مدیریت امور آزمایشگاه‌های معاونت درمان دانشگاه علوم‌پزشکی اردبیل

نشریه علمی آزمایشگاه- نوبت سیزدهم (شهریور ماه 1403)

عوامل مداخله گر در مرحله پیش از آزمایش

مقدمه

همانطور که در شماره پیشین نشریه بیان گردید امروزه خطاهای مربوط به مرحله پیش از آزمایش، شایع ترین علت بروز اشتباه در نتیجه آزمایش می باشند. وجود فاکتور های مداخله گر (Interference Factors) برخلاف عوامل تاثیرگذار (که میزان آنالیت بطور واقعی تغییر می نماید) موجب افزایش یا کاهش کاذب سطح آنالیت شده و از طرفی میزان این اثرگذاری نیز کاملا بستگی به نوع روش اندازه گیری، کیت و تجهیزات مورد استفاده دارد. این فاکتورها و تاثیر آنها زمانی اهمیت پیدا می کند که منجر به تغییر و خطا در اندازه‌گیری به میزانی بیش از خطای مجاز تست شوند. در این شماره سعی داریم در مورد چند فاکتور مداخله گر شایع و مهم و اثرات آن ها بر نتیجه آزمایش بحث کنیم. اگرچه باید تاکید کرد که این لیست به هیچ وجه کامل نبوده و اثرات سایر مداخله گرهای مهم و شایع (مثل داروها) نیز نیاز به مطالعه و توجه کافی دارند.

همولیز (Hemolysis)

همولیز یکی از شایع‌ترین علل خطاهای مرحله پیش از آزمایش و نیز شایع‌ترین علت رد نمونه در آزمایشگاه می باشد. تخریب غشای گلبول‌های قرمز منجر به خروج محتویات داخل این سلول‌ها و تغییر رنگ پلاسما و سرم می گردد. باید توجه شود که میزان تغییر رنگ قرمز پلاسما معیار دقیقی برای تعیین شدت همولیز نیست. به طور کلی همولیز را می توان بر اساس محل رخ دادن آن به دو دسته داخل بدن (In vivo) و خارج از بدن (In vitro) تقسیم نمود.

همولیز در داخل بدن بیمار تنها علت 3٪ از نمونه های لیز دریافت شده توسط آزمایشگاه می باشد. محل تخریب غشای گلبول‌های قرمز می تواند در داخل عروق (Intravascular) و یا در خارج عروق (Extravascular) و توسط سیستم رتیکولواندوتلیال اتفاق بیفتد. موارد زیر برای تشخیص همولیز با منشا داخل بدن کمک کننده است:

- کاهش هاپتوگلوبولین سرم و پلاسما
- وجود هموگلوبینوری و متهموگلوبینوری
- تغییر رنگ قهوه ای سرم/ پلاسما و ادرار
- افزایش بیلی روبین غیرمستقیم سرم
- افزایش رتیکولوسیت ها
- افزایش LDH سرم و پلاسما
- پتاسیم نرمال سرم و پلاسما (علامتی کاربردی)
- وجود مجدد لیز در تکرار نمونه گیری و همزمان در انواع نمونه ها (سرم، سیتراته، هپارینه...)

نکته: در میان موارد ذکر شده پایین بودن سطح هاپتوگلوبین مهم‌ترین تست می باشد ولی متاسفانه انجام آن در تمامی آزمایشگاه ها میسر نمی باشد. سطح LDH خون در لیز رخ داده در خارج از بدن نیز افزایش داشته و موجب افتراق نمی شود. از طرفی وجود سطح پتاسیم نرمال در نمونه با شواهد لیز می تواند علامت خوبی از وقوع همولیز در داخل بدن بیمار (in vivo) باشد. برخلاف مواقعی که لیز گلبول های قرمز پس از خروج از رگ (in vitro) اتفاق می افتد، در صورت بروز همولیز در داخل بدن، سیستم های هموستاز موجود در بدن انسان سطح پتاسیم خون را کنترل و در محدوده نرمال و یا کمی بالاتر حفظ می نمایند.

نکته مهم: رد نمونه لیز در صورتی که همولیز در داخل بدن رخ داده باشد به هیچ عنوان مجاز نبوده و کلیه آزمایشات درخواستی باید انجام و گزارش شود.

لیز نمونه در خارج از بدن بیمار می تواند به دلایل زیر باشد:

- استفاده از سوزن بسیار باریک
- کشیدن سریع پیستون سرنگ
- تخلیه سریع و با شدت خون از سرنگ به لوله ها
- تکان دادن شدید نمونه
- نمونه گیری قبل از خشک شدن الکل روی پوست

کوتاه بودن زمان بستن تورنیکت، نمـــونه گیری در حجم کم (در صورت امکان)، استفاده از فشار وکیوم کمتر، نمونه گیری از محل قدام ساعد و استفاده از سوزن با مجرای بزرگتر از مواردی است که احتمال لیز شدن نمونه را کمتر می کند.

همولیز با مکانیسم های زیر منجر به تداخل در آزمایش می شود:

- **جذب نوری:**

اکسی هموگلوبین آزاد شده در طی همولیز، در طول موج 415 بیشترین جذب نوری را دارد (همچنین در 540 و 570 نیز افزایش جذب مشاهده می شود) و می تواند در برخی از تست ها که اساس آن ها خوانش میزان جذب نوری پس از انجام واکنش در محدوده این طول موج می باشد اختلال ایجاد نماید.

- **آزاد شدن محتویات داخل گلبول های قرمز:**

غلظت برخی از آنالیت ها در داخل سلول RBC بسیار بیشتر از پلاسما می باشد و در صورت وقوع لیز و آزاد شدن آن ها به داخل پلاسما یا سرم سطح آنها تغییر قابل توجهی خواهد نمود. جدول روبرو، برگرفته از کتاب تیتز تفاوت غلظت برخی از این آنالیت ها را در داخل و خارج RBC نشان می دهد. برای نمونه غلظت پتاسیم در داخل سلول گلبول قرمز 40 برابر بیش از پلاسما است!

Analyte	Intracellular Concentration (Compared to Extracellular)
Lactate dehydrogenase	↑ 160×
Inorganic phosphate	↑ 100×
Potassium	↑ 40×
Aspartate aminotransferase SGOT	↑ 40×
Folic acid	↑ 30×
Alanine aminotransferase SGPT	↑ 7×
Magnesium	↑ 3×

- **کاهش سطح آنالیت هایی که غلظت آنها در داخل سلول RBC کمتر است:** معمولا موجب خطای قابل توجه در نتیجه آزمایش این آنالیت ها نمی شود ولی در نمونه هایی با لیز خیلی شدید ممکن است مقادیر آلبومین، گلوکز، بیلی روبین و سدیم سرم به صورت کاذب **کاهش** یابد.

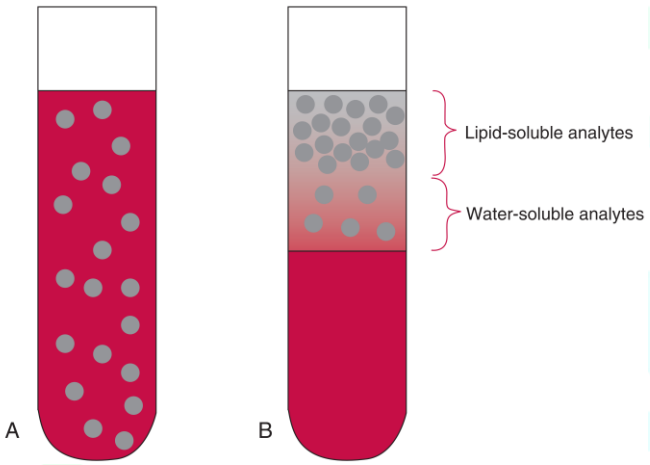
- **تداخل شیمیایی:** لیز می تواند به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم بر واکنش تاثیر بگذارد. برای مثال آزاد شدن آنزیم آدنیلات سیکلاز از گلبول های قرمز و تولید ADP با سوبسترای آزمایش اندازه گیری مقدار CK رقابت کرده و بر نتیجه آزمایش تاثیر می گذارد. همچنین اثر پراکسیدازی هموگلوبین آزاد شده با مهار تشکیل نمک دیازونیوم به صورت مستقیم در اندازه گیری بیلی روبیـــن اختلال ایجاد می نمـــاید. از نمونه های تاثیـــر غیرمســـتقیم لیز می توان به تاثیـــر آزاد شدن cathepsin E از گلبـــول های قرمز بر آزمایشات ایمـــونواسی اشاره نمود. این آنزیم پروتئولیتیک می تواند باعث از بین رفتن و یا برعکس بروز بیشتر اپی توپ های به کار گرفته شده در روش های ایمونواسی شود. تاثیر لیز بر این نوع روش آزمایش از نظر شدت اثر و نیز جهت آن کاملا متغیر و وابسته به نوع اپی توپ های به کار گرفته شده دارد. برای مثال لیز معمولا باعث کاهش کاذب cTnT، انسولین، کورتیزول، تستوسترون و ویتامین B12 شده و از طرفی موجب افزایش کاذب PSA و cTnI می گردد. ولی باید دقت کرد که شدت تاثیر و جهت آن کاملا بستگی به نوع کیت و دستگاه مورد استفاده ونیز متد به کار برده شده در روش ایمونواسی دارد.

با توجه به توضیحات فوق برای اطلاع از نوع و میزان اثرگذاری همولیز بر نتیجه آزمایش مطالعه اساس روش اندازه گیری، طول موج مورد استفاده برای خوانش، میزان جذب نوری و اطلاعات ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت و دستگاه ضرورت دارد. همچنین آگاهی کارکنان آزمایشگاه از احتمال تغییر سطح آنالیت ها در سرم و پلاسما به دنبال لیز گلبول های قرمز اهمیتی ویژه دارد.

نمونه لیپمیک (Lipemia)

پخش نور توسط ذرات بزرگ لیپو پروتئین ها (بخصوص شیلومیکرون و VLDL) باعث کدورت نمونه سرم و پلاسما می شود. لیپمیک بودن نمونه با مکانیسم های زیر سبب تداخل در آزمایشات می گردد:

- **جذب نوری:** می تواند باعث اختلال در خوانش میزان جذب نوری از طول موج 300 تا 600 نانومتر شود ولی بیشترین تداخل مربوط به طول موج های پایین و نزدیک به 300 می باشد. به همین دلیل میزان اختلال در تست های با روش آنزیماتیک که مقدار جذب نوری محصول واکنش معمولا در طول موج 340 اندازه گیری می شود قابل توجه است. از طرفی ذرات بزرگ چربی موجب پخش نور (Scattering) می گردند. بنابراین در تست هایی مثل توربیدومتری و نفلومتری که میزان پخش نور در فرآیند انجام آزمایش اهمیت دارد شدت تداخل و تاثیر لیپمیک بودن نمونه بیشتر است.
- **اثر کاهش حجم:** در حالت معمول و در شرایط ناشتایی کافی بیمار، چربی ها کمتر از 10٪ حجم پلاسما را تشکیل می دهند. در صورت افزایش چربی خون، درصد آب پلاسما کاهش می یابد. از طرفی آنالیت های محلول در آب مثل الکترولیت ها تنها در بخش آبی پلاسما وجود دارند. در صورتی که در روش آزمایش به کار گرفته شده، محاسبه غلظت آنالیت از تقسیم مقدار اندازه گیری شده در جزء آبی، بر حجم کل پلاسما (آب +چربی) به دست بیاید، سطح آنالیت به صورت کاذب کمتر از مقدار واقعی گزارش خواهد شد. برای مثال در نمونه لیپمیک اگر میزان سدیم با روش فلیم فتومتری و یا ISE غیرمستقیم اندازه گیری شود ممکن است میزان سدیم بطور کاذب پایین گزارش گردد (سودو هایپوناتریمی)، در حالی که اگر از روش های مستقیم (direct potentiometry) استفاده گردد چنین تداخلی مشاهده نخواهد شد. البته اثر کاهش حجم تنها در لیپمی های شدید (بیش از 1500 mg/dL) قابل توجه است.
- **اثر مربوط به دو بخشی شدن نمونه:** پس از جداسازی سرم و پلاسما از خون، قسمت عمده چربی در بالای نمونه قرار می گیرد و به تبع آن آنالیت های محلول در چربی مثل بسیاری از داروها و هورمون‌های محلول در چربی در این بخش غلظت بیشتری خواهند داشت. از طرفی در بیشتر اتوآنالایزرها پروب دستگاه در فاصله معینی از سطح، نمونه بیمار را برای انجام آزمایش مکش می نماید. در نتیجه، عدم یکنواخت بودن مقدار آنالیت در کل نمونه ممکن است منجر به بروز خطا در گزارش غلظت آنالیت شود.



نکته: برای اندازه گیری آنالیت های محلول در چربی (مثل هورمونهای تیروئیدی) بهتر است قبل از دادن نمونه به دستگاه آن را هموژن نمود.

- **سایر مکانیســـم ها:** چربی بالا می تواند در الگوهای گزارش جواب روش های کروماتوگرافی و الکتروفورز اختلال ایجاد کند. مثلا چربی ها می توانند قله هایی را در ناحیه پره آلبومین، آلبومین و آلفاگلوبولین 1 و 2 در الکتروفورز پروتئین های سرم به وجود آورده و درصد آنها را تغییر دهند.

همچنین لیپیدها از طریق پوشاندن محل اتصال Ag به Ab و در نتیجه مهار تشکیل کمپلکس Ag-Ab در روشهای ایمونواسی اختلال ایجاد می کنند.

نکته: چربی بالا از طریق تغییر در فسفولیپیدهای غشا سبب استعداد RBC ها برای لیز می شود و وجود همزمان لیپمی و لیز نمای خاص شیـر توت فرنگی (strawberry milk) به نمونه می دهد.

❖ **حذف چربی از نمونه های لیپمیک:**

اگر چه در بسـیاری از بیماران سـرپایی با رعایت ناشتایی مناسب می توان از لیپمیک شدن نمونه جلوگیری نمود ولی در برخی از بیماران این امکان وجود ندارد. مثلا در بیماران بستری، اورژانس، پانکراتیت، اختلالات متابولیک و نارسایی کلیه ممکن است نمونه مورد آزمایش به ناچار لیپمیک بوده و در نتایج آزمایشات تداخل ایجاد نماید. برخلاف نمونه های لیز می توان چربی را از نمونه بیمار جدا کرده و مانع از بروز تداخل گشت.

روش های جداسازی چربی شامل :

1- اولتراسانتریفیوژ (200,000 g): اگرچه روش گلد استاندارد است ولی در دسترس نمی باشد.

2- سانتریفیوژهای با سرعت بالا (تا 20000 g): روش مناسبی برای اکثر آزمایشگاه ها می باشد.

3- مواد تجاری حلال چربی : به دلیل تاثیر بر طیف وسیعی از آنالیت ها به طور روتین توصیه نمی شوند.

نکته: در مواردی که نمـونه لیپمیـک است و آزمایش بر روی آنالیت های محلول در چربی مثل برخی داروها (بنزودیازپین ها) و هورمون ها (هورمون های تیروئیدی) درخواست شده است این آزمایشات را باید **پیش از** حذف لیپید انجام داد.

ایکتر (Icterus):

غلظت خونی بیلی روبین توتال در حالت طبیعی کمتر از 1.2 mg/dl است. زمانی که مقدار آن بیشتر از 2 بشود باعث تغییر رنگی قابل تشخیص در پلاســـما می گردد. از نظر بالینـــی ایکتـــر به بیلی روبین بالای 4.9 mg/dL اطلاق می شود. بیلی روبین بالا یک مداخله گر مهم بوده و بر طیف وسیعی از آزمایشات شامل آنزیم ها (ALT, ALK-P, CK, lipase)، الکترولیت ها، متابولیت ها (urea, creatinine , glucose)، لیپیدها (تری گلیسیرید، کلسترول)، پروتئین ها (Albumin, Total proteins, IgG)، هورمون ها (estradiol, beta-HCG, FT3) و حتی سطح خونی داروها (Gentamicin, Phenobarbital, Theophylline Tobramycin) تاثیر می گذارد. نوع و شدت این تاثیر با توجه به سطح بیلی روبین خون، نوع آن (کونژوگه یا غیرکونژوگه)، روش اندازه گیری، کیت و دستگاه مورد استفاده متفاوت می باشد. در حالی که یک روش و یا کیت اندازه گیری ممکن است نسبت به اثرات تداخلی بیلی روبین بالا کاملا مقاوم باشد، روش آزمایش و یا کیت دیگری می تواند نسبت به اثر بیلی روبین حساس بوده و موجب بروز خطا در نتایج شود. علی‌رغم وجود این باور عمومی که روش‌های آنزیمی معمولا نسبت به اثرات مداخله گرها حساسیت کمتری دارند ولی مطالعات زیادی نشان داده که در حضور بیلی روبین بالا ممکن است روش های آنزیمی حتی تاثیر پذیری بیشتری داشته باشند.

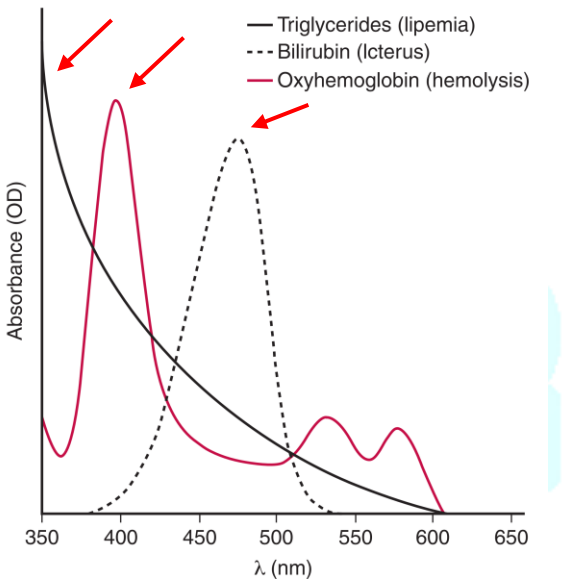
مکانیسم‌های تداخل بیلی روبین بالا در آزمایشات شامل موارد زیر است:

- **جذب نوری:** بیشترین جذب نوری بیلی روبین بین 400 و 540 نانومتر می باشد.

شیمیایی: در روش‌هایی که H_2O_2 به عنوان واکنش واسطه ای وجود دارد بیلی‌روبین بالا باعث یک بایاس منفی در نتیجه آزمایش می شود (مثـــل گلوکز، کلســـترول، تری گلیسیرید، اسید اوریک) همانند نمونه همولیز امکان حذف موثر بیلی روبین از نمونه وجود ندارد. استفاده از بلانک، بیلی روبین اکسیداز، رقیق کردن نمونه و به کار بردن روش اندازه گیری و کیت با حساسیت کمتر نسبت به اثر تداخلی بیلی روبین توصیه می گردد.

نکاتی در مورد این سه مداخله گر مهم:

بیشترین جذب نوری هموگلوبین، بیلی روبین و تری گلیسیرید بین 300 تا 600 نانومتر است و این دقیقا طول موج هایی را شامل می‌شود که در روش های آزمایشگاهی اسپکتروفتـــومتریک مورد استفاده قرار می گیرند. این موضوع دلیل یکی از مکانیسم های تاثیر این سه مداخله کننده شایع و مهم می باشد و استفاده از بلانک می تواند تا حدودی اثر آن را کاهش دهد.



همولیز و ایکتـر بودن موجب تغییـر رنگ و لیپمی باعث کدورت نمونه می شود. اگر چه این تغییر رنگ یا کدورت با چشم قابل تشخیص است ولی تعیین شدت تاثیر بر نتیجه آزمایش تنها با بررسی چشمی نمونه توسط پرسنل آزمایشگاه قابل اعتماد نبوده و توصیه نمی شود. اتوآنالایزرهای جدید با اندازه گیری میزان جذب نوری نمـــونه در طول موج های مخـتلف ایندکسی را گـــزارش می کنند که نشان دهنده میزان وجود این مداخله گرها در نمونه است. این ایندکس بسیار قابل اعتمادتر از بررسی چشمی نمونه می باشد، اگر چه نقایصی مثل عدم تشخیص سایر مداخله-گرها مانند پاراپروتئین ها، مواد حاجب اشعه و داروها همچنان وجود دارد. در روش ها و کیت های مورد استفاده در آزمایشگاه اطلاعاتی در مورد حداقل غلظت ماده مداخله‌گر برای تاثیر بر نتیجه آزمایش و نوع اثر آن توسط شرکت سازنده ارائه می شود. باید دقت نمود این اطلاعات تنها زمانی قابل اعتماد است که توسـط خود آزمایشـگاه مورد تصدیق (verification) قرار گیرد. ضـــروری است که آزمایشگاه دستورالعمـــل مشخصی در مورد مکانیسم تشخیص وجود مداخله گر، شدت آن و نیز نحوه برخورد و مدیریت آن داشته باشد. باید میزانی از عامل تداخل کننده که سبب رد نمونه و درخواست نمونه جدید می شود تعریف شده و در صورت قبول نمونه (به دلیل کم بودن سطح عامل مداخله گر و تاثیر آن بر نتایج تست ها)، وجود عامل مداخله گر به صورت کامنت (توضیح) در برگه گزارش جواب ثبت و به اطلاع پزشک رسانده شود.

پارا پروتئین ها (Paraproteins)

در بیماری هایی مثل مالتیپل میلوما یا والدنستروم سطح خونی آنتی بادی ها به میزان زیادی افزایش یافته و با مکانیسم های زیر تداخل ایجاد می نماید:

- **رسوب :** در طی فرایند آزمایش و بسته به روش اندازه گیری ممکن است به واسطه تغییر PH و یا به کار بردن برخی ریجنت ها پروتئین رسوب کرده و در فرآیند آزمایش تداخل ایجاد کند.

- **اتصال به اجزای آزمایش:** مثل اتصال آنتی بادی IgM به ذرات لاتکس و افزایش کاذب نتایج CRP و ASO در بیماران مبتلا به مالتیپل میلوما
- **اثر کاهش حجم:** همانند لیپمیک بودن نمونه، محاسبه غلظت آنالیت بر پایه حجم کل نمونه ممکن است موجب خطا در اندازه گیری شود. در مواردی که میزان پروتئین توتال سرم بیش از 10gr/dl و یا کمتر از 4gr/dl باشد، برای اندازه گیری الکترولیت ها بهتر است از روش ISE مستقیم استفاده شود، در غیر این صورت بخصوص در مورد سدیم ،با افزایش پروتئین کاهش کاذب و با کاهش پروتئین افزایش کاذب غلظت الکترولیت مشاهده خواهد شد.
- **افزایش ویسکوزیته:** سبب اختلال در برداشتن میزان صحیح حجم نمونه در فرآیند آزمایش و در نتیجه خطا می گردد.

جدول زیر برگرفته از کتاب تیتز تعدادی از تستهای مهم را که تحت تاثیر وجود پاراپروتئینمی قرار می گیرند نشان می دهد:

TABLE 5.9 Paraprotein Interference With Different Assays

Group of Analytes	Molecule
Enzymes	Alkaline phosphatase[217]
	Gamma-glutamyl transferase[218]
	Lactate dehydrogenase[217]
Electrolytes, minerals, and microelements	Calcium[219]
	Inorganic phosphorus[220–224]
	Iron[225]
Metabolites	Bilirubin[226–229]
	Cholesterol[226,230,231]
	Creatinine[230]
	Glucose[218]
	Urea[232]
	Uric acid[217]
Proteins	C-reactive protein[230,233,234]
	IgA, IgG[235]
Hormones	Thyroid-stimulating hormone[236,237]
	Human chorionic gonadotropin[236]
Drugs	Gentamicin[238]
	Vancomycin[238–241]
	Valproic acid[238]
	Phenytoin[242]
Cardiac markers	Troponin I[236]
Tumor markers	α-Fetoprotein[236]
	CA-125[236]

❖ در چه مواردی احتمال حضور پاراپروتئین ها در نمونه مطرح می باشد؟

وجود سابقه بالینی و شرح حال بسیار کمک کننده است. ممکن است برخی اتوآنالایزرهای جدید قابلیت اعلام هشدار وجود یک عامل مداخله گر را داشته باشند. وجود نتایج آزمایشاتی مثل پروتئین توتال خیلی بالا و یا نمای اختصاصی مولتیپل میلوما در الکتروفورز پروتئین های سرم، آزمایشگاه را به وجود این مداخله‌گر راهنمایی می کند. بعضی نتایج غیرعادی آزمایشات نیز باید ظن وجود پاراپروتئین ها را در کارکنان آزمایشگاه به وجود آورد. مثل منفی خواندن همزمان چند تست توسط اتوآنالایزر (به دلیل ویسکوزیته بالای نمونه) و نیز وجود نتایج غیرممکنی مثل سطح آلبومین بیشتر از پروتئین توتال یا بیلی روبین دایرکت بیشتر از توتال در سرم.

❖ برای حذف اثر تداخلی پاراپروتئین ها موارد زیر توصیه شده است:

- استفاده از دستگاهی با روش اندازه گیری متفاوت (روش های مختلف حساسیت های متفاوتی نسبت به اثر تداخلی پاراپروتئین ها دارند).
- رسوب دادن پروتئین های نمونه قبل از انجام آزمایش با موادی مثل PEG، اتانول و آمونیوم سولفات (ممکن است بر روی برخی تست ها اثر نامناسب داشته باشد).
- رقیق کردن سریالی نمونه (می تواند در کاهش اثر تداخلی موثر باشد).
- فیلتر کردن نمونه (با استفاده از فیلترهای خاص، پروتئین ها حذف می شوند).

منابع:

1. Tietz Text Book of Laboratory Medicine, Seventh Edition
2. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Twenty-Fourth Edition