

Kvörðun rauðkornarofsvísis á Vitros 5.1 FS efnagreini



**GYÐA HRÖNN
EINARSDÓTTIR**

Höfundur er lífeindafræðingur MS á rannsóknarkjarna, blóðmeina- og klínískri lífefnafræði, RLSH gydahr@landspitali.is

Leiðbeinendur og meðhöfundar:

Gunnlaug Hjaltadóttir lífeindafræðingur MS á rannsóknarkjarna, blóðmeina- og klínískri lífefnafræði, RLSH ghjalta@landspitali.is

Ingunn Þorsteinsdóttir lækni, sérfræðingur í klínískri lífefnafræði á rannsóknarkjarna, blóðmeina- og klínískri lífefnafræði, RLSH ingunnth@landspitali.is

Greinin er byggð á hluta ritgerðar til meistaraþrófs í lífeindafræði og var lögð fram til varnar við læknaeild HÍ í janúar 2014.

Ágrip

Inngangur: Rauðkornarof í sermissýnum hefur verið notað sem ábending um gæði forgreiningarfasa í heildarrannsóknarferli lífefnarannsóknna, bæði vegna þess að það er algengasti skekkjuvaldur í ferlinu en einnig vegna þess að nýjar rannsóknir benda til þess að með tilkomu sjálfvirkra efnagreina sem mæla rauðkornarof sé með áreiðanlegum hætti hægt að nýta tíðni þess sem gæðavísi fyrir forgreiningarfasa. Sermissýni með rauðkornarofi hafa alltaf verið vandamál klínískra rannsóknarstofa og rannsóknir hafa sýnt fram á að jafnvel sermissýni sem eru með mjög litlu rauðkornarofi eru óhæf til mælinga á ýmsum lífefnum.

Efni og aðferðir: Öll sermissýni með rauðkornarofi sem búrast rannsóknarkjarna, blóðmeina- og klínískri lífefnafræði, á rannsóknarsviði Landspítala (RK) í Fossvogi frá 7.–11. janúar 2012 voru mæld með þremur greiningaraðferðum. Mældur var rauðkornarofsvísir (RV) (hemolysis index) á Vitros 5.1 FS efnagreini og magnmælingar á fríum blóðrauða (hemoglobin) gerðar á Plasma/LowHb efnagreini og með aðlagðri Drabkin's-aðferð.

Niðurstöður: Greiningaraðferðir RK eru samþærilegar og tengslum þeirra má lýsa með eftirfarandi jöfnu: $y=0,0139x-0,0181$ þar sem x er niðurstaða RV og y er niðurstaða mælingar með Plasma/LowHb-aðferð í g/L. Frír blóðrauði 1,0 g/L samsvarar því RV 73 á Vitros 5.1 FS efnagreini.

Ályktun: Þar sem niðurstöður þessarar rannsóknar eru frábrugðnar öðrum rannsóknum sem birtar hafa verið um kvörðun RV Vitros 5.1 FS þarf sérhver klínísk rannsóknarstofa að sannprófa efnagreina og setja fram eigin verklagsreglur og leiðbeiningar til starfsmanna um hvernig meðhöndla skuli sermissýni með rauðkornarofi miðað við þá efnagreina sem eru í notkun.

Lykilorð: Blóðrauði, rauðkornarof, rauðkornarofsvísir, kvörðun.

English Summary

Einarsdóttir GH, Hjaltadóttir G, Þorsteinsdóttir I.
The Icelandic Journal of Biomedical Scientists 2014; 8 (1): 40-46.

Calibration of Hemolysis Index on Vitros 5.1. FS analyzer

Background: Hemolysis in serum samples has been used as a quality indicator of the pre-analytical phase of the total testing process, both because it is the most common preanalytical error and because analyzers can now detect quantity of hemolysis with enough reliability. Hemolyzed serum samples are a problem for clinical laboratories and even samples with small amount of hemolysis are unsuitable for many analytical measurements in clinical chemistry.

Methods: All hemolyzed serum samples received by the Clinical Core Laboratory (CCL) of Landspítali (The National University Hospital of Iceland) in Fossvogur from 7th-11th January 2012 were measured with three different analytical methods. Hemolysis index (HI) was measured on Vitros 5.1. FS analyzer and free hemoglobin was measured on Plasma/LowHb analyzer and with modified Drabkin's method.

Results: The study shows that the methods used in CCL to detect hemolysis in serum samples are comparable and the relationship can be described by the following equation: $y=0.0139x-0.0181$; where x is the results of the HI and y is the result of Plasma/LowHb measurement in g/L. Free hemoglobin concentrate of 1.0 g/L corresponds to HI of 73 on Vitros 5.1. FS analyser.

Conclusions: Since the results of this study do contradict previous calibrations published on the HI on Vitros 5.1 FS analyzer it indicates that each clinical laboratory needs to verify HI of their analyzers and determine own procedures and directions regarding hemolyzed serum samples based on the analyzers in use.

Keywords: Hemoglobin, hemolysis, hemolysis index, calibration.

Inngangur

Rauðkornarof

Rauðkornarof er skilgreint sem frír blóðrauði (hemoglobín) í sermi með styrk yfir 0,3 g/L (4,65 mól/L) sem gefur rauðleitan blæ sem verður sýnilegur í sermissýnum þegar styrkurinn fer yfir 0,6 g/L. Rauðkornarof getur bæði átt sér stað *in vitro* og *in vivo* og er mjög óæskilegt ástand sem hefur áhrif á áreiðanleika og næmni lífefnarannsóknna [1]. Frír blóðrauði í sermi veldur skekkjuáhrifum og getur truflað mælingar lífefnarannsóknna á þrjá vegu [2]: (i) Blóðrauði og önnur innanfrumuefni streyma út í sermi/plasma þar sem þau valda falskri hækkun við mælingu lífefnis vegna mikillar hækkunar á þéttni eða falskri lækkun vegna þynningaráhrifa; (ii) truflun í greiningaraðferð af ljósfræðilegum toga eða (iii) efnafraðilegar truflanir vegna áhrifa á ýmis efnahvörf sem tengjast greiningaraðferð. Þær skekkjur sem fram koma við greiningu lífefnis geta stafað af hverri orsök fyrir sig eða vegna samverkandi orsakabátta allt eftir greiningaraðferð lífefnis.

Sermissýni með rauðkornarofi hafa alltaf verið vandamál klínískra rannsóknarstofa. Rannsóknir hafa sýnt fram á að jafnvel sermissýni sem eru með mjög litlu rauðkornarofi eru óhæf til mælinga á ýmsum lífefnum og vegna breytilegra áhrifa í greiningarfasa hefur ekki verið unnt að leiðrétta skekkjur af þessum toga með áreiðanlegum hætti [3]. Við rannsóknir hefur einnig komið í ljós að sjónrænt mat á rauðkornarofi er óáreiðanlegt og breytilegt frá manni til manns jafnvel þó litaskali sé við hendina til samanburðar [4]. Nýjustu sjálfvirku efnagreinarir greina flestir rauðkornarof í sermissýnum og gefa upp magn rauðkornarofs samkvæmt rauðkornarofsvísi (RV) (hemolysis index) eða vísitölu. RV er mismunandi eftir efnagreinum og gefa ekki endilega til kynna hvert eiginlegt magn rauðkornarofs er, til dæmis ef framleiðandi gefur ekki RV upp í magneiningu sem frían blóðrauða í g/L. Rannsóknir hafa þó sýnt fram á að vísitölur þessar reynast mjög gagnlegar til að meta gæði sermissýna, sérstaklega sermissýna með vægu rauðkornarofi, og þar með gæði forgreiningarfasa í heild sinni [2, 5].

Áhrif rauðkornarofs í greiningarfasa

Rauðkornarof í sermi hefur mjög mikil áhrif við mælingar á kalíum (K) og laktatdehydrogenasa (LDH). Þessi mæliefni eru í miklum styrk innan frumuhimnu rauðra blóðkorna og losna í miklu magni út í sermi við rauðkornarof. Lítil áhrif eru vegna þessa við mælingar á natríum (Na) en við mikið rauðkornarof getur þó komið fram lækkun vegna þynningaráhrifa innanfrumuefna.

Gleypniróf frís blóðrauða í sermi sýnir toppa við bylgjulengdirnar 415, 540 og 570 nm og því eru ljósfræðilegar truflanir vegna rauðkornarofs hugsanlegar

við mælingar nærri þessum bylgjulengdum. Slíkar truflanir hafa til dæmis áhrif á mælingar á alkalískum fosfatasa (ALP), sem gerðar eru á rannsóknarkjarna, blóðmeina- og klínískri lífefnafræði, á rannsóknarsviði Landspítala (RK), þar sem notast er við IFCC-aðferð með AMO-buffer, aðlagða að 37°C. Hér er um að ræða hvarfhræðamælingu þar sem p-nitrophenyl fosfat verður að p-nitrophenol og H₃PO₄ í basísku umhverfi fyrir tilstilli ALP. Ljósmeilingin er framkvæmd með endurkasti við 400 nm bylgjulengd og styrkur ALP reiknaður út frá staðalkúrfu [6, 7].

Ljósfræðilegar truflanir verða einnig vegna rauðkornarofs í sermi við mælingar RK á bilirúbíni þar sem mælingin fer fram við bylgjulengdina 540 nm en þar hafa efnafraðilegar truflanir líka bein áhrif á diazoaðferð en frír blóðrauði hefur hamlandi áhrif á myndefni efnahvarfsins [7-9]. Af þessu má sjá að truflanir vegna rauðkornarofs í sermi hafa mismunandi áhrif á greiningaraðferðir lífefna. Áhrifin eru mismikil, ýmist til hækkunar eða lækkunar á niðurstöðu, eftir mæliefnum og greiningaraðferðum.

Orsakir rauðkornarofs í sermi

Rauðkornarof í sermissýni getur meðal annars stafað af mistökum sem verða við blóðsýnatöku og meðhöndlun blóðsýna og er þá talað um *in vitro* orsakir. Rauðkornarof getur líka stafað af óeðlilegum skilyrðum í líkamanum og er þá talað um *in vivo* orsakir [10].

Algengasta orsök *in vitro* rauðkornarofs eru röng vinnubrögð við blóðsýnatökuna sjálfa. Aðrir orsakavaldar geta meðal annars verið atriði í flutningi blóðsýnis eða meðhöndlun blóðsýnaglasa eftir blóðsýnatöku [11]. Nýleg rannsókn hefur þó sýnt fram á að kröftug hristing blóðsýnaglasa eftir að blóðsýni hefur verið tekið leiðir ekki til rauðkornarofs eða skekkju í mælingum á mörgum algengum lífefnum eins og talið hefur verið [12].

Orsakir fyrir *in vivo* rauðkornarofi geta verið margar og eru oft flokkaðar í innanæða (intravascular) ef orsökina er að finna í blóðrás, eða utanæða (extravascular) ef orsökina má rekja til netþekjukerfis (rediculoendothelial system). Hvort sem rauðkornarof í sermissýni stafar af *in vitro* eða *in vivo* orsökum losnar blóðrauði og önnur innanfrumuefni út í sermi, sjáanlegur munur á sermissýni sem berst klínískri rannsóknarstofu er því enginn.

Greiningaraðferðir rauðkornarofs

Magn rauðkornarofs í sermissýnum er metið með mælingu á fríum blóðrauða í sermi. Frír blóðrauði í sermi er, eins og önnur mæliefni, mælt með mismunandi greiningaraðferðum eftir því hvaða efnagreinar og búnaður er til staðar á viðkomandi klínískri rannsóknarstofu. Hefðbundnar greiningaraðferðir til mælinga á blóðrauða í heilblóði hafa ekki reynst nægilega næmar til

að meta rauðkornarof í sermissýnum þar sem frír blóðrauði er í svo lágum styrk í serminu. Þess vegna hefur þurft að aðlaga aðferðir að lægra mæligildi með breyttum þynningum eða notast við sams konar greiningaraðferðir og notaðar eru við mælingar á blóðrauða í mænuvökva. Greiningaraðferðum rauðkornarofs er hægt að skipta gróflega í tvo hópa: Annars vegar greiningaraðferðir sem byggjast á hvarfi blóðrauða við prófefni sem leiðir til myndunar mælanlegs litaðs efnasambands og hins vegar aðferðir sem byggjast á beinum ljósgleypnimælingum þar sem gleypni oxýhemóglóbíns í sýni er mæld og styrkur blóðrauða reiknaður út [13].

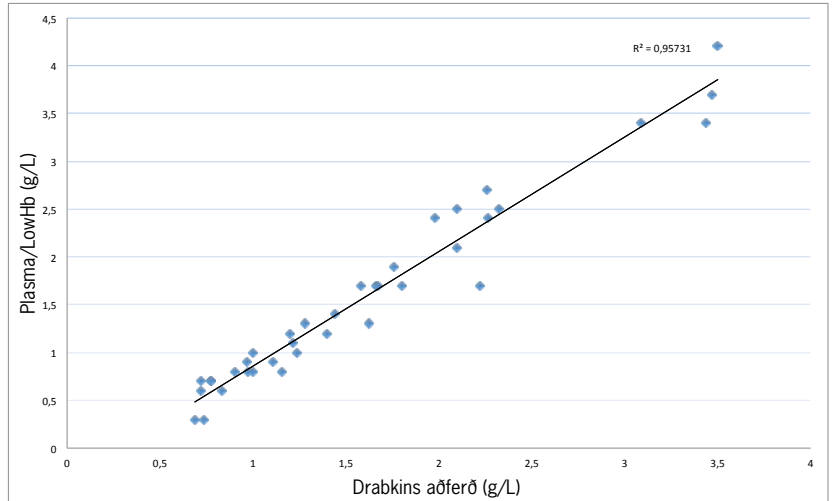
Hefðbundin Drabkins cyanmethemóglóbín litljósmælingaraðferð er sú aðferð sem International Council for Standardization in Haematology (ICSH) og Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) mæla með til að greina blóðrauða í heilblóði [14]. Rannsóknir hafa sýnt að greiningaraðferðin er bæði auðveld í framkvæmd og áreiðanleg. Hún mælir allar tegundir blóðrauða nema sulfhemóglóbín og hægt er að nota alþjóðlega staðla við framkvæmdina [15, 16]. Með breytingum á þynningum er auðveldlega hægt að aðlaga greiningaraðferðina að lægri mæligildum blóðrauða fyrir mat á rauðkornarofi [16].

Greiningaraðferð Harboe er ljósmæling þar sem sermi er þynnt í basískri Na₂CO₃-lausn og gleypni þess mæld á þremur bylgjulengdum, 380, 415 og 450 nm. Basísk þynningarlausn minnkar áhrif gruggs á mælingu, styrkur hemóglóbíns er reiknaður út frá gleypni sermisins við 415 nm og notuð er Allen-leiðréttingarformúla til að leiðrétta fyrir áhrifum bilirúbíns og þriglyseríða [17]. Aðferðinni má lýsa með eftirfarandi jöfnu: $Hb(g/L) = (167,2 * A_{415} - 83,6 * A_{380} - 83,6 * A_{450}) * \frac{1}{1000} * \frac{1}{\text{þynning} \cdot I_{H_2O}}$ [18].

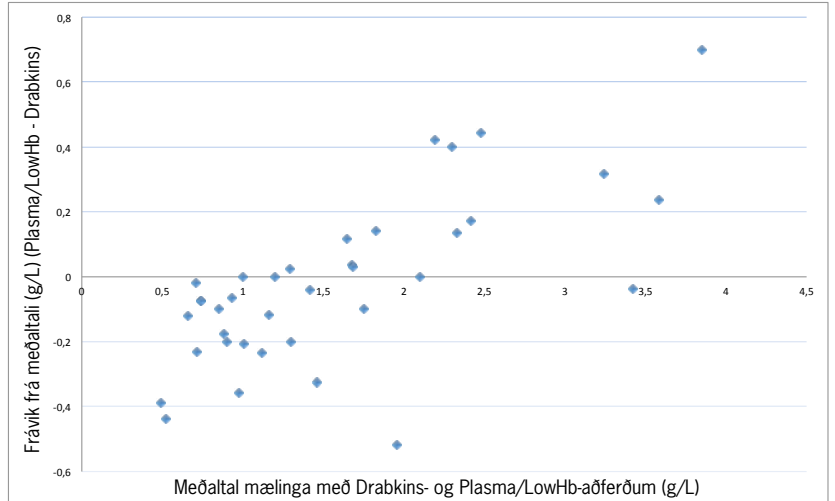
Rannsóknir hafa sýnt að bæði Harboe- og aðlöguð Drabkins-aðferð, hér eftir kölluð Drabkins-aðferð, eru hentugar til mælinga á rauðkornarofi. Ekki þarf að staðla Harboe-aðferð og hún hefur reynst mjög örugg, nákvæm og næm við prófanir með nautasermi [13]. Drabkins-aðferð hefur þann kost fram yfir Harboe-aðferð að hægt er að notast við alþjóðlega staðla við hana en Harboe-aðferðin er hins vegar laus við eiturefni [15]. Í þessari rannsókn er Drabkins-aðferð notuð sem viðmiðunaraðferð.

Markmið

Markmið þessarar rannsóknar var að meta sambærileika



Mynd 1. Fylgni Plasma/LowHb- og Drabkins-aðferðar.

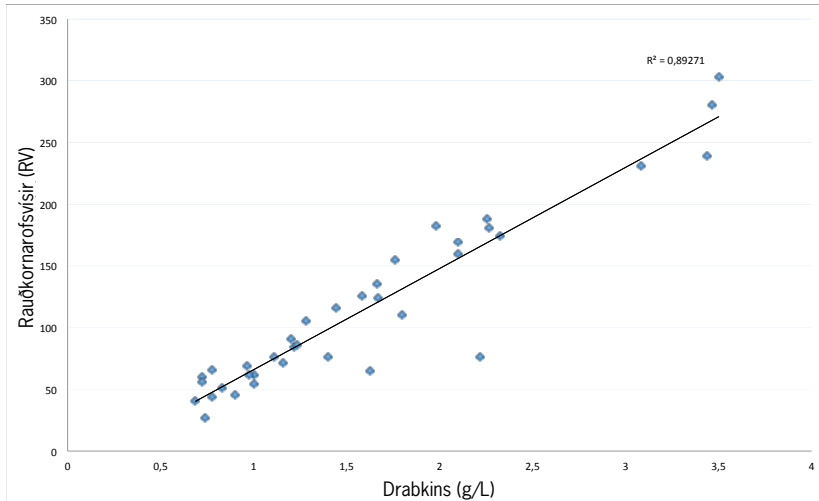


Mynd 2. Dreifing frávik milli LowHb-aðferðar og Drabkins-aðferðar.

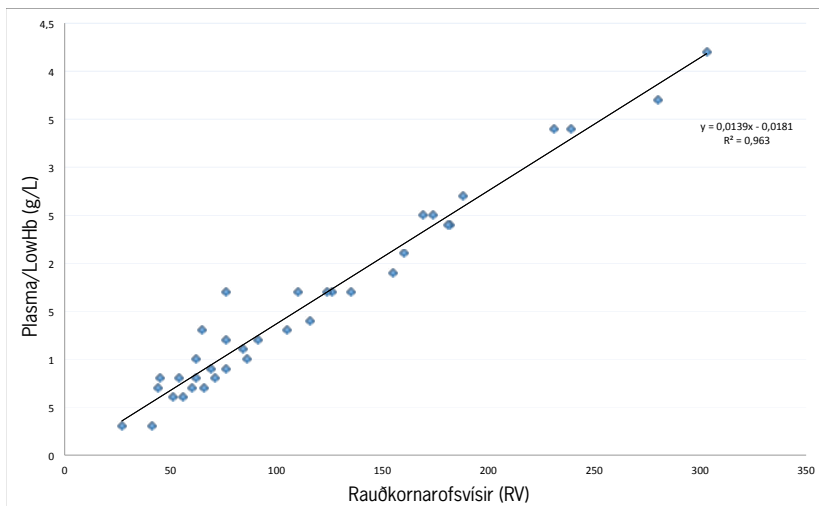
greiningaraðferða sem notaðar eru á RK við mat á rauðkornarofi í sermissýnum og kvarða RV Vitros 5.1 FS efnagreinis í g/L.

Efni og aðferðir

Mismunandi greiningaraðferðir voru notaðar við mat á rauðkornarofi á starfsstöðvum RK. Við Hringbraut var notast við Vitros® 5.1 FS-efnagreini (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey) til almennra efnamælinga. Hann metur rauðkornarof sjálfvirk í hverju sermissýni og gefur upp RV sem hækkar eftir því sem meira rauðkornarof er í sermissýni. Mælisvið RV er 15-1.000 en upplýsingar um yfirfærslu í g/L liggja ekki fyrir frá framleiðanda efnagreinis. Á starfsstöð í Fossvogi var eldri efnagreini, Vitros 950, sem hafði ekki þennan sjálfvirka búnað og því var rauðkornarof þar metið sjónrænt. Síðar hófst þó notkun lítills efnagreinis, Plasma/LowHb-mælis (HemoCue®, Ängelholm, Sweden), sem magnmældi rauðkornarof í g/L. Til að bera saman greiningaraðferðir Plasma/LowHb-mælis og RV Vitros® 5.1 var ákveðið að nota Drabkins-aðferð til viðmiðunar.



Mynd 3. Fylgni RV-aðferðar og Drabkins-aðferðar.



Mynd 4. Fylgni RV-aðferðar og Plasma/LowHb-aðferðar.

Til að leggja mat á sambærileika greiningaraðferða rauðkornarofs og finna stuðul sem nýttist til að breyta RV í magneininguna g/L voru öll sýni með rauðkornarofi sem bárust RK í Fossvogi á tímabilinu 7.–11. janúar 2012 mæld, heildarfjöldi sýna voru 37 sermissýni. Að morgni dags voru tekin þau sermissýni með rauðkornarofi sem borist höfðu RK frá deginum áður til morguns og þau mæld samdægurs með öllum þremur greiningaraðferðunum. Sermissýnin voru öll mæld innan 24 klukkustunda frá sýnatöku.

Drabkins-aðferð

Hefðbundin Drabkins-aðferð er cyanmethemóglóbín-aðferð sem byggist á litmyndandi efnahvarfi og ljósmælingu. Frír blóðrauði í sermissýni kemst í snertingu við hvarfefni, oxast vegna basísks sýrustigs hvarfefnis og breytist í methemóglóbín. Methemóglóbín hvarfast við kálfumcyaníð og myndar cyanmethemóglóbín sem hefur hámarksgleypni við 540 nm. Mæld gleypni sýnis er línuleg og í réttu hlutfalli við magn blóðrauða í sermissýni [19].

Drabkins-aðferð var framkvæmd með hvarfefni frá Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri; ref.n: D5941) sem einungis þarf að leysa upp. Aðferðalýsing frá framleiðanda á við um mælingar á blóðrauða í heilblóði og því var notast við aðrar þynnningar en þar voru gefnar upp. Notast var við Haemiglobincyanide (HiCN) staðal frá Eurotrol (Eurotrol B.V., Ede, Holland; lot. nr:19-1-B806) með styrkleika 0,5742 g/L til að útbúa staðalkúrfu. Við gerð staðalkúrfu fyrir mælingu var notast við 200 μ l af staðli og 800 μ l af hvarfefni. Þau sermissýni sem mældust hærri en staðall voru þynnt frekar þar til styrkur þeirra náði inn á staðalkúrfu eða allt að 20 sinnum. Ljósmælingar voru framkvæmdar við 540 nm á Ultrospec 100 pro-ljósmæli (Amersham Biosciences UK Limited, Buckinghamshire, England) í eigu Háskóla Íslands. Hvert sermissýni var mælt tvisvar sinnum og meðaltal mælinga skráð sem niðurstaða.

Plasma/LowHb-ljósmæling

Aðferðin byggist á ljósmælingu í sérstökum ljósmæli og míkroklúvettu, frá HemoCue (HemoCue®, Ängelholm, Sweden), þar sem hver klúvetta og efnagreinin eru hönnuð fyrir eitt mæliefni. Míkroklúvettutækni Hemo Cue byggist á því að þegar oddur klúvettunnar snertir sermissýnið er nákvæmt magn sermissýnis sogað upp í klúvettu með hárpípukrafti. Sermissýni dregst inn í hvarf-

efnarými klúvettu þar sem þurrkuð hvarfefni leysast upp og blandast sermissýni en við það fer viðkomandi efnahvarf af stað. Klúvettu er því næst komið fyrir í efnagreini sem hefur aflestur eftir ákveðinn tíma við ákveðna bylgjulengd. Efnagreinin umbreytir aflestri í styrk mæliefnis eftir fyrirfram skilgreindum reikni-formúlum.

Mælisvið rauðkornarofsmælis HemoCue er 0-30 g/L fyrir frían blóðrauða. Tæknin byggist á aðlagðri azidemetemóglóbín-aðferð þar sem natríumnítrít (NaNO_2) gengur í samband við tvígilt járn oxyhemóglóbíns og deoxyhemóglóbíns og breytir því í þrígilt járn og þar með í methemóglóbín. Methemóglóbín verður því næst fyrir áhrifum frá azide-jónum og myndar azidehemóglóbín sem er litað efnasamband með hámarksgleypni við 540 og 575 nm [20]. Efnagreinin mælir gleypni við tvær bylgjulengdir, 540 og 880 nm, en mæling á síðari bylgjulengdinni er til að leiðrétta fyrir gruggi (turbidity) [21].

Framkvæmd mælinga var samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðanda efnagreinis. Notast var við framkvæmdalýsingu sem liggur fyrir á RK.

Rauðkornarofsvísir (RV)

MicroSensor™ tækni Vitros® 5.1 FS byggist á því að sermi er ljósmælt með sjálfvirkri litrófsljósmælingu á 135 bylgjulengdum með 3 nm millibili á bilinu 400 til 800 nm og gleypnilitróf þess skannað. Frír blóðrauði í sermi myndar að jafnaði toppa á litrófi með hámarksgleypni við 540 nm og aðeins lægri topp við 575 nm. Greiningartæki metur toppana og gefur út RV á bilinu 15-1.000 sem samsvarar magni hemóglóbíns í sermissýninu [22]. Rannsóknir hafa sýnt að aðferðin er sambærileg við Harboe-aðferð [23].

Tölfræði

Við tölfræðiúrvinnslu sambærileika greiningaraðferða var notuð línuleg aðhvarfsgreining gerð með Excel 2007 tölflureikni (Microsoft Corporation, Redmond, Washington). Pearsons-fylgnistuðull var notaður til að meta fylgni aðferða.

Niðurstöður

Báðar greiningaraðferðir RK, Plasma/LowHb- og RV-aðferð, reyndust hafa mikla fylgni við Drabkins-aðferð. Fylgnistuðull Plasma/LowHb-aðferðar við Drabkins-aðferð reyndist vera $R^2=0,96$ og fylgnistuðull RV-aðferðar við aðlagða Drabkins-aðferð var $R^2=0,89$ eins og sjá má á myndum 1 og 3. Bæði Drabkins- og Plasma/LowHb-aðferðir gefa niðurstöður í g/L og því er hægt að skoða dreifingu frávika frá meðaltali milli þeirra aðferða með Bland- og Altman-punkturiti (mynd 2). Mynd 2 gefur til kynna að hugsanlega sé breytileg kerfisvilla milli aðferða eða að Plasma/LowHb-aðferð sé oftast með lægri mæligildi en Drabkins-aðferð þegar mæld eru sermissýni með lágum styrk og hærri mæligildi á sýnum með hærri styrk. Í flestum tilvikum (70%) er frávikið þó innan við 0,25 g/L.

Aðhvarfsgreining sýndi mesta fylgni milli þeirra greiningaraðferða sem eru í notkun á RK en fylgni RV-aðferðar við Plasma/LowHb-aðferð reyndist vera með fylgnistuðulinn $R^2=0,96$ eins og sjá má á mynd 4. Tengslum greiningaraðferða RK má því lýsa með eftirfarandi jöfnu: $y=0,0139x-0,0181$ þar sem x er niðurstaða mælingar með RV-aðferð og y er niðurstaða mælingar með Plasma/LowHb-aðferð í g/L. Jöfnuna má því nota til að yfirfæra niðurstöðu mælingar með RV-aðferð á sermissýni með rauðkornarofi yfir í g/L af fríum blóðrauða. Sermissýni með rauðkornarofi 0,5 g/L af fríum blóðrauða ætti samkvæmt þessari jöfnu að vera með RV 37, 1,0 g/L samsvara RV 73 og 2,0 g/L samsvara RV 145.

Umræða

Bland- og Altman-punkturiti bendir til þess að breytileg kerfisvilla sé á milli Plasma/LowHb-aðferðar og Drabkins-aðferðar á þann veg að við lág mæligildi sé

PlasmaLow/Hb-aðferð oftast lægri en Drabkins-aðferð en hærri við há mæligildi (mynd 2). Skurðpunktur breytileikans er við 1,7 g/L af fríum blóðrauða í sermi en hugsanlega má rekja kerfisvillu til þynningaráhrifa við framkvæmd Drabkins-aðferðar þar sem staðall var mjög lágur eða 0,57g/L. Ekki er hægt að nota Bland- og Altman-punkturiti til að meta hvort sama kerfisvilla sé á milli þeirra greiningaraðferða sem eru í notkun á RK, Plasma/LowHb-aðferðar og RV-aðferðar, þar sem þær mæla ekki í sömu einingum. Ef gert er ráð fyrir að engin breytileg kerfisvilla sé milli RV-aðferðar og Drabkins-aðferðar þá er sama breytilega kerfisvilla og punktaritið á mynd 2 sýnir milli þeirra aðferða sem eru í notkun á RK, við lág mæligildi gæfi þá RV-aðferð oftast lægri niðurstöður en hærri við há mæligildi. Sama breytilega kerfisvilla gæti hins vegar verið á milli RV-aðferðar og Drabkins-aðferðar sem þýddi enga kerfisvillu milli aðferða RK. Þriðji möguleiki er að kerfisvilla af óþekkttri stærð væri milli Drabkins-aðferðar og RV-aðferðar sem þýddi óþekktu kerfisvillu milli aðferða RK. RV-aðferð Vitros® 5.1 FS hefur hins vegar verið lýst sem sambærilegri við Harboe-aðferð; Drabkins-aðferð og Harboe-aðferð hafa báðar reynst áreiðanlegar við mælingar á rauðkornarofi. Drabkins-aðferð hefur reynst ofmeta frían blóðrauða við mjög lágan styrk en það gæti skýrt kerfisvillu sem hér kemur fram [15].

Ákveðið var að lýsa tengslum aðferða RK með jöfnu beinnar línu vegna þess að RV Vitros® 5.1 FS hefur áður verið lýst sem línulegum á magnkvarða auk þess sem aðferðin hefur verið sögð línulega sambærileg við Harboe-aðferð [23]. Niðurstöður þessarar rannsóknar sýna að 1,0 g/L af fríum blóðrauða í sermi samsvara RV 73 en það samræmist þó ekki fyrri rannsóknum þar sem 1,0 g/L hefur reynst samsvara RV 99 og 150 mg/L samsvara RV 15 [10, 24].

Mismunur þessi verður ekki skýrður eingöngu með vali á jöfnu þar sem tengsl RV-aðferðar og viðmiðunaraðferðar benda til enn lægri niðurstöðu því að 1,0 g/L mælt með Drabkins-aðferð samsvarar RV 60. Að bera greiningaraðferðir RK saman við viðmiðunaraðferð, en ekki bara hvora við aðra, styrkir rannsóknina einkum vegna þess að greiningaraðferðir RK skila ekki niðurstöðum í sömu einingum. Ástæður þess að kvörðun RV reynist jafn frábrugðin fyrri rannsóknum og raun ber vitni gæti orsakast af litlu þýði. Ábendingar um breytilega kerfisvillu gætu minnkað með auknum fjölda sýna en einnig er hugsanlegt að skýringa sé að leita í tækjakosti. Ef breytingar verða á tækjabúnaði með tímanum gæti slíkt verið orsakavaldur en hvorki Micro Sensor™-tækni Vitros® 5.1 FS eða míkrokvettutækni HemoCue® eru staðlaðar á rannsóknarstofum. Mælingar á stýrisýnum á RK gefa þó ekki ábendingar um að stöðlun sé röng og mælast innan viðmiðunarmarkna við gæðaeftirlit.

Frá því að þessi rannsókn var gerð hefur RK tekið í notkun annan Vitros® 5.1 FS-efnagreini sem kom í stað eldri efnagreinis, Vitros® 950, sem staðsettur var í Fossvogi. Báðar starfseiningar RK hafa því í dag sams konar tækjabúnað til að mæla rauðkornarof en PlasmaLow/Hb-efnagreininir er einnig til staðar á báðum starfseiningum. Þar sem niðurstöður þessarar rannsóknar eru svo frábrugðnar því sem aðrir rannsakendur hafa sett fram varðandi RV Vitros® 5.1 FS ætti að skoða hvort báðir Vitros® 5.1 FS-efnagreinar RK skili sambærilegum niðurstöðum á RV við mælingar á sermissýnum með rauðkornarofi. Ef báðir efnagreinar gefa sömu niðurstöður ætti að vera hægt að útiloka aldurstengdar breytingar á tækjabúnaði sem orsök ósamræmis við fyrri rannsóknir.

Ekki er mjög langt síðan framleiðendur efnagreina fóru að útbúa efnagreina sem mæla rauðkornarof með sjálfvirkum hætti. RV þessir eru þó ekki samræmdir og ef notkun þeirra sem gæðavísa á að verða almenn mundu samræmd viðmið auðvelda notkun [2]. Sérhver klínísk rannsóknarstofa þarf að setja fram sínar eigin verklagsreglur og leiðbeiningar til starfsmanna um hvernig meðhöndla skuli sermissýni með rauðkornarofi miðað við þá efnagreina sem í notkun eru á rannsóknarstofunni. Þetta þarf að vera í samhengi við fyrri rannsóknir og ábendingar framleiðanda viðkomandi efnagreina um hverja og eina lífefnarannsókn.

Heimildir

- 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(6): 764-72.
- 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. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2009; 47(8): 934-9.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2006; 44(3): 311-6.
- 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? *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2009; 47(11): 1361-5.
- Plebani M, Lippi G. Hemolysis index: quality indicator or criterion for sample rejection? *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2009; 47(8): 899-902.
- Thomas L, editor. *Clinical laboratory diagnostics, use and assessment of clinical laboratory results*. 1. ed. TH-Books Frankfurt/Main; 1998.
- Ortho-Clinical. *MicroSlide Instructions for Use manual*. Users manual 2004.
- Brunori P, Masi P, Faggiani L, Villani L, Tronchin M, Galli C, et al. Evaluation of bilirubin concentration in hemolysed samples, is it really impossible? The altitude-curve cartography approach to interfered assays. *Clinica Chimica Acta* 2011; 412(9-10): 774-7.
- Shull BC, Lees H, Li PK. Mechanism of interference by hemoglobin in the determination of total bilirubin. I. Method of Malloy-Evelyn. *Clinical chemistry* 1980; 26(1): 22-5.
- Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2011; 49(7): 1113-26.
- Lippi G, Plebani M, Di Somma S, Cervellin G. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2011; 48(3): 143-53.
- Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Gelati M, Volanski W, et al. Effects of vigorous mixing of blood vacuum tubes on laboratory test results. *Clin Biochem* 2013; 46(3): 250-4.
- Malinauskas RA. Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artificial organs* 1997; 21(12): 1255-67.
- Zwart A, van Assendelft OW, Bull BS, England JM, Lewis SM, Zijlstra WG. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *Journal of clinical pathology* 1996; 49(4): 271-4.
- Han V, Serrano K, Devine DV. A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. *Vox sanguinis* 2010; 98(2): 116-23.
- Moore GL, Ledford ME, Merydith A. A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl. *Biochemical medicine* 1981; 26(2): 167-73.
- Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand J Clin Lab Invest* 1959; 11: 66-70.
- Noe DA, Weedn V, Bell WR. Direct spectrophotometry of serum hemoglobin: an Allen correction compared with a three-wavelength polychromatic analysis. *Clinical chemistry* 1984; 30(5): 627-30.
- Sigma. Product information; Drabkin's Reagent, product code D 5941. In: Sigma-Aldrich, editor. Saint Louis, Missouri: Sigma-aldrich.com; 2003; p. 3.
- Vanzetti G. An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1966; 67(1): 116-26.
- HemoCue. Technical Specifications HemoCue® Plasma/Low Hb System. HemoCue Limited; 2011 [cited 2013 5 maj]; Available from: http://www.hemocue.com/uk/Products/Plasma_Low_Hb/Technical_Specifications-145.html.
- Ortho-Clinical. Vitros® 5.1 FS chemistry system. Participant guide. CL6010-EN v2.0 2005-9 ed: Ortho-Clinical Diagnostics; 2005.
- Knabbe C, Ratge D, Christen K, Sonntag O. Evaluation of sample integrity measurement with VITROS® 5,1 FS chemistry system / Evaluation der Messung der Probenintegrität am VITROS® 5,1 FS. *LaboratoriumsMedizin* 2009; p. 33.
- Bolenius K, Soderberg J, Hultdin J, Lindkvist M, Brulin C, Grankvist K. Minor improvement of venous blood specimen collection practices in primary health care after a large-scale educational intervention. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2013; 51(2): 303-10.