Klinički bolnički centar Osijek

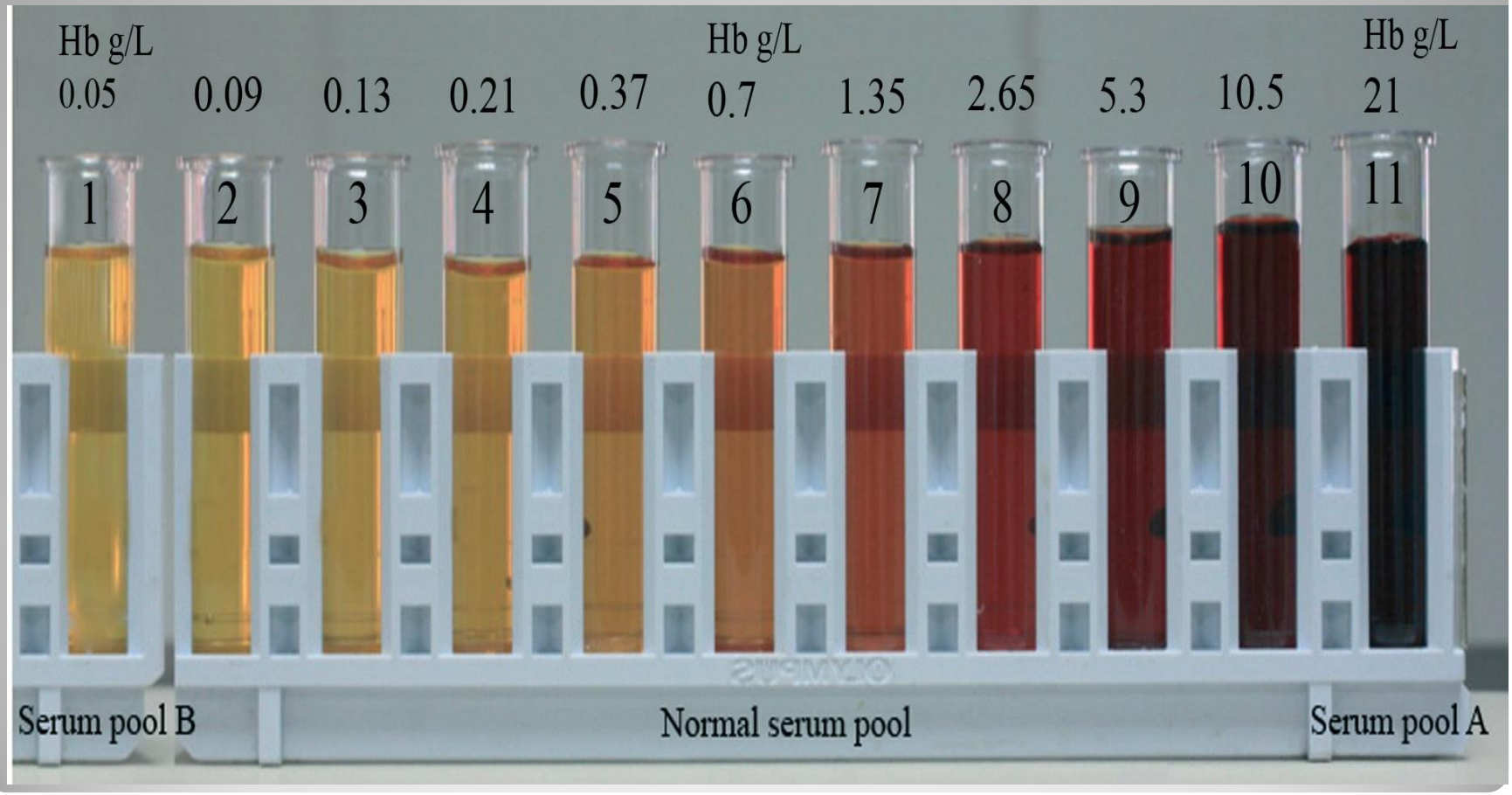
Automatizirana detekcija hemolize i njezina primjena u rutinskoj praksi

mag. Jasna Jonjić, spec. med. biokemije
Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku

Hemoliza

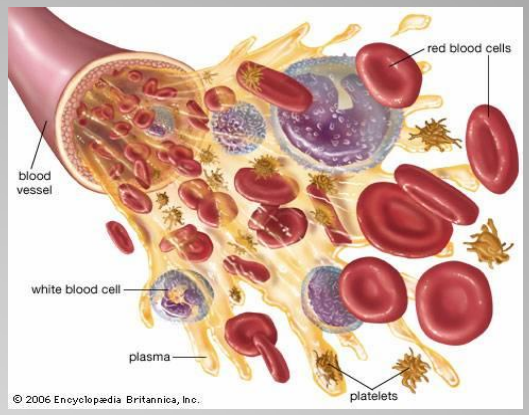
- Oslobađanje intracelularnog sadržaja iz eritrocita, leukocita i trombocita zbog oštećenja stanične membrane
- Vidljiva je kao crveno obojenje plazme (seruma) zbog izlaska hemoglobina iz eritrocita
- Vidljiva hemoliza se javlja kod koncentracije hemoglobina ~ 0,2-0,3 g/L ili kada je lizirano oko 0,5% eritrocita
- lipemija i ikterija povisuju granicu vizualne detekcije hemolize

Prikaz stupnjeva hemolize 0-21 g/L



IZVOR: Oğuzhan Özcan,Alparslan Karakaş,Doğan Yücel, Effects of hemolysis on the assays of serum CK, CK-MB activities and CK-MB (mass), troponin and myoglobin measurements, Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2012; 37 (4) ; 375–385

Kako dolazi do hemolize



IN VIVO

- Posljedica razaranja eritrocita u krvnoj žili (oko 3,2%)
- Uzroci (preko 50):
  - antitijela (autoantitijela, transfuzijska reakcija)
  - toksične supstance
  - lijekovi
  - nasljedni faktori (hemoglobinopatije, enzimopatije, membranopatije)
  - mehanički (umjetni zalisci), TTP
  - infekcije, HUS, DIK
  - HELLP

Kako dolazi do hemolize

IN VITRO

- Posljedica razaranja eritrocita u epruveti
- Uzroci:
  - Neadekvatna venepunkcija
    - Presnažna aspiracija iz krvne žile jer igla nije ušla u lumen, igla je malog promjera ili je slab protok krvi kroz krvnu žilu
    - Parcijalna ili potpuna obstrukcija venskog katetera
    - Vađenje krvi u špricu te istiskivanje krvi pod pritiskom u epruvete
    - Prejako stiskanje mjesta uboda kod kapilarnog uzorkovanja
    - Venepunkcija iz tanke ili fragilne vene
  - Snažno miješanje krvi nakon venepunkcije
  - Centrifugiranje na prevelikom broju okretaja kroz predugo vrijeme
  - Centrifugiranje nepotpuno koagulirane krvi
  - Neadekvatan tlak u epruvetama
  - Dilucija krvi hipotoničnim otopinama
  - Neadekvatan transport krvi

Kako razlikovati hemolizu in vivo i in vitro

IN VITRO:

- Crveno obojen serum (plazma) te istovremeni porast AST, LDH i kalija, dok koncentracija haptoglobina i retikulocitni indeks ostaju normalni

IN VIVO:

- Boja seruma varira od normalne žute, crvene do crveno-smeđe, snižen je haptoglobin, povećani LDH, AST, dok je koncentracija kalija normalna. Ukoliko ovo stanje traje više od 24 sata doći će do povećanja koncentracije indirektnog bilirubina, a nakon 48 sati i do rasta retikulocitnog indeksa

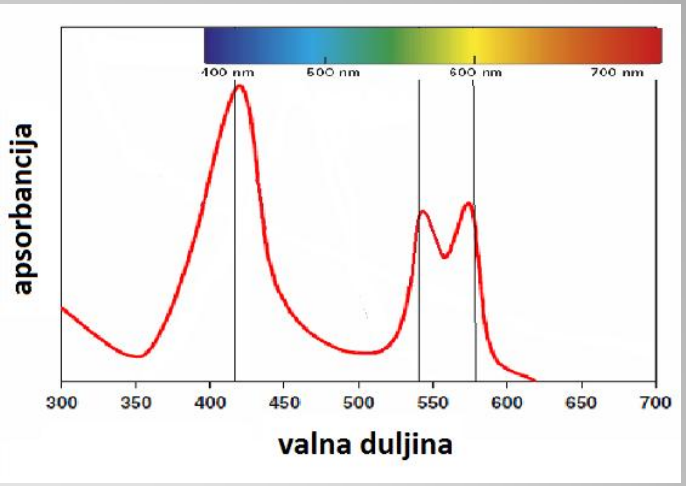
Mehanizam utjecaja hemolize na laboratorijske testove

- Lažno povećanje koncentracije analita čija je koncentracija inrtacelularno znatno veća (AST, LDH, K, NSE)
- Efekt dilucije (Na, Cl)
- Oslobađanje tromboplastinskih tvari (utjecaj na koagulacijske testove)
- Proteoliza zbog oslobađanja proteaza
- Oslobađanje drugih tvari koje izravno utječu na kemijske reakcije određeivanja analita (adenilat kinaza – CK)
- Utjecaj na elferogram – pojava dodatnih frakcija
- Analitička interferencija

Mehanizam utjecaja hemolize na laboratorijske testove – analitičke interferencije

Spektrofotometrija:

- Uslijed povećanja apsorbancije zbog prisustva hemoglobina
- Povećanje “blank” vrijednosti uzorka



→ kod testova koji se mjere na valnim duljinama 415, 540, 570 nm

Kemijska interferencija samog hemoglobina (peroksidativno djelovanje)

Mehanizam utjecaja hemolize na laboratorijske testove – analitičke interferencije

Imunokemijski testovi:

- Intracelularni proteini, enzimi, stanični detritus se vežu s manje specifičnim antitijela (križna – reaktivnost)
- Inhibicija antitijela
- Utjecaj na reakciju detekcije u metodi (pozitivan i negativan učinak)

Table 1 Laboratory parameters affected by haemolysis and/or blood cell lysis in the specimen.

Parameter	Bias	Cause
Adrenocorticotropic hormone	Negative	Proteolysis
Activated partial thromboplastin time	Negative	Release of thromboplastic substances
Antithrombin	Negative	Analytical interference
Aspartate aminotransferase	Positive	Cellular release
Alanine aminotransferase	Positive	Cellular release
Albumin	Negative	Dilution
Alkaline phosphatase	Negative	Analytical interference
Bilirubin (neonatal)	Variable	Analytical interference
Bilirubin (total)	Negative	Analytical interference
Calcitonine	Positive	Proteolysis
Chloride	Negative	Dilution
Cortisol	Negative	Analytical interference
Creatine kinase	Positive	Analytical interference
Creatinine	Positive	Analytical interference
D-dimer	Positive	Release of thromboplastic substances
Fibrinogen	Negative	Release of thromboplastic substances
Folate	Positive	Cellular release
γ-Glutamyltransferase	Negative	Analytical interference
Gastrin	Negative	Proteolysis
Glucagon	Negative	Proteolysis
Glucose	Negative	Dilution
Haptoglobin	Negative	Analytical interference
Homocysteine	Negative	Analytical interference
Insulin	Negative	Proteolysis
Iron	Positive	Analytical interference
Lactate dehydrogenase	Positive	Cellular release
Lipase	Positive	Analytical interference
Magnesium	Positive	Cellular release
Parathormon	Negative	Proteolysis
Phosphorus	Positive	Cellular release
Potassium	Positive	Cellular release
Prostate specific antigen	Positive	Analytical interference
Prothrombin time	Positive	Release of thromboplastic substances
Sodium	Negative	Dilution
Urea	Positive	Cellular release
Testosterone	Negative	Analytical interference
Troponin I	Positive	Analytical interference
Troponin T	Negative	Analytical interference
Vitamin B12	Negative	Analytical interference

IZVOR: Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, et al. *Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories*. Clin Chem Lab Med. **2008**;46(6):764–772

Detekcija hemolize u kliničkom laboratoriju

Vizualna

- Nedovoljno osjetljiva

→ drugi kromogeni i zamućenje uzorka smanjuju granicu detekcije

- Velika nepreciznost
- Nemogućnost standardizacije
- Niska reproducibilnost:

→ ovisi o “oku” i iskustvu laboratorijskog osoblja

Detekcija hemolize u kliničkom laboratoriju

Automatizirana

- Sustavi za procjenu inteferencija u uzorcima na modernim analizatorima
  - ➢hemoliza, ikterija, lipemija (LIH, HIL)
- Temelji se na mjerenju apsorbancije na više valnih duljina
- Semikvantitativna procijena hemolize

→ ***indeks hemolize***

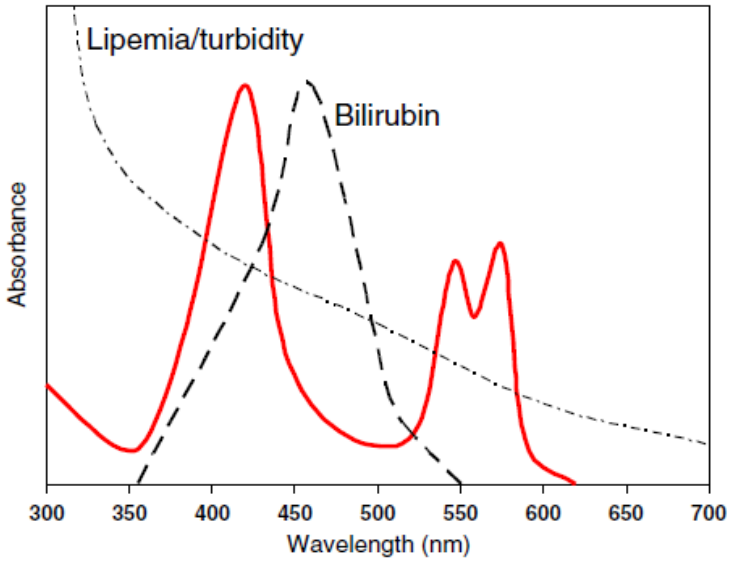
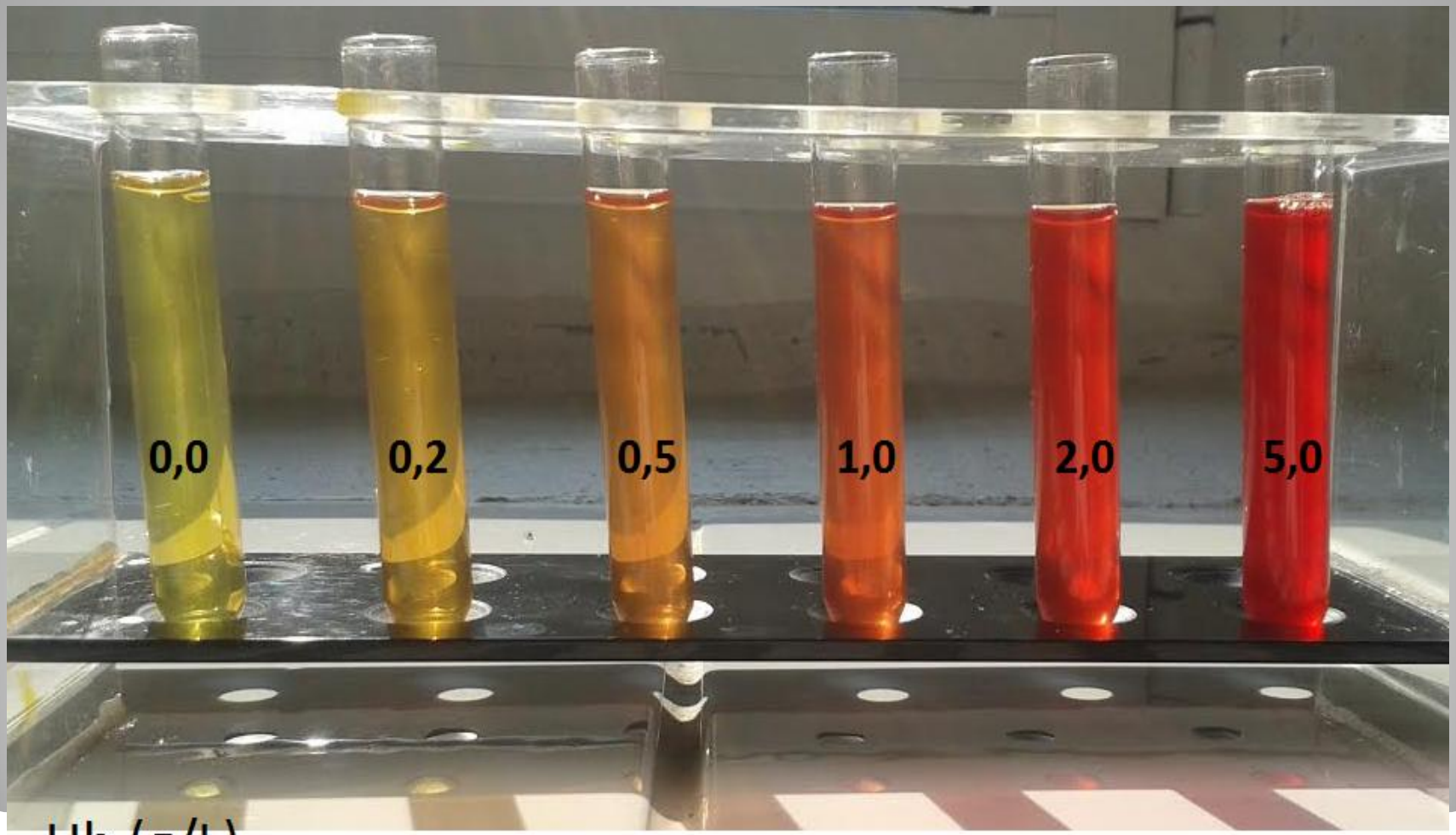


Fig. 1. Absorbance spectrum of hemoglobin [red]. Bilirubin and lipemia/turbidity spectra are also depicted [dotted lines] to show overlapping of the spectra that may affect the serum index testing.

IZVOR: Dolci A, Panteghini M.Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? Clin Chim Acta. 2014 May 15; 432:38-43.

Prikaz stupnjeva hemolize 0-5 g/L



Hb (g/L)

Prednosti automatizirane detekcije hemolize

- Objektivnija i točnija metoda
- Niska nepreciznost (0,1 - 2,7 % → mjerena u triplikatu na 4 različite analitičke platforme)
- Povezivanje s LIS-om i jednostavno praćenje
- Moguće postavljanje kriterija kojim se definira kod kojeg stupnja hemolize dolazi do značajne interferencije → ODBIJANJE UZORKA ILI ANALIZE
- Implementacija kriterija za odbijanje analize ili uzorka direktno u LIS (ili na analizator – ovisno o softwareu)
- Posebno pogodna za velike sustave gdje su predanalitika i analitika povezane → otkrivanje hemolize u “realnom vremenu”

Nedostaci automatizirane detekcije hemolize

- LIH test često ne ovisi samo o nivou interferencije već ovisi i o koncentraciji mjerenog analita
- Jake lipemije mogu utjecati na povećavanje rasipanja svjetlosti uzrokovati lažno povećanje indeksa hemolize
- Vrlo visoke koncentracije bilirubina (> 1000 µg/L) mogu lažno povisiti indeks hemolize
- **Neharmoniziranist izvedbe na različitim analitičkim analizatorima**
  - Različit volumen uzorka i diluenta
  - Različita vrsta diluenta
  - Različite valne duljine čitanja
  - Račun određivanja koncentracije
  - Različito područje mjerenja
  - Neusporedivost graduiranja indeksa hemolize

Mjerne karakteristike indeksa hemolize na različitim analizatorima

Table 1
Characteristics of hemolysis index [HI] test parameters on different commercial platforms.

Company/platform	Interferent material used	Maximum concentration of hemoglobin tested [g/l]	Sample volume for HI testing [µl]	Diluent type [volume] [µl]	Read wavelengths [nm]	HI report
Abbott Architect	Fresh erythrocyte hemolysate	20	5.3	Saline [200]	572/604; 628/660	5 levels
Beckman Coulter AU	Fresh erythrocyte hemolysate	5	2.0–1.6	Saline [150]	410/480; 600/800	6 levels
Beckman Coulter Synchron	Fresh erythrocyte hemolysate	5	14	Tris buffer pH 7.6 [200]	340, 410, 470, 600, 670	11 levels
Ortho Vitros	Fresh erythrocyte hemolysate	5–10	35[a]	Undiluted	522/750	Concentration units
Roche Cobas & Integra	Fresh erythrocyte hemolysate	10	6	Saline [150]	570/600	Absolute numbers [range: 1–1000]
Siemens Advia	Fresh erythrocyte hemolysate	5.25	5	Saline [100]	571/596	5 levels
Siemens Dimension	Fresh erythrocyte hemolysate	10	10	Water [150]	405/700	8 levels
Recommended[b]	Fresh erythrocyte hemolysate	10	The lowest yielding an accurate measurement	Not giving rise to paraprotein precipitation	Detection methods should account for the absorbance spectrum overlap of hemoglobin, bilirubin and lipemia/turbidity	Concentration unit or absolute number

[a] HI analysis does not consume the sample.
[b] According to the Clinical and Laboratory Standards Institute document C56-A [5].

IZVOR: Dolci A, Panteghini M.Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? Clin Chim Acta. 2014 May 15; 432:38-43

Usporedba mjernih karakteristika Beckman Coulter AU i Siemens Dimension

		Beckman Coulter AU		Siemens Dimension	
Diluent	Vrsta	0,9 % NaCl		Voda	
	Volumen	1,6-2,0 µL		10 µL	
Valne duljine		410/480 600/800		405/700	
Indeks hemolize		N	< 0,5 g/L	1	< 0,25 g/L
		1	0,5 - 0,99 g/L	2	0,25 - 0,5 g/L
		2	1,0 - 1,99 g/L	3	0,5 - 2,0 g/L
		3	2,0 - 2,99 g/L	4	2,0 - 3,0 g/L
		4	3,0 – 4,99 g/L	5	3,0 - 5,0 g/L
		5	> 5,0 g/L	6	5,0 - 10,0 g/L

Prikaz usporednog određivanja indeksa hemolize na analizatorima Siemens Dimension ExL i Beckman Coulter AU680

	HI Beckam Coulter AU	HI Siemens Dimension	koncentracija	koncentracija
1	1	3	0,5 - 0,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
2	ABN	2		0,25 - 0,5 g/L
3	ABN	2		0,25 - 0,5 g/L
4	ABN	2		0,25 - 0,5 g/L
5	3	3	2,0 - 2,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
6	2	3	1,0 - 1,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
7	3	4	2,0 - 2,99 g/L	2,0 - 3,0 g/L
8	4	4	3,0 - 4,99 g/L	2,0 - 3,0 g/L
9	4	5	3,0 - 4,99 g/L	3,0 - 5,0 g/L
10	2	3	1,0 - 1,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
11	2	3	1,0 - 1,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
12	4	5	3,0 - 4,99 g/L	3,0 - 5,0 g/L

	HI Beckam Coulter AU	HI Siemens Dimension	koncentracija	koncentracija
13	2	3	1,0 - 1,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
14	3	4	2,0 - 2,99 g/L	2,0 - 3,0 g/L
15	3	4	2,0 - 2,99 g/L	2,0 - 3,0 g/L
16	1	3	0,5 - 0,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
17	1	3	0,5 - 0,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
18	1	2	0,5 - 0,99 g/L	0,25 - 0,5 g/L
19	ABN	6		5,0 - 10,0 g/L
20	ABN	2		0,25 - 0,5 g/L
21	1	3	0,5 - 0,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L
22	ABN	6		5,0 - 10,0 g/L
23	3	4	2,0 - 2,99 g/L	2,0 - 3,0 g/L
24	2	3	1,0 - 1,99 g/L	0,5 - 2,0 g/L

Postavljanje granice za odbijanje uzorka/analize

Proizvođači reagensa:

- Interferencija se smatra značajnom kada je razlika rezultata u uzorku bez utjecaja hemolize i s utjecajem hemolize veća od 10% za većinu analita

BOLJE:

Utvrđivanje granice s obzirom na:

- vrstu analita
- njegovu koncentraciju,
- širinu referentnog intervala
- metodu mjerenja
- biološku varijabilnost analita

OLYMPUS

Your Vision, Our Future

Effect of Interference

Flag	Icterus (ICT)	Effect	Haemolysis (HEM)	Effect	Lipaemia (LIP)	Effect
+	ACP-P OSR6x01	↑	AST OSR6x09	↑	Glucose STAT OSR6x40	↑
	Uric Acid OSR6x36	↓	Bilirubin-D OSR6x11	↓	Iron OSR6x86	↑
			Bilirubin-T OSR6x12	↓	Lipase OSR6130	↑
			CK-MB OSR6x53	↑		
			CK-MB OSR6x155	↑		
			HBDH OSR6x29	↑		
			Iron OSR6x86	↑		
			LDH OSR 6x26	↑		
			LDH OSR 6x28	↑		
			Potassium	↑		
++	Cholesterol OSR6x16	↓	ALP OSR6x03	↓	Calcium Arsenazo III OSR6176	↑
	Glucose-STAT OSR6x40	↓	CK-NAC OSR6x79	↑		
			Magnesium OSR6x89	↑		
+++	Lactate OSR6x93	↓	Amylase OSR6x06	↓	Apo B OSR6x43	↓
	Lipase OSR6x30	↓	Chloride	↓		
	Total Protein OSR6x32	↓	Sodium	↓		
	Urea/BUN OSR6x34	↓	Total Protein OSR6x32	↑		
	Triglyceride OSR6x33	↓				
++++	ALP OSR6x04	↑	ACP-P OSR6x01	↑	Ferritin OSR6x50	↑
	Amylase OSR6x06	↑	Cholesterol OSR6x16	↑	Ferritin OSR6x138	↓
	CK-MB OSR6x53	↑	Glucose-STAT OSR6x40	↓	Glucose OSR6x21	↓
	Glucose OSR6x21	↑	Inorg. Phosphorus OSR6x22	↑	LDL Cholesterol OSR6x83	↑
	Magnesium OSR6x89	↑	Uric Acid OSR6x36	↓	IgM OSR6x46	↓
+++++	All remaining rgts.	Unknown	all remaining rgts.	Unknown	all remaining rgts.	Unknown

This information will not be included in the IFU and on the web but will be provided by OLMEI via PIU!

Connect with the Next Generation

Lippi i suradnici 2006. godine:

Deirable bias < $0,25*(CV_I^2+CV_G^2)^{½}$

Table 2 Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing: mean coefficient of variation (CV) (n = 12) determined from the reference specimen (no lysis) and each one of the homologous eight samples containing scalar dilutions of free serum hemoglobin.

Analyte	Desirable bias, %	Free serum hemoglobin							
		0.16 g/L	0.3 g/L	0.6 g/L	1.3 g/L	2.6 g/L	5.1 g/L	10.3 g/L	20.6 g/L
Albumin, g/L	±1.3	0.2%	0.4%	0.4%	0.6%	0.7%	0.7%	1.3%	3.1%
Alkaline phosphatase, U/L	±6.4	0.2%	0.5%	1.0%	1.6%	4.8%	9.9%	18.7%	36.9%
Alanine aminotransferase, U/L	±12.0	0.8%	3.2%	2.6%	3.0%	5.9%	8.1%	15.2%	26.1%
Aspartate aminotransferase, U/L	±5.4	2.1%	5.6%	10.5%	17.3%	29.4%	45.5%	62.3%	77.0%
Bilirubin (total), μmol/L	±10.0	0.3%	1.2%	1.0%	2.9%	3.0%	1.8%	3.3%	3.9%
Calcium, mmol/L	±0.8	0.3%	0.2%	0.3%	0.3%	0.4%	0.3%	0.3%	0.3%
Chloride, mmol/L	±0.5	0.0%	0.2%	0.4%	0.4%	0.6%	0.7%	0.9%	1.4%
Creatine kinase, U/L	±11.5	1.1%	1.6%	3.4%	6.0%	11.6%	21.3%	36.2%	54.3%
Creatinine, μmol/L	±3.4	0.8%	0.8%	0.9%	0.7%	2.1%	2.8%	3.0%	3.6%
γ-Glutamyltransferase, U/L	±10.8	2.5%	3.2%	3.4%	4.1%	6.0%	7.9%	10.2%	22.0%
Glucose, mmol/L	±2.2	0.2%	0.1%	0.3%	0.1%	0.1%	0.3%	0.5%	0.7%
Iron, μmol/L	±8.8	0.3%	0.7%	0.7%	1.0%	2.3%	5.0%	10.2%	20.7%
Lactate dehydrogenase, U/L	±4.3	4.4%	8.0%	14.4%	24.0%	37.7%	56.2%	69.8%	83.7%
Lipase, U/L	±10.1	0.0%	0.3%	1.0%	3.8%	10.2%	15.8%	20.8%	23.0%
Magnesium, mmol/L	±1.8	0.2%	0.3%	0.7%	0.9%	1.1%	1.7%	3.3%	5.5%
Phosphorus, mmol/L	±3.2	0.4%	0.6%	0.5%	0.9%	1.4%	2.7%	5.1%	9.9%
Potassium, mmol/L	±1.8	0.4%	0.7%	1.6%	3.0%	6.1%	11.8%	21.4%	36.1%
Sodium, mmol/L	±0.3	0.2%	0.3%	0.4%	0.5%	0.7%	0.8%	1.3%	2.4%
Urea nitrogen, mmol/L	±5.5	1.0%	1.1%	0.9%	0.7%	0.7%	1.6%	1.9%	4.3%
Uric acid, μmol/L	±4.8	0.3%	0.4%	0.4%	0.5%	0.7%	1.6%	2.6%	5.4%

Values are compared with current analytical quality specifications for desirable bias (15).

IZVOR: Lippi G., et.al.: Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing.Clin Chem Lab Med.2006;44(3):311-316

2012 godine CLSI dokument C56-A:
Hemolysis, Icterus, and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratory Analysis; Approved Guideline

→ dokument koji donosi važne informacije o mehanizmu interferncije hemolize, ikterije, lipemije - zamućenosti (HIL), indeksima interferencije, automatiziranim sustavima detekcije – interpretacija, značenje, ograničenja, verifikaciji sustava.

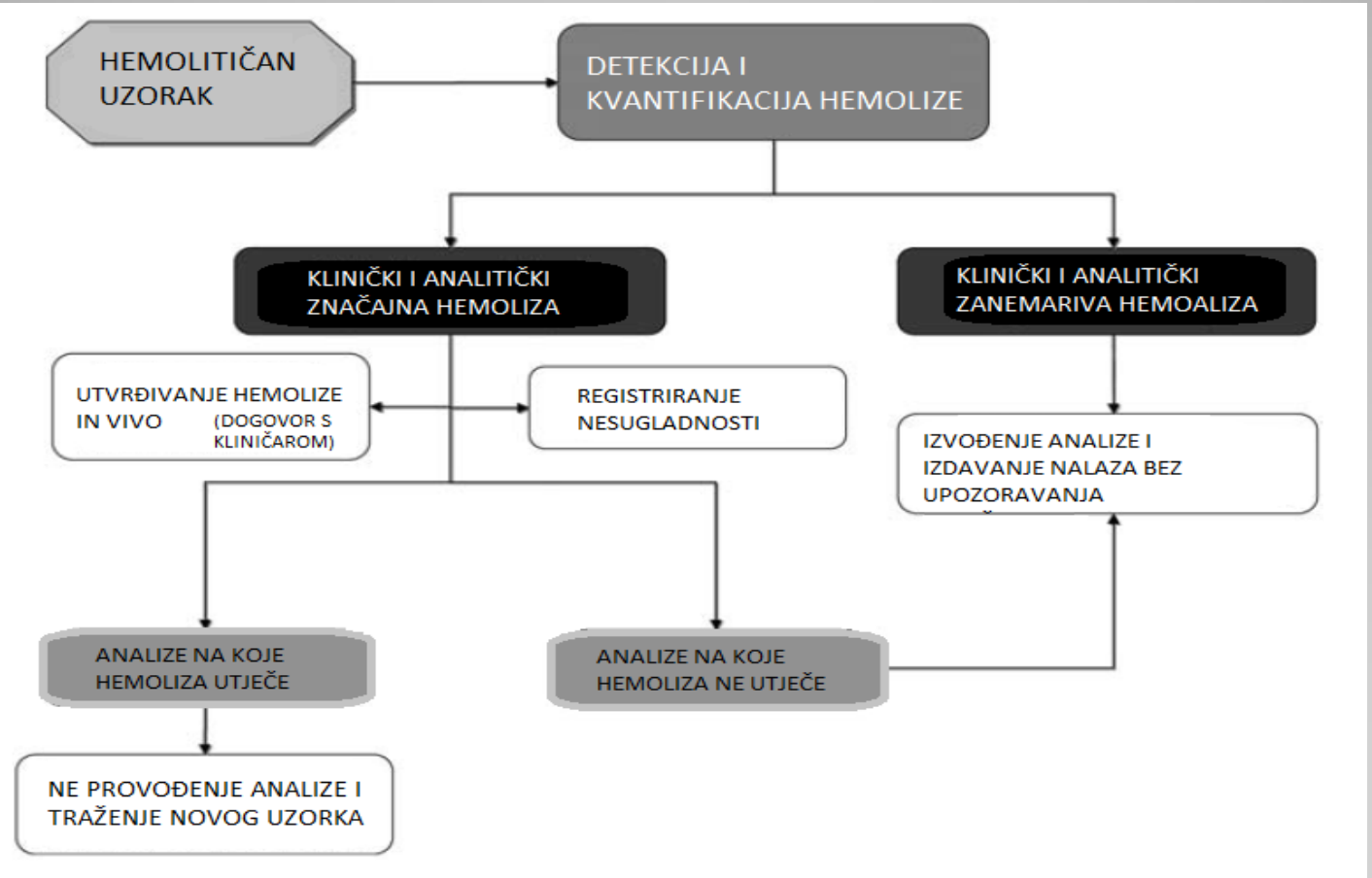
IFCC radna grupa za dozvoljene pogreške i sljedive rezultate

- Kriteriji za granice prihvatljivosti mjernih grešaka za kalibracijske materijale i za rezultate mjerenja uzoraka pacijenata:

→ konsenzus kliničko - laboratorijskih stručnjaka

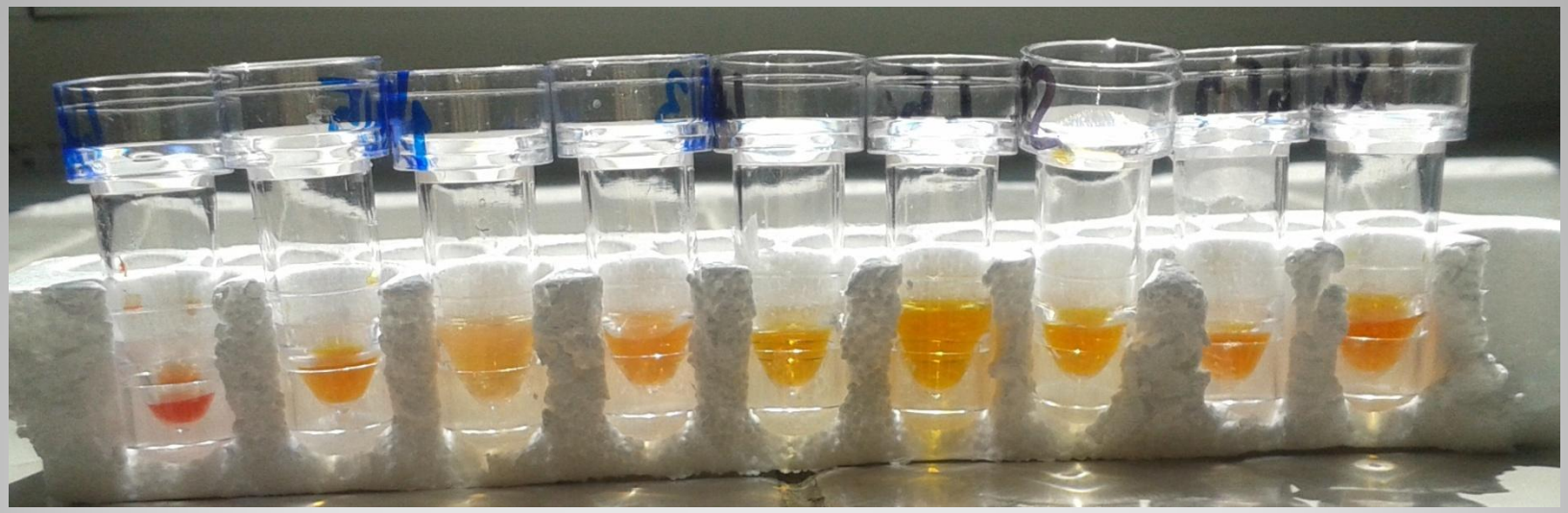
- Svi definirani limiti moraju se bazirati na biološkoj varijaciji, ako ne postoje dogovoreni analitički ciljevi temeljeni na kliničkim ishodima

Algoritam za identifikaciju i postupanje s hemolitičnim uzorcima



IZVOR: Dolci A, Panteghini M.Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? Clin Chim Acta. 2014 May 15; 432:38-43

PRAKSA OKLD Osijek
Vizualna procjena kapilanih neonatoloških uzoraka



UZORAK	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Iktreija	ABN	2	0	0	1	2	2	2	2
Hemoliza	ABN	1	1	1	1	0	0	1	1

Utvrđivanje pouzdanosti vizualne procjene hemolize u kapilarnim uzorcima pacijenata dojenačke dobi u odnosu na automatizirani LIH test

- 52 kapirarna uzorka seruma dojenčadi starosti do mjesec dana
- vizualno utvrđivano prisustvo hemolize od strane laboratorijskog osoblja
- analiziranje uzoraka semikvantitativnim LIH testim na analitaroru Beckman Colulter AU 680.

Tablični prikaz usporedbe utvrđivanje hemolize u izrvima prema stupnju hemolize

	VIZUALNO	LIH
N	21+10	21
1+	3	9
2+	9	13
3+	4	4
4+	5	5

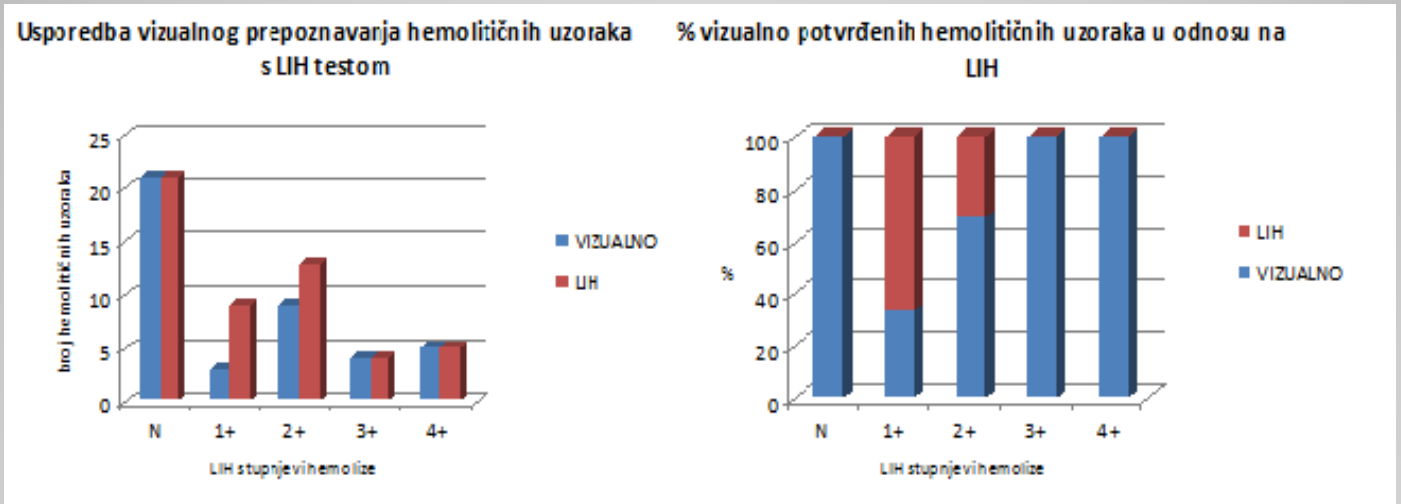
Rezultati:

Vizualni pregled:

- hemoliza u 21 uzorku ili u 40,3%

LIH test:

- hemoliza u 31 uzorku ili u 59,6%



→ najveće neslaganje: hemolize 1+ (0,5 - 0,99 g/L) od 66,7%
hemoliza 2+ (1,0 – 1,99 g/L) od 30,8%

Zaključci:

- Automatizirana procjena hemolize pouzdanija tehnika za utvrđivanje hemolize u uzorcima
- Potreban dogovor struke o načinu postupanja s hemolitičnim uzorcima
- Važno dobro odrediti graničnu vrijednost hemolize za odbijanje/prihvaćanje uzorka za svaku pojedinu analizu i metodu prema kriterijima biološke varijabilnosti
- Potreban dogovor struke i proizvođača analizatora o svim karakteristikama indeksa interferencije i harmonizacija

REFERENCE:

1. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor, eJIFCC vol 13 no 4
2. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med. 2008;46(6):764–772
3. Özcan O, Karakaş A, Yücel D. Effects of hemolysis on the assays of serum CK, CK-MB activities and CK-MB (mass), troponin and myoglobin measurements, Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2012; 37 (4) ; 375–385
4. Šimundić AM, Nikolac N, Ivanković V, 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.
5. Dolci A, Panteghini M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? Clin Chim Acta. 2014; 432:38-43.
6. Fritz ML.: Performance Characteristics of the HILspecimen quality feature on the Dimension RxL Max clinica chemistry system. Siemens Technical bulletin, 2010.
7. Beckman Coulter: Clinical chemistry reagent guide, Version 19, B06284 DVD Version 19
8. Lippi G., et.al.: Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing.Clin Chem Lab Med.2006;44(3):311-316
9. Jonjić J, Marković I , Šerić V, Utvrđivanje pouzdanost vizualne procjene hemolize u kapilarnim uzorcima pacijenata dojenačke dobi u odnosu na semikvanitativni fotometrijski test LIH. Posterski rad, Lokus 2015.