

Hemolizin Rutin Acil Biyokimya Testlerine Etkisi

The Effect of Hemolysis on Routine Emergency Biochemistry Tests

Türkan Yiğitbaşı*

Banu Aslan Şentürk*

Yasemin Baskın**

Mutlu Öney*

Fusun Üstüner*

* İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Biyokimya Kliniği, İzmir

** Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, İzmir

ÖZET

Amaç: Hemolizin preanalitik hata olarak laboratuvar test sonuçlarına etkisi ile ilgili yapılmış pek çok çalışma olmakla birlikte, çalışma koşullarına ve kullanılan metotlara bağlı olarak farklılık gösterebilen sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışma, acil servise başvuran hastalarda hemolizin kullandığımız rutin yöntemlere etkisini araştırmak ve hemoliz etkisini azaltmak amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hemolizat kullanılarak final hemoglobün konsantrasyonları 0-3060 mg/dl arasında değişen dokuz serum havuzu oluşturuldu. Elde edilen hemolizatın hemoglobün miktarı CELL-DYN 3700 tam kan sayımı cihazında (Abbott Diagnostic Systems, Illinois, USA) tespit edildi. Aynı gün serum havuzlarında glukoz, üre, kreatinin, aspartat amino transferaz, alanin amino transferaz, total bilirubin, direkt bilirubin, kreatinin kinaz, amilaz, kalsiyum, sodyum, potasyum ve klor testleri için rutin yöntemlerle ardışık test ölçümleri yapıldı (Architect C 8000, Abbott Diagnostic Systems, Illinois, USA). Hemoliz'in test sonuçlarına etkisi CLIA 88 kriterleri kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Biyokimyasal ölçüm sonuçlarına göre 187 mg/dl'ye kadar hemoglobün içeren serum örneklerinde hemolizin etkisi kabul edilebilir bulundu. 375 mg/dl hemoglobün konsantrasyonunda aspartat amino transferaz, alanin amino transferaz, direkt bilirubin, sodyum ve potasyum; 750 mg/dl Hb içeren serum örneklerinde ilave olarak glukoz, total bilirubin, klor; 1500 mg/dl Hemoglobün konsantrasyonunda üre ve kalsiyum ölçümlerindeki farklılığın kabul edilebilir değerlerin dışında olduğu saptandı.

Sonuç: Architect C 8000 otomatik analizöründe numune interferans indeksi salin protokolünün uygulanması ve bulduğumuz sonuçlara göre değerlendirmenin yapılmasının hemolizin test sonuçlarına etkisini azaltacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Acil servis, kanın kimyasal analizi, hemoliz

ABSTRACT

Objective: Although there have been many studies about the pre-analytic errors of hemolysis on laboratory tests, different results were found with different work environments and different methods. This study was put together to investigate the effects of hemolysis on routine methods performed to incoming emergency patients and to eliminate these effects.

Materials and Methods: Nine serum pools containing 0-3060 mg/dl final hemoglobün concentrations were formed using hemolysate. The amount of acquired hemoglobün of hemolysate was measured in

CELL-DYN 3700 hemogram analyze r (Abbott Diagnostic Systems, Illinois, USA). The same day routine tests were consecutively done on the serum pools including glucose, urea, creatinine, aspartate amino-transferase alanine amino-transferase, total bilirubine, direct bilirubine, creatine kinase, amylase, calcium, sodium, potassium, chloride tests (Architect C 8000, Abbott Diagnostic Systems, Illinois, USA). Effects of hemolysis on test results were evaluated using CLIA 88 criteria's.

Results: According to biochemical measurement results serum samples which included up to 187 mg/dl hemoglobin had acceptable hemolysis effects. Serum samples that had 350 mg/dl hemoglobin concentration aspartate amino-transferase, alanine amino-transferase, direct bilirubine, sodium and potassium measurements were outside of acceptable levels. Additionally, at 750mg/dl hemoglobin concentration blood glucose, total bilirubine and chloride; at 1500 mg/dl hemoglobin concentration blood urea and calcium tests measurements were out of bounds.

Conclusion: Using automatic analyzer Architect C 8000, after readaptations with our finding according to sample interference indices saline protocol would decrease the effect of hemolysis on test results.

Key Words: Emergency service, blood chemical analysis, hemolysis

GİRİŞ

Acil servisler diğer birimlerden farklı olarak, kritik hasta bakımı nedeniyle panik ve kargaşanın sık yaşandığı, hasta yoğunluğu yüksek birimlerdir. Bu çalışma koşulları hata sıklığını arttırmaktadır. Bu nedenlerle, acil servisler preanalitik hataların sık görüldüğü birimler arasında yer almaktadır (1).

Preanalitik hatalar klinik kimya testlerindeki varyasyonların ana kaynağıdır. Hemoliz; sonucun güvenilirliğini etkileyen en önemli preanalitik hata kaynağıdır (2). Bazı çalışmalar hemolizi en sık numune red nedeni olarak tanımlamışlardır (3). Hemolizli numuneler, uygun olmayan numune tanımına giren örneklerin %40-%70'ini oluşturur ve yetersiz numune, pıhtılı numune, doğru olmayan numune gibi diğer tanımlanan sebeplerden 5 kez daha fazla gözlenir (4,5). Hemoliz; hücre içeriğinden kaynaklı potasyum (K), laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat amino transferaz (AST) gibi plazma bileşenlerinde hatalı yükselmelere (6) ya da bazı laboratuvar metodlarında spektrofotometrik interferansa neden olarak test sonuçlarını etkiler (7).

Birçok laboratuvar hemolizli numuneyi gerekli olup olmadığını değerlendirmeksizin direkt olarak reddeder. Oysa yaygın olarak kullanılan biyokimyasal testlerin çoğu belli hemoliz derecelerine kadar kullanılan metoda bağlı olarak hemolizden etkilenmez (8). AST, Klor (Cl), K ve sodyum (Na) gibi bazı test sonuç-

larında ise neredeyse gözle görülemez durumdaki hemoglobin (Hb) düzeylerinde (serum Hb<60 mg/dl) bile klinik olarak anlamlı varyasyonlar gözlenmiştir (2).

Numune interferans indeksi; serum veya plazmada hemoglobin, bilirubin ve lipid varlığını kalitatif olarak değerlendirmeyi sağlayan kullanışlı bir bilgidir. Birçok klinik kimya platformları zaten bu seçenek ile donatılmıştır (9).

Red kriteri olarak en düşük tespit edilebilen Hb değerinin seçilmesi hemolizden dolayı numune reddinin evrensel kriteri olamaz (10). Bu değer gerekmediği halde bir çok numunenin reddine ve hasta sonuçlarının gecikmesine neden olacaktır. Ancak hemolitik numunelerin analitik ve klinik olarak idaresini tanımlayan kesin kurallar tanımlanmamıştır (2). Bu nedenle hemolizin kullandığımız rutin yöntemlere etkisini araştırmak, hemoliz etkisini analitik olarak mümkün olduğunca azaltmak ve klinik yorumun doğru yapılmasına katkı sağlamak amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

EDTA'lı tüpe alınan 6 ml kan örneği 5.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi ve plazma ayrılarak atıldı. Dipte kalan hücre paketi 8 ml serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve her yıkama işlemi sonrası 3 dakika 5.000 g'de santrifüj edilerek üst kısmı atıldı. Son yıkama sonrası santrifüj edilip yıkama solüsyonu ortamdan

uzaklaştırıldıktan sonra yıkanmış eritrosit paketi üzerine eşit hacimde distile su ilave edildi. Distile su ilave edilen eritrosit paketi daha sonra -40°C'de 20 dakika bekletilerek eritrositlerin patlaması ve hemoliz olmaları sağlandı. Örnekler 3 dakika 5.000 g'de santrifüj edilerek üstte kalan hemolizat ayrıldı (11). Elde edilen bu hemolizatın Hb miktarı CELL-DYN 3700 tam kan sayımı cihazında (Abbott Diagnostic Systems, Illinois, USA) tespit edildi. Hemolizat kullanılarak final Hb konsantrasyonları 0-3060 mg/dl arasında değişen 8 patolojik ve 1 normal olmak üzere 9 serum havuzu oluşturuldu. Aynı gün serum havuzlarında glikoz, üre, kreatinin, AST, alanin amino transferaz (ALT), total bilirubin (T.Bil), direkt bilirubin (D.Bil), kreatin kinaz (CK), amilaz, kalsiyum (Ca), Na, K ve Cl testleri için rutin yöntemlerle üçer kez, ardışık test ölçümleri yapıldı (Architect C 8000, Abbott Diagnostic Systems, Illinois, USA). Ölçüm ortalaması alındı. Hemoliz'in test sonuçlarına etkisi CLIA 88 kriterleri kullanılarak değerlendirildi (12).

BULGULAR

Hemoliz derecesi arttıkça hemolizden kaynaklanan interferansın etkisinin arttığı gözlemlendi.

Ölçüm sonuçlarına göre 187 mg/dl'ye kadar hemoglobin içeren serum örneklerinde hemolizin etkisi kabul edilebilir bulundu. 375 mg/dl Hb konsantrasyonunda AST, ALT, D.Bil., Na, ve K 750 mg/dl Hb içeren serum örneklerinde ilave olarak glukoz, T.Bil., Cl; 1500 mg/dl Hb konsantrasyonunda üre ve Ca ölçümlerindeki farklılığın kabul edilebilir değerlerin dışında olduğu saptandı (Tablo 1). Sonuçlar ayrıca ölçülen değer/ beklenen değer değişim oranı hesaplanarak verildi (Tablo 2). Hemoliz etkisinin T.Bil, D.Bil, Na, glukoz ve Cl ölçümlerinde orijinal değerlerden daha düşük; AST, ALT ve K değerlerinde orijinal değerlerden daha yüksek değerlerin saptanmasına neden olduğu gözlemlendi (Tablo 1). T.Bil, D.Bil, Na, AST ve K da gözlenen değişiklikler; değişikliğin yönüne ve şiddetine vurgu yapmak amacıyla ayrıca şekil olarak gösterildi (Şekil 1).

TARTIŞMA

Klinik laboratuvarların ve teknolojinin gelişmesi sonucu analitik fazda hata yapma oranı azalmıştır. Laboratuvarlarda gözlenen analitik hata oranı %7 iken preanalitik hata oranının %46 olduğu bilinmektedir. Bu da preanalitik fazda hata oranının azalmasına yönelik çalış-

Tablo 1. Hemolizin biyokimyasal testlere etkisi.

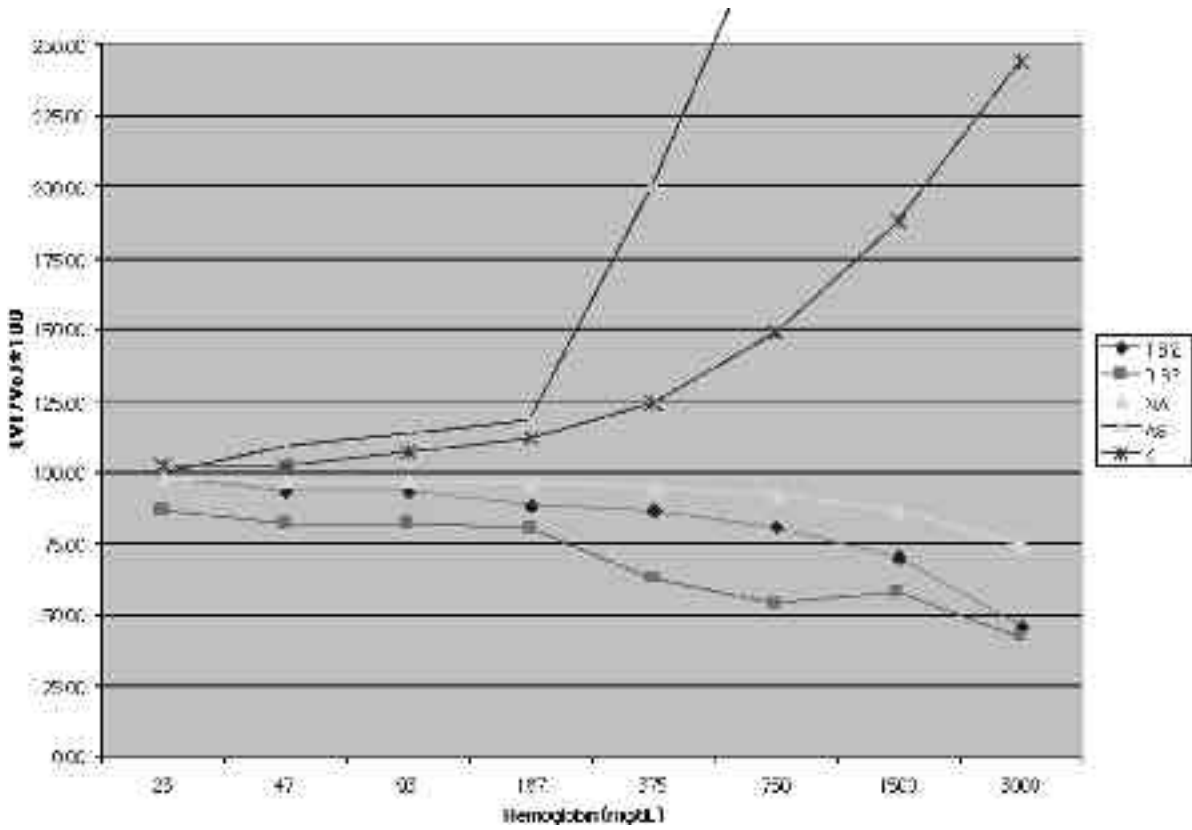
Ölçüm parametreleri	CLIA 88 Kabul Kriterleri	Hb (mg/dL)									
		0	23	47	93	187	375	750	1500	3060	
Glukoz (mg/dL)	±%10 ±6mg/dL	93#:	91	91	89	89	86	80&	74	55	
Üre (mg/dL)	±%9 ±2mg/dL	16	15	15	15	15	15	15	14&	14	
Kreatinin (mg/dL)	±%15 ±0.3 mg/dL	0.65	0.63	0.61	0.64	0.67	0.65	0.63	0.62	0.57	
AST (U/L)	±%20	22	22	24	25	26	44&	66	98	201	
ALT (U/L)	±%20	17	17	17	17	20	22&	22	23	30	
T Bil (mg/dL)	±%20 ±0.4 mg/dL	1.04	1.02	0.97	0.97	0.92	0.90	0.84&	0.73	0.48	
D Bil (mg/dL)	±%20	0.45	0.39	0.37	0.37	0.36	0.28&	0.24	0.26	0.19	
CK (U/L)	±%30	48	46	47	44	46	44	46	41	40	
Amilaz (U/L)	±%30	52	50	51	50	49	51	55	63	61	
Ca (mg/dL)	±1 mg/dL	8.9	8.8	8.7	8.7	8.6	8.4	8.1	7.8&	6.6	
Na (mmol/L)	±4 mmol/L	138	135	134	134	134	131&	127	120	103	
K (mmol/L)	±0.5mmol/L	4.1	4.2	4.2	4.4	4.6	5.1&	6.1	7.7	10	
Cl (mmol/L)	±%5	107	105	105	105	104	103	101&	98	89	

#: Sonuçlar ölçülen değerlerin ortalaması alınarak verilmiştir. &: CLIA-88 kriterlerine göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir.

Tablo 2. Hemolizin biyokimyasal testlere etkisinin değişim katsayısı olarak değerlendirilmesi.

Ölçüm parametreleri	Hb (mg/dL)							
	23	47	95	187	375	750	1500	3060
Glukoz	97.85#	97.85	95.70	95.70	92.47	86.02	79.57	59.14
Üre	93.75	93.75	93.75	93.75	93.75	93.75	87.50	87.50
Kreatinin	96.92	93.85	98.46	103.08	100.00	96.92	95.38	87.69
AST	100.00	109.00	113.60	118.00	200.00&	300.00	445.45	913.64
ALT	100.00	100.00	100.00	117.65	129.41	129.41	135.29	176.47
T Bil	98.08	93.27	93.27	88.46	86.54	80.77	70.19	46.15
D Bil	86.67	82.21	82.25	80.22	62.56	53.74	57.78	42.22
CK	95.83	97.92	91.67	95.83	91.67	95.83	85.42	83.33
Amilaz	96.15	98.08	96.15	94.23	98.08	105.77	121.15	117.31
Ca	98.88	97.75	97.75	96.63	94.38	91.01	87.64	74.16
Na	97.83	97.10	97.10	96.38	94.93	92.03	86.96	74.64
K	102.44	102.44	107.32	112.20	124.39	148.78	187.80	243.90
Cl	98.13	98.13	98.13	97.20	96.26	94.39	91.59	83.18

#: Sonuçlar $(Vf/Vo) \cdot 100$ (Değişim katsayısı) olarak verilmiştir, Vf: ölçülen değer, Vo: interferansız ölçülen orijinal değerdir, &: CLIA-88 kriterlerine göre izin verilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir.

**Şekil 1.** Hemolizin ölçülen bazı test parametrelerine etkisi.

maların artmasına neden olmuştur (13). Hemoliz preanalitik fazda gözlenen ve sonucun güvenilirliğini etkileyen en önemli varyasyon kaynağıdır (2).

Günümüzde hemolizden kaynaklı interferansın görsel olarak belirlenmesinin yetersiz olduğu, bu değerlendirmenin otomatik sistemler ile yapılmasının ve serum indeksinin rapor

edilmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır (14). Serum indekslerinin rutin laboratuvar pratiğinde kullanımı, sürecin standart hale getirilmesine katkıda bulunan kolay, hızlı ve ucuz bir uygulamadır. Farklı üreticiler arasında bazı farklılıklar olsa da bu sistemler serum ve plazmanın farklı dalga boylarındaki absorbanlarının ölçümüne dayanır (geleneksel olarak 340, 410, 470, 600 ve 670 nm) (15). Södenberg ve ark. (10) dan sonra hemolitik indeks (HI) ile ilgili ikinci çok merkezli çalışmanın sahibi olan Lippi et al. (16) da cihazların çoğu için HI konusunda karşılaştırılabilir sonuçların elde edildiğini göstermişlerdir. Ancak üreticiler tarafından belirlenen spesifik eşik değerleri belirgin olarak farklıdır. Bu sınırlar laboratuvar tarafından interferansın testleri etkileme derecesine göre değiştirilebilir (15).

Architect C 8000 otoanalizörü için HI sınırını belirlemek amacıyla yaptığımız çalışmada; hemoliz derecesi arttıkça hemolizden kaynaklanan interferansın etkisinin arttığı gözlemlendi (8,11,17). Diğer çalışmaların da desteklediği gibi interferans derecesi arttıkça T.Bil, D.Bil, Na, glukoz ve Cl ölçümlerinde kademeli olarak daha düşük değerler, AST, ALT ve K ölçümlerinde ise daha yüksek değerler tespit edildi (2,8,11).

Biyokimyasal ölçüm sonuçlarına göre 187 mg/dl'ye kadar Hb içeren serum örneklerinde hemolizin etkisi kabul edilebilir bulundu. 375 mg/dl Hb konsantrasyonunda AST, ALT, D.Bil., Na ve K; 750 mg/dl Hb içeren serum örneklerinde ilave olarak glukoz, T.Bil., Cl; 1500 mg/dl Hb konsantrasyonunda üre ve Ca ölçümlerindeki farklılığın CLIA 88 kriterlerinin kabul ettiği hata oranının (12) dışında olduğu saptandı. Literatürde hemolizin testlere etkisi konusundaki bulgular benzer olmakla birlikte analizlerin Hb konsantrasyonlarından etkilenme derecesi konusunda farklı değerlendirmeler bulunmaktadır (2,8,11).

Türkmen ve ark. (11) Olympus AU 600 otoanalizörü ile yaptıkları çalışmalarında 750

mg/dl Hb konsantrasyonunda D.Bil. ölçüm değerindeki değişimi; 1.500 mg/dl Hb içeren serum örneklerindeki T.Bil., AST ve K ölçüm değerindeki değişimi; kabul edilebilir değerlerin üzerinde bulmuşlardır. Bizim sonuçlarımıza göre bu test değerlerinin hemolizden kaynaklanan interferansın daha az etkilenmiş olduğu gözlenmektedir. Bu farklılığın nedeni interferansın derecesinin yöntem ve testin çalışıldığı cihaza göre değişmesi olabilir (18).

Yücel ve ark. (11) hemolizsiz, orta derece hemolizli ve ağır hemolizli olmak üzere üç gruba ayrılan 180 serumda; glukoz, üre, kreatinin AST, ALT, bilirubinler, amilaz, Ca testlerini de içeren bilinen pek çok testi çalışmışlardır. Bu testlerden yalnızca LDH, asit fosfataz ve K'un hemolizden önemli ölçüde etkilendiğini söylemiştir. Bu çalışmada ağır hemoliz 113.6 mg/dL olarak tanımlanmıştır. Diğer araştırmacılar ağır hemolizi 300 mg/dl üzerindeki Hb konsantrasyonu olarak kabul etmişlerdir (7,11). Dolayısıyla bu anlamda Yücel ve ark. (8)'nin bulguları bizim bulgularımızla örtüşmektedir.

Sonuç olarak acil servislerde ortaya çıkabilecek hemolizin test sonuçlarına etkisi, laboratuvar tarafından tespit edilen değerlerle HI modülünün kullanılması ile azaltılabilir ve Hb miktarının test sonuç raporunda belirtilmesi klinik yorumun doğru yapılmasına katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. Küme T, Şişman AR, Özkaya A, Çoker C. Acil servisten laboratuvara gönderilen örnekler için preanalitik hatalar. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2009; 7: 49-55.
2. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 311-6.
3. Dale JC, Novis DA. Outpatient phlebotomy success and reasons for specimen rejection. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 416-9.
4. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 764-72.

5. Jones BA, Calam RR, Howanitz PJ. Chemistry specimen acceptability. A College of American Pathologists Q-Probes study of 453 laboratories. Arch Pathol Lab Med 1997; 121: 19-26.
6. Pai SH, Cyr-Manthey M. Effects of hemolysis on chemistry tests. Lab Med 1991; 22: 408-10.
7. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed Specimens: A Reason for rejection or a clinical challenge? Clin Chem 2000; 4: 306-7.
8. Yücel D, Dalva K. İn Vitro Hemolizin rutin biyokimyasal testler üzerine etkileri. Turk J Resc Med Sci 1991; 9: 248-53.
9. Steen G, Vermeer HJ, Naus AJ, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CH. Multicenter evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assays. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 413-9.
10. Söderberg J, Jonsson AP, Wallin O, Grankvist K, Hultdin J. Haemolysis index – An estimate of preanalytical quality in primary health care. Clin Chem Lab Med 2009; 47:940–4.
11. Türkmen H, Serdar MA, Haşimi A, Cihan M, Kurt İ, Akman Ş ve ark. Hemoliz ve lipeminin biyokimyasal testlere etkisi ve lipemik etkinin uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. Gülhane Tıp Dergisi 2007; 49: 5-10.
12. Department of Health and Human Services. Clinical laboratory improvement amentments of 1988: final rules and notice. 42 CFR Part 493. The Federal Register 1992; 57: 7188-7288.
13. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. Clin Chem 1997; 43: 1348-51.
14. Simundic AM, Nikolac N, Ivankovic V, Ferenc-Ruzic D, Magdic B, Kvaternik M, et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? Clin Chem Lab Med 2009; 47: 1361-5.
15. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. Clin Chem 1989; 35: 837-9.
16. Lippi G, Luca Salvagno G, Blanckaert N, Giavarina D, Green S, Kitchen S et al. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. Clin Chem Lab Med 2009; 47: 934-9.
17. Yücel D, Dalva K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical tests. Clin Chem 1992; 38: 575-7.
18. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. J Clin Chem Biochem 1986; 24: 127-39.

Yazışma adresi:

Dr. Türkan Yiğitbaşı
İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
I. Biyokimya Kliniği, İzmir
E-posta: turkanyigitbasi@gmail.com
Tel : 0 232 245 26 36
