis.)
  - **nedostatak**: veličina čestica (200-600 nm) ne oponaša lipemiju izazvanu patofiz. procesima



# TESTIRANJE INTERFERENCIJE (2)

- **Značajan “bias”**- ( $2 \times SD$ ), ako je veća od analitičke greške instrumenta
- Upotreba “intraindividualnog” koeficijenta varijacije  $CV_w$  ( $0,5 \times CV_w$ )
- **Dozvoljeni “bias”** iz formule:  $I = CV_w - (1,96 \times CV_a - B)$   
 $CV_a$ =analitički koef. varijacije;  $B$ =nagib krive metode)
- **Prihvatljivi kriterijumi interference** nisu isti za sve analite već zavise od njihovih bioloških varijacija i analitičkih performansi metoda i aparata.
- Analitički značajne promene treba uporediti sa kliničkim relevantnim kriterijumima.
- **Neprihvatljivo je ranije korišćenje arbitražnih “cut-off” vrednosti** (npr. 10% ili 20%), već “evidence based” kriterijumi

# TESTIRANJE INTERFERENCIJE (3)

- Nisu svi podaci proizvođača potvrđeni u praksi:
  - Beckman-Coulter 11/24
  - Roche 20/23
  - Siemens 16/22

**Preporuka:** uraditi verifikaciju interferencije date od strane proizvođača, koristeći kriterijume prihvatanja “zasnovane na dokazima”

**Preporuka (2):** Svaka laboratorija mora imati pisanu proceduru za detekciju lipemije, otklanjanje interferencije i rezultatima ispitivanja lipemičnih uzoraka, kako bi standardizovali proceduru, smanjili greške i povećali sigurnost analitičkog određivanja.

