

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

RENATA VALH PINTAR

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2013

Univerza v Ljubljani



Fakulteta za farmacijo

RENATA VALH PINTAR

**VREDNOTENJE STOPNJE HEMOLIZE PRI MERITVAH
KALIJA V KRVNIH SERUMIH IN
VZORCIH ZA PLINSKO ANALIZO**

**EVALUATION OF THE DEGREE OF HEMOLYSIS IN
MEASUREMENTS OF POTASSIUM IN SERUM SAMPLES
AND FOR GAS ANALYSIS**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Magistrsko nalogo sem opravila v Laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo, Klinike Golnik – Univerzitetna klinika za pljučne bolezni in alergijo Golnik, pod vodstvom mentorja, prof. dr. Boruta Božiča in somentorice doc. dr. Pike Meško Brguljan.

ZAHVALA

Na svetu si, da gledaš SONCE.

Na svetu si, da greš za SONCEM.

Na svetu si, da sam SI SONCE

in da s sveta odganjaš – SENCE.

(Tone Pavček)

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Božiču in somentorici doc. dr. Piki Meško Brguljan za izkazano pomoč in nesebične nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Hvala družini za podporo pri mojem študiju, prijateljem za vse vzpodbudne besede ter sodelavcem Laboratorija za klinično biokemijo in hematologijo Univerzitetne klinike Golnik za pomoč v laboratoriju in pri izdelavi magistrske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo z naslovom *Vrednotenje stopnje hemolize pri meritvah kalija v krvnih serumih in vzorcih za plinsko analizo* samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča in somentorstvom doc. dr. Pike Meško Brguljan.

Podpis:

Ljubljana, 2013

Predsednik komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc

Mentor: prof. dr. Borut Božič

Somentor: doc. dr. Pike Meško Brguljan

Član: doc.dr. Robert Roškar

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA LABORATORIJSKE PREISKAVE	1
1.2. LABORATORIJSKI PROCESI	2
1.2.1. NAPAKE V PREDANALIZNI FAZI	2
1.3. INTERFERENCE V LABORATORIJSKI MEDICINI	4
1.3.1. HEMOLIZA	4
1.3.1.1. VZROKI HEMOLIZE PRI ODVZEMU IN PO ODVZEMU KRVÍ	4
1.3.1.2. VPLIV HEMOLIZE NA LABORATORIJSKE PREISKAVE	5
1.4. PLINSKA ANALIZA KRVÍ	6
1.4.1. PREDANALIZNA FAZA PLINSKE ANALIZE	7
1.4.2. ANALIZNA FAZA PLINSKE ANALIZE	7
1.5. KALIJ	8
1.6. DOLOČANJE INTERFERENC (hemoliza, ikteričnost, lipemija)	9
2. NAMEN NALOGE	12
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1. VZORCI: humani serum in plazma	13
3.2. OPREMA IN MATERIALI	13
3.2.1. ANALIZATOR IN PRIBOR	13
3.2.2. REAGENTI	14
3.3. METODE DELA	14
3.3.1. POSTOPEK MERJENJA HEMOLIZE V HUMANEM SERUMU	14
3.3.2. POSTOPEK MERJENJA HEMOLIZE V VZORCU POLNE KRVÍ	15
3.3.3. OBDELAVA PODATKOV	16
4. REZULTATI	18
4.1. REZULTATI HEMOLIZIRANIH VZORCEV V HUMANEM SERUMU	18
4.2. REZULTATI INDEKSA HEMOLIZE V PLINSKI ANALIZI KRVÍ	21
4.3. REZULTATI KORELACIJE S-KALIJA	24
4.4. REZULTATI VERJETNOSTI	27
5. RAZPRAVA	28
6. SKLEPI	34
7. LITERATURA	35

SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
GIT	gastrointestinalni trakt
Hb	hemoglobin
HI	indeks hemolize
HIL	indeks hemolize, ikteričnosti in lipemije
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
LDH	laktatna dehidrogenaza

POVZETEK

Med najpomembnejše interference laboratorijskih preiskav spadajo hemoliza, lipemija, ikteričnost. Hemolizo definiramo kot sproščanje komponent iz eritrocitov in drugih krvnih celic v ekstracelularni prostor krvi. Za izboljšanje kakovosti v predanalizni fazi je bila oblikovana v Laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo Univerzitetne klinike Golnik študija na temo hemolize, katere del je tudi pričujoča naloga. Namen našega dela je bil ugotoviti vpliv subjektivne ocene hemolize pri vzorcih humanega seruma. V raziskovalno delo smo vključili humane serume iz obdobja 2010/2011 ($n=30.086$), humane serume iz leta 2012 ($n=32.907$) ter vzorce polne krvi z naročeno plinsko analizo krvi ($n=300$). Vsi vzorci so bili od preiskovancev, ki so bili hospitalizirani ali na dnevni obravnavi. Z »*in vitro*« testom smo semi-kvantitativno določali indeks hemolize (HI) v humanem serumu na analiznem sistemu. Poskusno smo pričeli z avtomatsko meritvijo HI centrifugiranih vzorcev polne krvi pri preiskovancih, ki so imeli naročeno plinsko analizo krvi ali kritičen profil iz polne krvi. V letu 2010/2011 je bilo glede na subjektivno oceno hemolize v vzorcih zavrženih le 56 serumskih vzorcev namesto 1.105 serumskih vzorcev. V letu 2012 po uvedbi merjenja HI je bilo 1.443 hemoliziranih vzorcev avtomatsko zavrženih, subjektivno smo zavržili le 80 serumskih vzorcev. Pri 1.443 hemoliziranih vzorcih ($HI > 0,16 \text{ g/L}$) vrednosti S-kalija nismo izdali. Pri teh preiskovancih smo zahtevali nov odvzem vzorca. Ponovili smo meritve S-kalija iz nehemoliziranega vzorca ter ugotovili, da hemoliza vpliva na vrednost S-kalija v humanem serumu. Korelacijski koeficient $r = 0,7$ ($p < 0,001$). Uporaba avtomatiziranih sistemov je smiselna, saj se tako izognemo subjektivni oceni hemolize vzorca. Glede na porazdelitev hemoliziranih vzorcev po bolnišničnih oddelkih prevladuje Oddelek za intenzivno terapijo in nego, kar je verjetno posledica težkega odvzema vzorca zaradi narave bolnikov.

V drugem delu naloge smo ugotovili, da je 80 % vrednosti HI v plazmi plinske analize krvi $< 0,16 \text{ g/L}$. Nobeden od vzorcev plazme polne krvi za plinsko analizo pa ni presegel $HI > 0,6 \text{ g/L}$. Centrifugiranje in vizualni pregled plazme iz polne krvi za plinsko analizo nista smiselna.

ABSTRACT

Some of the most important interferences of laboratory tests are haemolysis, lipemia, icterus. Haemolysis is defined as the release of components from erythrocytes and other blood cells in the extracellular area of blood. To improve the quality in the pre-analysis phase, in the Laboratory of Clinical Biochemistry and Haematology of the University Clinic for Respiratory and Allergies Diseases Golnik we conducted a study on haemolysis, which also includes this thesis. The purpose of our work was to determine the influence of the subjective assessment of haemolysis in human serum samples. In the research work we included human serums from the period 2010/2011 ($n=30.086$), human serums from 2012 ($n=32.907$) and whole blood samples with the ordered blood gas analysis ($n=300$). All samples originated from examined subjects, who were hospitalized or admitted for single-day treatment. Using the «*in vitro*» test we semi-quantitatively determined the haemolysis index (HI) in human serum on the analytical system. As an experiment, we conducted automatic measurements of HI of centrifuged whole blood samples in examined subjects, who had been appointed for blood gas analysis or critical profile from whole blood. In 2010/2011, with regard to the subjective assessment of haemolysis, only 56 serum samples were rejected instead of 1.105 serum samples. In 2012, after the introduction of the measurement of HI, 1.443 haemolysed samples were automatically rejected, whereas we subjectively rejected only 80 serum samples. In 1.443 haemolysed samples ($HI > 0,16$ g/L) we did not reveal the value of S-potassium. In these examined subjects we requested for a new sample to be taken. We repeated the measurements of S-potassium from the non-haemolysed sample and determined that haemolysis affects the value of S-potassium in human serum. The correlation coefficient $r = 0,7$ ($p < 0,001$). The use of automated systems is a good option, because we can avoid subjective assessment of the haemolysis of the sample. As regards the distribution of haemolysed samples throughout hospital departments, the Department for Intensive Care and Therapy appears to dominate, which is probably the results of a challenging sample-taking procedure because of the nature of patients.

In the second part of the thesis we determined that 80% of HI value in the plasma of blood gas analysis $< 0,16$ g/L. None of the whole blood plasma samples for gas analysis exceeded $HI > 0,6$ g/L. Centrifugation and visual inspection of plasma from whole blood are not necessary to gas analysis.

1. UVOD

1.1. DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA LABORATORIJSKE PREISKAVE

Pri laboratorijskem delu imajo pomembno vlogo fiziološki, biološki in okoljski dejavniki, ki povzročajo spremembe *«in vitro»* ali *«in vivo»* in različno vplivajo na posamezne laboratorijske analize (1,2). Vpliv **fizioloških dejavnikov** lahko razdelimo na dve skupini: eksogene (tiste, na katere lahko vplivamo) in endogene (tiste, na katere nimamo vpliva) (3).

Eksogeni dejavniki:

So dejavniki, ki na rezultate vplivajo kratek čas (spreminjajo se iz dneva v dan):

- vpliv prehrane,
- vpliv fizičnega napora,
- vpliv alkohola, kajenja in zdravil,
- vpliv položaja telesa,
- čas odvzema krvi,
- terapevtski in diagnostični postopki.

Endogeni dejavniki:

- rasa,
- spol,
- starost,
- nosečnost,
- dedni dejavniki (2,3).

Dogajanje v našem telesu poteka tako, da se koncentracija analitov spreminja med maksimalno in minimalno vrednostjo. Vsa ta dogajanja potekajo v določenih časovnih intervalih, ki jih imenujemo **biološki ritmi**. Biološke ritme imenujemo po trajanju periode in od vseh so v klinični kemiji najbolj pomembni cirkadialni ritmi. Ti imajo periodo dolgo približno en dan. Poznamo še ultradialne ritme, ki imajo periodi krajšo od enega dneva in infradialne ritme, ki imajo periodo daljšo kot en dan. Biološki ritmi vplivajo na presnovne procese, tako katabolne kot anabolne. Oboji potekajo sočasno, vendar v budnem času prevladujejo katabolni, med spanjem pa anabolni procesi (1,4).

Na vrednost laboratorijskih preiskav vplivajo tudi **okoljski dejavniki**. Poleg kraja, zemljepisne širine, osončenja (UV), onesnaženosti življenjskega in bivalnega okolja, nadmorske višine bivanja preiskovanca, ima pomemben vpliv tudi prostor za odvzem

biološkega vzorca. Vpliv stresa lahko oteži odvzem vzorca, zato naj bo prostor za odvzem biološkega vzorca varen, primerne temperature in vlage (5).

1.2. LABORATORIJSKI PROCESI

Proces laboratorijske diagnostike lahko razdelimo v predanalizno, analizno in poanalizno fazo. **Predanalizna faza** zajema vse od odločitve za odvzem vzorca, odvzem vzorca, v nekaterih primerih tudi shranjevanje in transport vzorca. Šteje med največje izzive laboratorijskim strokovnjakom (6,7). Žal pa niso v celoti standardizirane, niti usklajene po vsem svetu. Prične se z naročilom laboratorijskih preiskav in se nadaljuje s pripravo preiskovanca na odvzem, odvzem biološkega materiala, pravilnim transportom vzorca do laboratorija, ter ustrezno pripravo odvzetega materiala za analizo (8). Poteka tako v laboratoriju, kot izven njega, zato je poleg laboratorija vključeno tudi drugo medicinsko osebje, ki pomembno vpliva na kakovost laboratorijskih preiskav.

V **analizni fazi** poteka analiza vzorcev. Pomembno je, da vsak laboratorij spremlja kakovost svojega dela. Potrebno je vzdrževanje in ustrezno kalibriranje analizatorja ter vodenje kontrol kakovosti. To dosežemo z izvajanjem stroge notranje ocene kakovosti in s sodelovanjem v dobro načrtovani zunanji oceni kakovosti. **Poanalizna faza** obsega sporočanje in interpretacijo rezultatov, ter ukrepanje v obravnavi preiskovancev.

1.2.1. NAPAKE V PREDANALIZNI FAZI

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) je izdal več standardov v zvezi z odvzemom krvi in vzorcev, ter prevozom in rokovanjem. Skladnost s temi smernicami je nizka, še posebej v primerih, kjer kri zbirajo izven laboratorija in brez neposrednega nadzora laboratorijskega osebja. Standardizacijo je mogoče doseči z upoštevanjem razpoložljivih smernic, izvajanjem celotnega sistema vodenja kakovosti, ki vključuje predanalizne zahteve in stalno izobraževanje laboratorijskega osebja. Predanalizna napaka pomeni vsako napako, ki se zgodi z biološkim materialom pred samo laboratorijsko analizo. Večina predanaliznih napak se zgodi pred samim sprejemom biološkega materiala v laboratorij, kjer pa jih je potrebno prepoznati in tudi uspešno reševati (9-11). Napaka pri naročilu lahko zajema napačno identifikacijsko številko naročila oz. odsotnost identifikacije naročnika, neoznačenost vseh želenih preiskav ali označenost napačnih preiskav, ter prepozno naročilo preiskave (12). Pri odvzemu biološkega materiala so najpogostejše napake nepravilna izbira epruvet ali izbira neprimerne materiala za odvzem. Lahko se zgodi, da se ne odvzame ustrezen vzorec za naročeno preiskavo.

Pomembna sta odvzem ustreznega volumna vzorca v epruveto z antikoagulantom in upoštevanje časa odvzema. Pri samem odvzemu krvi so najpogostejše napake: mokro vbodno mesto po odvzemu, predolgo nameščena žilna preveza, nastanek hematoma in premočno mešanje epruvet po odvzemu (13,14). Pri transportu je potrebno upoštevati temperaturno obstojnost analitov. Večina parametrov je obstojna na sobni temperaturi, za nekatere pa veljajo posebni pogoji. Takšne vzorce je potrebno transportirati npr. na ledu (ledena kopel) ali pri 37°C v termostatski posodi. Presnova ter izmenjava v celicah poteka med celicami in plazmo tudi po odvzemu vzorca in vitro. Pomembno je, da sta plazma oz. serum ločena najkasneje v dveh urah po odvzemu, zato čas prenosa vzorca ne sme biti predolg (3). Če določamo v serumu ali plazmi kalij, adenokortikotropni hormon, kortizol, kateholamine, laktat ali homocistein, mora biti kri centrifugirana v prej kot dveh urah po odvzemu (15). Vzorce pustimo v primarni epruveti, da spontano in popolno koagulirajo. Spontana in popolna koagulacija poteče običajno v 30 do 60 minutah pri sobni temperaturi. Če čas koagulacije ni zadosti dolg, lahko latentni fibrin povzroča težave pri analizi. Koagulacijo pospešimo z aktivatorjem. Če uporabimo trombin, lahko kri centrifugiramo po približno 2 do 5 minutah po odvzemu (1). Nekatere preiskave zahtevajo polno, necentrifugirano kri. Teh vzorcev ne centrifugiramo. Prav tako ne centrifugiramo epruvete s krvjo, ki jo potrebujemo za analizo krvnih celic. Čas koagulacije se spreminja, če ima bolnik antikoagulantno terapijo. Ohlajene vzorce (2-8°C) moramo vzdrževati pri tej temperaturi do centrifugiranja in centrifugirati v hladilni centrifugi. Epruveta s krvjo mora biti ves čas zamašena. Če epruveto odpremo, so lahko nekateri rezultati napačni (povišan pH, zmanjšana aktivnost kisle fosfataze). Z zaprto epruveto preprečimo zunanje onesnaženje vzorca, razlitje in izhlapevanje (16). Biološki material shranjujemo na primerni temperaturi in na način, ki je določen s stabilnostjo posameznega analita (3). Velja, da so nekateri analiti obstojni od 2 do 14 dni pri temperaturi 2-8°C in sobni temperaturi. Vendar pa včasih sobna temperatura nad 22°C ni primerna za stabilnost. V literaturi se priporoča, naj odlita plazma oz. serum ne ostaneta pri temperaturi 22°C dlje kot osem ur. Če analiza ni končana v osmih urah, shranjujemo serum oziroma plazmo v hladilniku pri 2-8°C. Če določitev ni zaključena v 48 urah, ali če moramo serum oz. plazmo shranjevati dlje kot 48 ur, potem serum oziroma plazmo zamrznemo pod -20°C (16). Vzorce lahko odmrznemo samo enkrat. Pri večkratnem zamrzovanju in odmrzovanju vplivajo temperaturne spremembe na vrednosti določitev nekaterih analitov v vzorcu.

1.3. INTERFERENCE V LABORATORIJSKI MEDICINI

Interference pred analizo in med analizo vzorca vplivajo na tak način, da rezultat ne odgovarja dejanski koncentraciji ali aktivnosti analita. Na **sliki 1** so prikazane najpomembnejše interference, med katere spadajo hemoliza, lipemija, ikteričnost. Razlikujemo interference «*in vivo*» in «*in vitro*». Med interference «*in vivo*» sodijo tiste, ki so odvisne od fiziološkega stanja preiskovanca. Interference «*in vitro*» niso odvisne od fiziološkega stanja preiskovanca in nastajajo v procesih, ki se dogajajo v samih postopkih med odvzemom ali po njem. Snovi iz vzorca reagirajo bodisi s kemičnimi reagenti, ki jih uporabljamo za analizo, ali posnemajo fizikalne, spektralne ali kromatografske lastnosti analita, ki ga želimo določiti (3).



Slika 1: Prikaz ikteričnosti, lipemije in hemolize.

1.3.1. HEMOLIZA

Hemolizo definiramo kot sproščanje komponent iz eritrocitov in drugih krvnih celic v ekstracelularni prostor krvi. Po centrifugiranju ga opazimo v neikteričnih vzorcih kot rdeče obarvanje plazme ali seruma, ki jo povzroči prosti hemoglobin, ko je njegova koncentracija večja kot 0,3 g/L. Razlikujemo dve vrsti hemolize:

- «*in vivo*»: do hemolize lahko pride zaradi hemolitičnega sindroma ali transfuzijske reakcije, vzrok za hemolizo so lahko protitelesa, zdravila, toksične snovi, dedni dejavniki, encimske napake in infekcije (malarija). Pomembno je, da pred odvzemom krvi preverimo bolnikov zdravstveni status, ter zbiramo več vzorcev bolnika in če so vsi hemolizirani, je velika verjetnost «*in vivo*» hemolize.
- «*in vitro*»: vzroki hemolize so lahko vse stopnje predanalizne faze (odvzem vzorca, transport, shranjevanje, centrifugiranje...) (1,4).

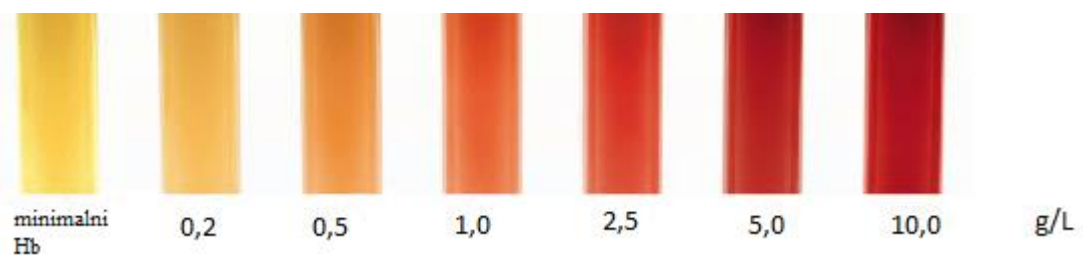
1.3.1.1. VZROKI HEMOLIZE PRI ODVZEMU IN PO ODVZEMU KRVİ

Vzrokov je lahko več, od odvzema krvi na poškodovanem mestu (hematom) do tega, da vbočno mesto po razkuževanju ni popolnoma suho. Do hemolize lahko pride tudi pri

premočnem stresanju epruvet ali do intravaskularne hemolize zaradi predolge kompresije vene. Ekstravaskularna hemoliza je lahko posledica turbulentnega toka zaradi premočne aspiracije, nepravilne namestitve epruvete, delne zamašitve venskega ali arterijskega katetra, premočnega mešanja oz. ne mešanja vzorcev krvi. Vzroki so tudi centrifugiranje vzorca, preden je potekla popolna koagulacija ter zmrzovanje in odmrzovanje polne krvi. Za zmanjšanje vzrokov hemolize pri odvzemu krvi je potrebno oceniti velikost igle glede na stanje bolnika in uporabiti standardizirane epruvete (17), pri prisotnosti hematoma je potrebno izvesti odvzem krvi čim dlje od hematoma, vbodno mesto mora biti popolnoma suho, podvezo je potrebno sprostiti najkasneje v minuti po namestitvi (18). Pri transportu krvi lahko pride do hemolize zaradi ekstremnih temperatur ter neprimerne časa transporta. Pripraviti je potrebno material za transport po standardih: kontrolirati temperaturo v transportni posodi, ločiti serum oz. plazmo od celic najmanj 2 uri po zbiranju krvi. Priporočena je uporaba gelskih epruvet (18,19).

1.3.1.2. VPLIV HEMOLIZE NA LABORATORIJSKE PREISKAVE

Hemoliza vpliva na kemične reakcije v analiznem postopku, ko se vsebina eritrocitov sprosti v plazmo ali serum in s tem povzroči zvišanje analitov, katerih koncentracija v celicah je višja kot v zunajceličnem prostoru (npr. K^+) (20). Na **sliki 2** je prikazana lestvica različnih koncentracij hemoglobina v razponu od minimalnega hemoglobina ($< 0,2$ g/L), pa do 10 g/L. V **preglednici I** pa so povzeti dejavniki, ki lahko povzročajo hemolizo in dejavniki, ki verjetno ne povzročajo hemolize.



Slika 2: Približna koncentracija hemoglobina v serumu (21).

Preglednica I: Dejavniki, ki vplivajo na hemolizo. Rdeče obarvani dejavniki: lahko povzročijo hemolizo, črno obarvani dejavniki: verjetno ne povzročijo hemolize (22).

BOLNIKI	FLEBOTOMIJA (ODVZEM KRV)	TRANSPORT VZORCEV	OBDELAVA VZORCEV	ANALIZA	SHRANJEVANJE VZORCEV
identifikacija bolnika	odvzem venske krvi	poreklo vzorca (sprejemna ambulanta, intenzivna enota...)	verificirane epruvete	predolg čas do analize po centrifugiranju	ponovno centrifugiranje že shranjenega vzorca
in vivo hemoliza: presnovne motnje (npr. jeterne bolezni) kemični vplivi (npr. zdravila) fiziološki vplivi (npr. mehanska srčna zaklopka) infekcije (npr. bakterije)	kapilarni odvzem	bolnišnični odvzem	ID številka	serum/plazma/ polna kri	temperatura hranjenja
	preverjanje igle	odvzem zunaj bolnišnice	čas med odvzemom in centrifugiranjem	mešanje epruvet pred analizo	čas hranjenja
	položaj roke	odvzem pri osebnem zdravniku	tip centrifuge	ponovitev vzorca	
	mesto odvzema	horizontalen oz. vertikalen transport	kalibracija centrifuge	verificirane kontrole in kalibratorji	
	nepravilna uporaba razkužila	ceveni transport	nepravilna temperatura centrifugiranja	verificiran analizator	
	čas žilne preveze	kurirski transport	hitrost centrifugiranja	verificirani reagenti	
	težek odvzem	čas in temperatura trajanja transporta	čas centrifugiranja	referenčne vrednosti	
	stisnjena pest		slab gel		
	vrsta epruvete		celice na zamašku		
	neustrezen volumen krvi		ponovno centrifugiranje		
	vrstni red odvzema		avtomatsko odmaševanje		
	silovito stresanje oziroma ne mešanje krvi		aliquotiranje vzorcev in označevanje aliquotov		
			prehitro centrifugiranje		

1.4. PLINSKA ANALIZA KRV

V laboratorijski medicini je plinska analiza krvi urgentna preiskava, s katero dobimo pomembne podatke o kislinno bazičnem ravnoesju krvi bolnika, o funkcijskem stanju pljuč in prenašalni sposobnosti krvi za kisik. Novejši analizatorji omogočajo poleg meritev pH, pCO₂, pO₂ in saturacije tudi meritve koncentracije nekaterih elektrolitov in metabolitov v polni krvi (23). **Kritični profil** v Laboratoriju za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetne klinike Golnik zajema določitev elektrolitov (kalij, natrij, kloridi, ioniziran kalcij), laktata, glukoze in ioniziranega kalcija.

1.4.1. PREDANALIZNA FAZA PLINSKE ANALIZE

Predanalizna faza plinske analize zajema pripravo bolnika, odvzem, interference in ravnanje z vzorci pred analizo. Najprej preverimo identifikacijo bolnika, zagotoviti je potrebno stacionarno stanje ventilacije, vzorci morajo biti pravilno označeni in opremljeni s podatki ob odvzemu vzorca. Ob običajnih podatkih, ki so potrebni za pravilno klinično interpretacijo, lahko zajemajo tudi podatke, kot so: telesna temperatura, čas odvzema, ventilarni status, način ventilacije, mesto odvzema... Za plinsko analizo krvi je najprimernejša arterijska kri, odvzame se s punkcijo femoralne, humoralne ali radialne arterije. Kot antikoagulantno sredstvo uporabljamo soli heparina, ponavadi liofiliziran litijev heparinat, saj povzroča najmanj interferenc in je uporaben za merjenje elektrolitov. Pri odvzemu krvi za plinsko analizo so vključeni tudi drugi zdravstveni delavci. Kri se mora previdno premešati, da pride v stik z antikoagulantom, s čimer preprečimo tvorbo strdkov. Odvzeti se mora predpisan volumen krvi, saj lahko le tako zagotovimo ustrezne in predvidene učinke heparina oz. njegove nezaželenne vplive na parametre, ki jih želimo analizirati. Po odvzemu krvi v brizgi ne sme biti zraka. Med krvjo in slučajno prisotnim zračnim mehurčkom poteka izmenjava plinov, ki narašča s časom shranjevanja vzorca, intenzivnostjo stresa in zniževanjem temperature hranjenja. Po odvzemu krvi v celicah še vedno potekajo presnovni procesi, pri katerih se porablja kisik, nastaja ogljikov dioksid. Nehlapne kisline, ki nastajajo pri glikolizi, povzročajo spremembo pH vrednosti. S hlajenjem na 4 °C upočasnimo presnovne procese krvnih celic, ne zavremo pa prehajanja molekul plinov skozi steno plastičnih brizg. CLSI priporočila navajajo, da vzorcev, odvzetih v plastične brizge, ne smemo hladiti, pustiti jih moramo pri sobni temperaturi, analizirati pa najkasneje v 30 min po odvzemu krvi. Prenizka temperatura lahko povzroči hemolizo vzorcev in s tem napačne rezultate nekaterih parametrov plinske analize in drugih analiz v polni krvi (24-26).

1.4.2. ANALIZNA FAZA PLINSKE ANALIZE

Predpogoj za dobro izvedbo analize vzorca pa so vzporedni procesi, kot so vzdrževanje in ustrezno kalibriranje analizatorja ter vodenje kontrole kakovosti (24,26). Meritve potekajo na osnovi potenciometrije in amperometrije. Analizo hemoglobina in njegovih derivatov pa merimo z uporabo spektrofotometrije. *Potenciometrično* ugotavljamo koncentracijo analita na osnovi merjenja napetosti galvanskega člena, ki ga sestavljajo indikatorska elektroda, vzorec in referenčna elektroda. Potencial člena je enak razliki potencialov med indikatorsko in referenčno elektrodo. Referenčna elektroda ima znan potencial, ki mora biti

med merjenjem konstanten in neodvisen od sestave analita. Indikatorska elektroda se mora hitro in ponovljivo odzvati na koncentracijo merjene komponente. Pri *amperometriji* merimo tok pri konstantnem potencialu indikatorske elektrode. Ko se v tekočini pojavi elektroaktivna snov, ki reagira pri izbranem konstantnem potencialu na elektrodi, steče skozi elektrodo tok. Tokovni odziv je funkcija koncentracije. Pri *spektrometriji* za določitev koncentracije hemoglobina običajno uporabimo meritve pri več valovnih dolžinah (npr. 478-672 nm). Z uporabo matematičnih algoritmov in različnih ekstinkcijskih koeficientov določimo koncentracije derivatov hemoglobina (27,28). Analizatorje večinoma kalibriramo z dvema puferskima raztopinama in dvema različnima mešanicama plinov. Kontrolo kakovosti izvajamo s kontrolnimi materiali, ki so ponavadi vodne raztopine ali pa kontrole polne krvi z znanimi vrednostmi parametrov.

Kontaminacija z zračnimi mehurčki in prisotnost strdkov sta glavni nepravilnosti, ki lahko povzročita napake na merilni celici ali elektrodnih membranah. Pri vbrizgavanju vzorca v analizator lahko pri aspiraciji nastane zračni mehurček v preostalem vzorcu krvi, ki ga moramo nujno odstraniti zaradi morebitne ponovne analize. Meritev je treba ponoviti, če so rezultati neskladni z bolnikovimi preteklimi rezultati ali stanjem, pri internem neskladju, ter v območju ekstremnih odstopanj od pričakovanih vrednosti (29).

1.5. KALIJ

K^+ je glavni kation intracelularne tekočine. Kar 98 % se ga nahaja v celicah. V serumu je koncentracija nižja kot v celični plazmi, tudi v eritrocitih je koncentracija nekoliko nižja kot v ostalih celicah. Dnevno ga zaužijemo od 50-105 mmol. Za homeostazo v organizmu sta odgovorni ledvici, predvsem aldosteron, nekaj pa ga izločimo tudi z blatom. V celici ima K^+ številne fiziološke vloge. Pomemben je za vzdržnost živčnih in mišičnih celic. Pomembno je tudi razmerje kalija na obeh straneh celične membrane. Zato zvišane oz. znižane koncentracije kalija v plazmi lahko povzročijo nevarno srčno aritmijo in mišično paralizo.

Hipokaliemija (znižana koncentracija K^+ v serumu ali plazmi) je lahko posledica:

- zvečanega prehoda kalija v celice pri hiperinsulinemiji, zvečane koncentracije kateholaminov ter metabolne oz. respiratorne alkalozе,
- izgube kalija skozi ledvice (hiperaldosteronizem, renalna tubulna acidoza, diuretiki),
- izgube kalija skozi GIT (daljše bruhanje, diareja in uporaba laksativov),

- uporabe neustreznih analitičnih postopkov v primeru zmanjšane volumnske deleže vode v vzorcu (hiperlipidemija, hipervolemija),
- hipomagnezije (40% bolnikov z hipokalijemijo ima istočasno hipomagnezijo).

Hiperkaliemija (zvišana koncentracija K^+ v serumu ali plazmi) je posledica:

- poškodbe oz. lize celic (travma, operacijski posegi),
- zmanjšane prevzema kalija v celicah pri acidozah in hipoinsulinemiji,
- nezadostnega izločanja kalija skozi ledvice (hipoaldosteronizem),
- zvečanega vnosa kalija v organizem s hrano,
- uporabe neustreznih analitičnih postopkov v primeru zvečanega volumnske deleže vode v vzorcu (nosečnost, hipovolemija)
- predanalitične napake (hemoliza).

Koncentracije kalija merimo za potrebe diagnostike, da potrdimo oz. izključimo hiper oz. hipokaliemije (hipertenzija, srčna aritmija, uporaba diuretikov, laksativov, akutne in kronične ledvične odpovedi...) ter spremljanje in zdravljenje teh bolezni.

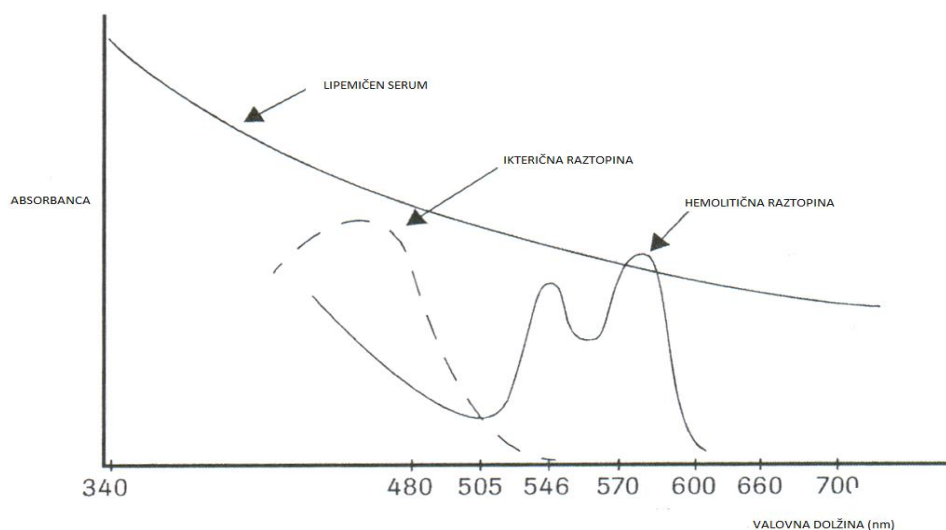
Referenčne vrednosti v serumu so od 3,8-5,5 mmol/L. Klinični znaki hipokaliemije, ki se pojavijo običajno pri koncentraciji < 3,0 mmol/L, vedno pa so prisotni pri koncentraciji < 2,5 mmol/L, so posledica zvečanega membranskega potenciala v mirovanju, ki zmanjša mišično vzdržnost. Pojavi se mišična paraliza in mišična slabost. Pride lahko do nevarnih srčnih aritmij in odpovedi srca. Hiperkaliemija je posledica zmanjšane membranskega potenciala v mirovanju. Zveča se mišična vzdržnost, pojavijo srčne aritmije, lahko tudi zastoj srca, pri višjih koncentracijah pa mišična paraliza in slabost. Koncentracija > 7 mmol/L povzroči srčni zastoj (30,31).

Referenčna metoda za merjenje K^+ je po priporočilih IFCC plamenska spektroskopija, ki se v vsakdanjem delu v laboratoriju ne uporablja več. V laboratorijski praksi uporabljamo potenciometrično elektroanalizno metodo. Ionsko selektivne elektrode prepuščajo samo določene ione, kar povzroči elektrokemijski potencial, ki je proporcionalen aktivnosti oz. koncentraciji merjenih ionov. Ione določamo iz umeritvene krivulje na podlagi meritve potenciala proti referenčni elektrodi (32).

1.6. DOLOČANJE INTERFERENC (hemoliza, ikteričnost, lipemija)

Z «*in vitro*» metodo lahko semi-kvantitativno določamo serumski indeks za lipemijo, hemolizo, ikteričnost (HIL) v človeškem serumu in plazmi na analitskem sistemu. Ne sme se uporabljati za kvantitativno določitev trigliceridov, hemoglobina ali bilirubinov.

Princip merjenja interferenc temelji na izračunu absorbance razredčenega vzorca pri dveh različnih valovnih dolžinah in zagotavlja semi-kvantitativno zastopanje stopnje lipemije, hemolize in ikteričnosti v serumu in plazmi vzorca. Na **sliki 3** je prikazan absorpcijski spekter za lipemičen serum, hemolitično raztopino in ikterično raztopino. Analizator vzame alikvot bolnikovega vzorca in ga razredči z 0,9 % NaCl in izmeri absorbanco za lipemijo na 660 nm (primarna valovna dolžina) in na 700 nm (sekundarna valovna dolžina), za hemolizo 570 nm (primarna valovna dolžina) in 600 nm (sekundarna valovna dolžina), za ikteričnost 480 nm (primarna valovna dolžina) in 505 nm (sekundarna valovna dolžina). Iz absorbanc analizator izračuna serumski indeks ob uporabi faktorjev (33).



Slika 3: Primer absorpcijskega spektra za lipemičen serum, hemolitično raztopino in ikterično raztopino (33).

IZRAČUN SERUMSKEGA INDEKSA:

$$L = \frac{1}{C} \cdot (Abs_1)$$

$$H = \frac{1}{A} \cdot (Abs_2 - B \cdot Abs_1)$$

$$I = \frac{1}{D} \cdot (Abs_3 - E \cdot Abs_2 - F \cdot Abs_1)$$

L,H,I.....serumski indeks za lipemijo, hemolizo, ikteričnost

C,A,D.....faktor za spremembo absorbance ($\times 10^4$) v serum indeks

Abs₁.....bikromatska absorbanca odčitana pri 700 in 660nm za lipemijo

Abs₂..... bikromatska absorbanca odčitana pri 600 in 570nm za hemolizo

Abs₃..... bikromatska absorbanca odčitana pri 505 in 480nm za lipemijo

B.....korekcija merjenega hemoglobina Abs₂ za lipemijo

E,F..... korekcija merjenega bilirubina Abs za lipemijo in hemoglobin (33)

2. NAMEN NALOGE

V Laboratoriju za klinično biokemijo in hematologijo Univerzitetne klinike Golnik smo z uvedbo analizatorja Cobas[®] Cobas 6000, Roche Diagnostics pričeli z merjenjem HI.

V prvem delu naloge je namen našega dela:

- ovrednotiti vpliv subjektivne ocene hemolize v vzorcih,
- ugotoviti porazdelitev hemoliziranih vzorcev po bolnišničnih oddelkih,
- ovrednotiti korelacijo S-kalija v humanem serumu pri hemoliziranem in nehemoliziranem vzorcu istega preiskovanca.

V drugem delu naloge je namen našega dela:

- ovrednotiti stopnjo hemolize v vzorcih polne krvi za plinsko analizo,
- ugotoviti smiselnost centrifugiranja in vizualnega pregleda plazme vzorca za plinsko analizo krvi,
- izračunati verjetnost, da se bo hemoliza nad opredeljeno mejo ($HI > 0,16 \text{ g/L}$) pojavila v naslednjih 100-tih vzorcih plinske analize krvi ter pri naročenem kritičnem profilu natanko 20-krat ob upoštevanju naših rezultatov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI: *humani serum in plazma*

V raziskovalno delo smo vključili 30.086 vzorcev (humani serum) iz obdobja 2010/2011 pred uvedbo avtomatskega merjenja HI. Vključili smo tudi 32.907 vzorcev (humani serum) iz leta 2012 po uvedbi avtomatskega merjenja HI. Humani serumi so vzorci preiskovancev, ki so bili hospitalizirani oz. ambulantni preiskovanci, ki so bili na dnevni obravnavi v Univerzitetni kliniki Golnik. Preiskovanci so mešana populacija, stara od 18 do 98 let. Rezultati oz. podatki od 3.5.2010 do 3.5.2011 so arhivirani v arhivu Univerzitetne klinike Golnik in zaradi preobsežnosti podatkov niso priloženi. Tudi podatki oziroma rezultati iz leta 2012 so arhivirani v arhivu Univerzitetne klinike Golnik in v informacijskem sistemu Labis.

Za avtomatsko meritev HI v polni krvi za plinsko analizo krvi smo uporabili dnevne vzorce preiskovancev, ki so imeli naročeno plinsko analizo krvi. Skupno število je bilo 300 vzorcev preiskovancev, ki so bili hospitalizirani oz. ambulantni preiskovanci, ki so bili na dnevni obravnavi v Univerzitetni kliniki Golnik. Gre za vzorce polne krvi (antikoagulat liofiliziran litijev heparinat) z naročeno plinsko analizo krvi. Preiskovanci so mešana populacija stara od 18 do 98 let.

3.2. OPREMA IN MATERIALI

3.2.1. ANALIZATOR IN PRIBOR

Biokemijski analizator: Cobas[®] Cobas 6000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija.

Kalijeva elektroda: Potassium electrode, Roche/Hitachi cobas c systems

Plinski analizator: Radiometer[®] ABL 800 Flex 825, Radiometer[®] ABL 800 Flex 835, Radiometer Medical ApS, Bronshoj, Danska.

Centrifuga: Rotina 38R, Hettich Megafuge, Andreas Hettich GmbH&Co KG, Tuttlingen, Nemčija.

Igla z brizgo za odvzem plinske analize krvi: Marquest Gaslyte[®], Trudell Medical Marketing Limited (TMML), London, Velika Britanija.

Drobni laboratorijski material in splošna oprema: pipete, nastavki za pipete, epruvete.

3.2.2. REAGENTI

Reagent: Serum Index Gen2, Roche/Hitachi cobas c systems.

Kontrole kakovosti: Precicontrol ClinChem Multi 1, Roche/Hitachi cobas c systems,
Precicontrol ClinChem Multi 2, Roche/Hitachi cobas c systems.

Kalibracijske raztopine: ISE Compensator, Roche/Hitachi cobas c systems,
ISE Low, Roche/Hitachi cobas c systems,
ISE High, Roche/Hitachi cobas c systems.

Delovne raztopine: ISE Internal standard, Roche/Hitachi cobas c systems,
ISE Reference electrolyte, Roche/Hitachi cobas c systems,
ISE Diluent Gen 2, Roche/Hitachi cobas c systems.

3.3. METODE DELA

V prvem delu naloge smo s pomočjo Cobas[®] Cobas 6000, Roche Diagnostics, določali HI pri hemoliziranih in nehemoliziranih vzorcih.

V drugem delu smo HI določali iz centrifugiranih vzorcev za plinsko analizo krvi.

3.3.1. POSTOPEK MERJENJA HEMOLIZE V HUMANEM SERUMU

Po odvzemu in transportu vzorca iz oddelka oz. ambulate smo vzorec identificirali po standardnih postopkih, ga centrifugirali 15 min pri 2150 x g in analizirali na aparatu Cobas[®] Cobas 6000, Roche Diagnostics (*slika 4*). Analizator vzame alikvot bolnikovega vzorca in ga razredči z 0,9 % NaCl, izmeri absorbanco za hemolizo pri 570 nm (primarna valovna dolžina) in pri 600 nm (sekundarna valovna dolžina). Iz absorbanc analizator izračuna serumski indeks ob uporabi faktorjev.



Slika 4: Biokemijski analizator: Cobas® Cobas 6000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija.

3.3.2. POSTOPEK MERJENJA HEMOLIZE V VZORCU POLNE KRVI

V drugem delu naloge smo obdelali vzorce polne krvi za plinsko analizo:

- vzorec plinske analize krvi smo počasi in previdno iztisnili v epruveto,
- vzorec smo centrifugirali pri 2150 x g 15 minut,
- prepipetirali smo v epruveto primerno za Cobas® Cobas 6000, Roche Diagnostics.

Analizator avtomatsko izmeri hemolizo z reagentom Serum Index Gen 2 (**slika 5**) ter izračuna absorbance razredčenega vzorca pri dveh različnih valovnih dolžinah (semi-kvantitativen izračun hemolize).



Slika 5: Reagent za merjenje HI: Serum Index Gen2 Roche/Hitachi cobas c systems.

3.3.3. OBDELAVA PODATKOV

Podatke oz. rezultate iz let 2010-2011 smo dobili s štetjem hemoliziranih vzorcev. Podatke oz. rezultate iz leta 2012 smo dobili s pomočjo statističnega programa informacijskega sistema Labis. Podatke smo statistično obdelali v programu Microsoft Excel 2007. Podatke oz. rezultate hemoliziranih in nehemoliziranih vzorcev smo tudi dobili s pomočjo statističnega programa informacijskega sistema Labis. Za izvedbo korelacije med S-kalijem pri hemoliziranih in nehemoliziranih vzorcih istega preiskovanja pa smo uporabili program MedCalc.

Podatke drugega dela naloge (300 vzorcev polne krvi za plinsko analizo) smo statistično obdelali v programu Microsoft Excel ter izračunali verjetnost.

KORELACIJA

Pri osnovni korelacijski analizi preizkušamo, kako močno sta dve statistični spremenljivki povezani (usklajeni) ali korelirani. Mera za medsebojno povezanost je kovarianca .

$$COV(x, y) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1}$$

$C_{xy} < 0$ negativna linearna povezanost

$C_{xy} = 0$ ni linearne povezanosti

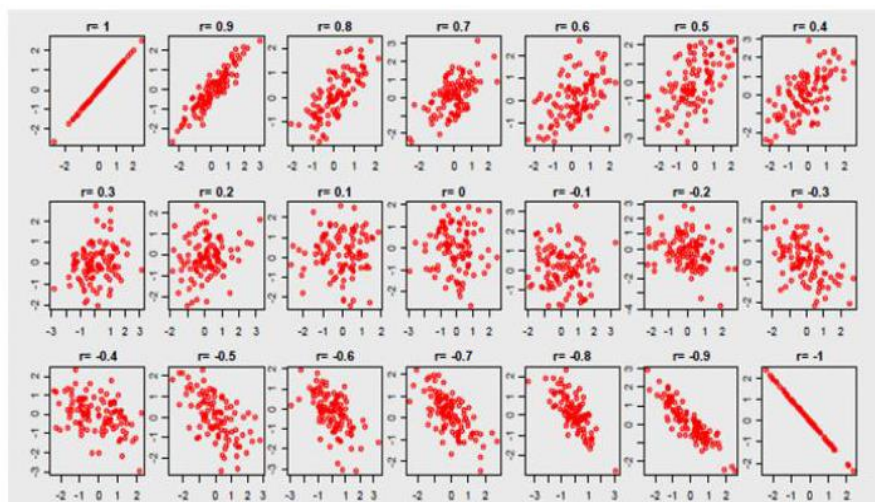
$C_{xy} > 0$ pozitivna linearna povezanost

Jakost povezave pa merimo s Pearsonovim koeficientom korelacije.

Personov koeficient korelacije računamo po formuli, ki je enaka pri linearni regresiji.

$$r_{xy} = \frac{C_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

Pearsonov koeficient lahko tudi približno razberemo iz razsevnega digrama oz. korelacijskega grafikona (*slika 6*).



Slika 6 : Razsevni diagram oziroma korelacijski grafikon (35).

Glede na velikost korelacijskega koeficienta ločimo (34,35):

močno linearno povezavo

$$0,8 \geq |r_{xy}| \geq 1$$

srednje močno linearno povezavo

$$0,6 |r_{xy}| \leq 0,8$$

šibko linearno povezavo,

$$|r_{xy}| \leq 0,6$$

VERJETNOST

Uporabili smo Bernoulliev poskus. Če je n ponovljenih poskusov med seboj neodvisnih in če je verjetnost p za ugoden izid konstanta, je število ugodnih izidov x binomska naključna spremenljivka, katere verjetnostno funkcijo f_x imenujemo binomska porazdelitev.

$$f_X(x) = P(X = x) = \binom{n}{x} p^x (1 - p)^{n-x}$$

Binomski simbol je definiran z enačbo:

$$\binom{n}{r} = \frac{n!}{(n-r)! r!}$$

n ...število poskusov

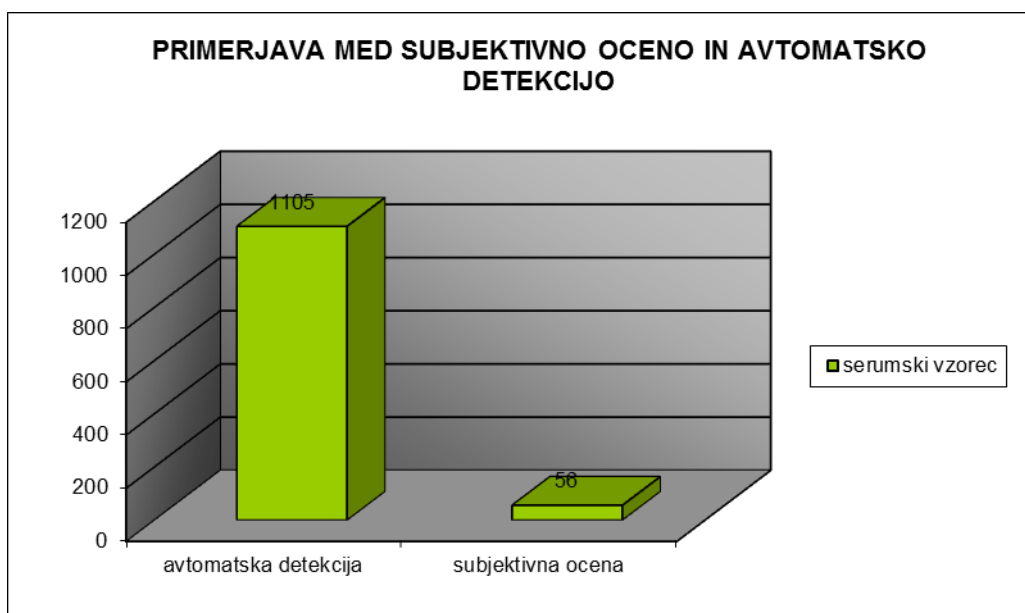
p ...verjetnost, da se zgodi dogodek

x (r)...število pojavitev dogodka (34).

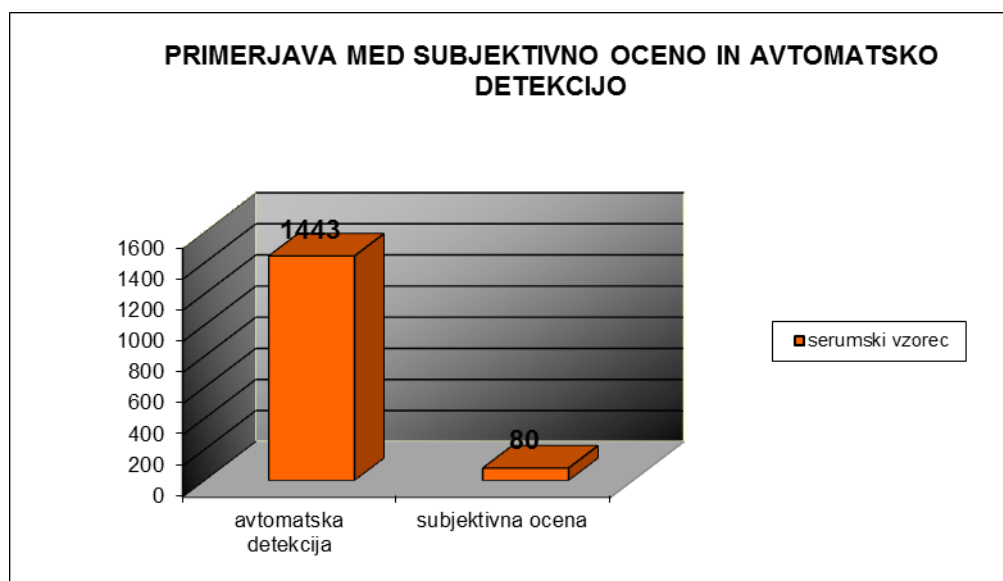
4. REZULTATI

4.1. REZULTATI HEMOLIZIRANIH VZORCEV V HUMANEM SERUMU

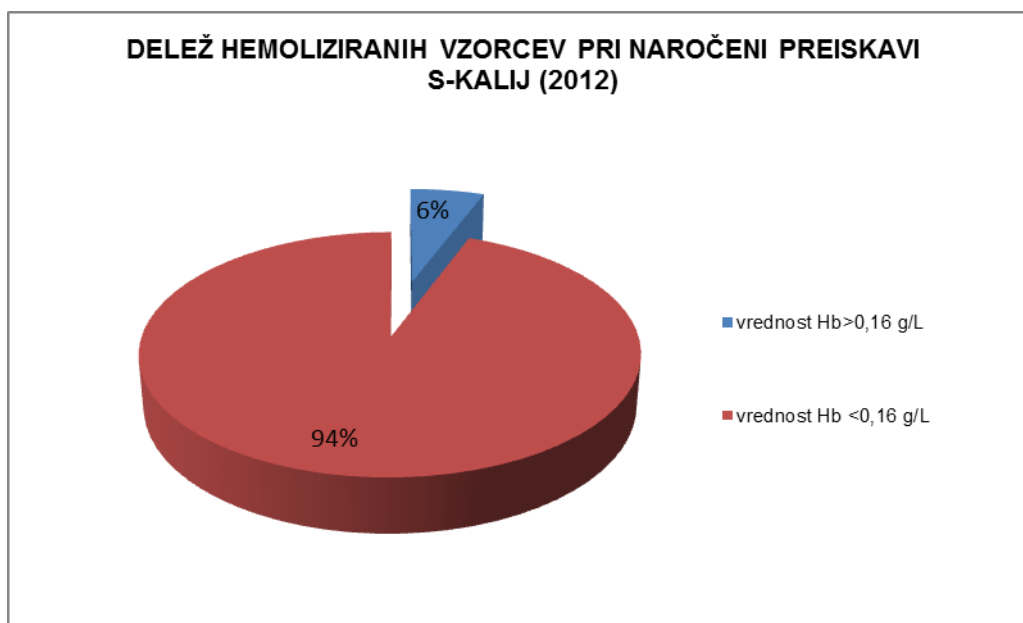
Delež hemoliziranih vzorcev glede na število serumskih vzorcev iz let 2010/2011 (1.105 hemoliziranih vzorcev/30.086 serumskih vzorcev) izmerjenih z avtomatsko detekcijo je bil 4 %. Glede na subjektivno oceno je bilo zavrženih le 56 serumskih vzorcev, ostali vzorci, pri katerih je avtomatska detekcija (HI) pokazala hemolizo v vzorcu, na sprejemu materiala niso bili zavrženi zaradi subjektivne ocene, da ni hemolize v vzorcu. V **grafu 1** je prikazana primerjava med subjektivno oceno in avtomatsko detekcijo hemolize v vzorcih v letih 2010/2011. Od 32.907 serumskih vzorcev iz leta 2012 je bilo 1.443 hemoliziranih vzorcev (4 %), pri katerih je bil $HI > 0,16$ g/L. Subjektivno smo v tem letu zavržili le 80 serumskih vzorcev od 32.907 serumskih vzorcev. V **grafu 2** je prikazana primerjava med subjektivno oceno in avtomatsko detekcijo hemolize v vzorcih v letu 2012. V **grafu 3** je prikazan delež hemoliziranih vzorcev pri preiskavi S-kalij v letu 2012. Od 23.705 preiskav S-kalij-a je bilo 1.360 (6 %) vzorcev hemoliziranih.



Graf 1: Prikaz primerjave med subjektivno oceno in avtomatsko detekcijo hemolize v vzorcih v letu 2010/2011.

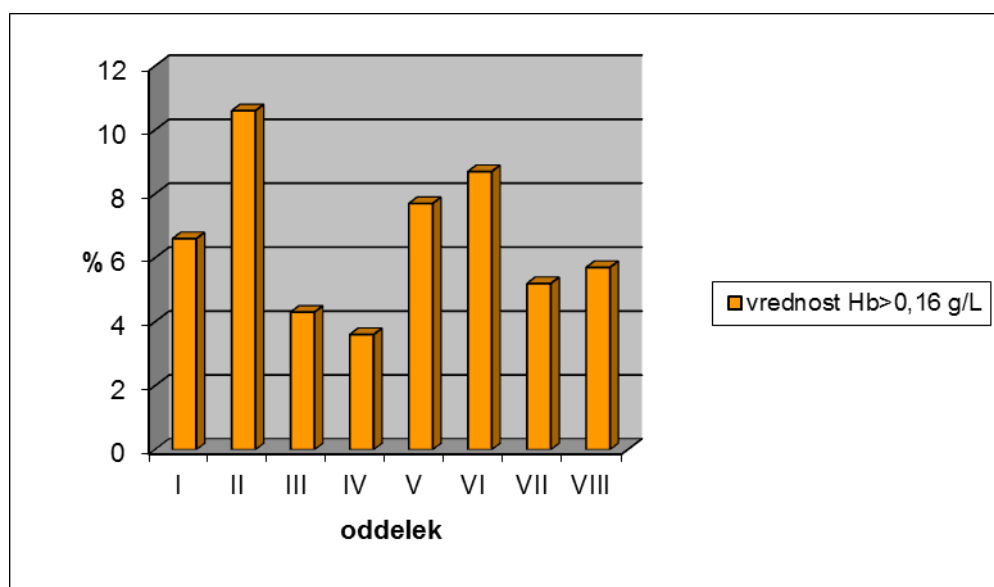


Graf 2: Prikaz primerjave med subjektivno oceno in avtomatsko detekcijo hemolize v vzorcih v letu 2012.



Graf 3: Prikaz deleža hemoliziranih vzorcev pri preiskavi S-kalij.

Delež hemoliziranih vzorcev je bil različen med oddelki, ki so pošiljali vzorce na preiskavo S-kalij (**graf 4**). Oddelek I je Sprejemna urgentna ambulanta. Od 5.510 naročenih preiskav jih je bilo 367 (6,6 %) hemoliziranih vzorcev. Oddelek II je Oddelek za intenzivno terapijo in nego, imel je največji delež hemoliziranih vzorcev. Od 1.157 preiskav S-kalija je bilo 123 (10,6 %) hemoliziranih vzorcev. Oddelki III, IV, V, VI, VII so oddelki Univerzitetne klinike Golnik. Na oddelku III je bilo od 2.911 naročenih S-kalijev 125 (4 %) hemoliziranih vzorcev. Na oddelku IV je najmanjši delež hemoliziranih vzorcev. Od 3.892 naročenih S-kalijev je bilo 140 (3,6 %) hemoliziranih vzorcev. Na oddelku V je bilo od 1.642 naročenih S-kalijev 128 (7,7 %) hemoliziranih vzorcev. Na oddelku VI je bilo od 2.602 naročenih S-kalijev 227 (8,7 %) hemoliziranih vzorcev. Na oddelku VII je bilo od 2.216 naročenih S-kalijev 117 (5,3 %) hemoliziranih vzorcev. Sklop VIII zajema ambulate: Pnevmoško-alergološko na Golniku, Pnevmoško-alergološko v Ljubljani, Internistično in diabetično ambulanto v Kranju in Športno ambulanto. Od 3.775 naročenih preiskav S-kalija jih je bilo 216 (5,7 %) hemoliziranih vzorcev.



Graf 4: Porazdelitev hemoliziranih vzorcev glede na število preiskav S-kalij po oddelkih izraženo v deležih.

4.2. REZULTATI INDEKSA HEMOLIZE V PLINSKI ANALIZI KRVÍ

Vzorcem 300 preiskovancev, ki so imeli naročeno plinsko analizo iz polne krvi, smo dodatno izvedli avtomatsko merjenje HI na analizatorju Cobas® Cobas 6000, Roche Diagnostics (**preglednica II**). Kritični profil (Ka-kalij) iz polne krvi je imelo naročenih samo 14 preiskovancev od 300, medtem ko je bilo vzorcev s HI > 0,16 g/L kar 59 in ne bi bili primerni za izdajo kritičnega profila.

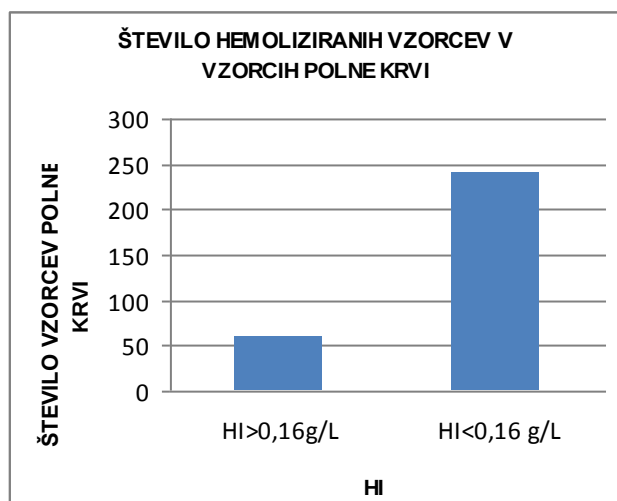
Preglednica II: Vrednosti indeksa hemolize (g/L) v vzorcih polne krvi za plinsko analizo krvi. Z zeleno barvo so označeni preiskovanci, ki so imeli naročen kritični profil (Ka-kalij) v polni krvi, z rdečo barvo preiskovanci, ki so imeli v plazmi polne krvi HI > 0,16 g/L.

VZOREC	HI (g/L)	VZOREC	HI (g/L)	VZOREC	HI (g/L)	VZOREC	HI (g/L)	VZOREC	HI (g/L)
1	0,06	31	0,02	61	0,09	91	0,17	121	0,14
2	0,21	32	0,07	62	0,13	92	0,05	122	0,07
3	0,15	33	0,09	63	0,12	93	0,11	123	0,09
4	0,24	34	0,17	64	0,14	94	0,1	124	0,05
5	0,05	35	0,05	65	0,13	95	0,1	125	0,05
6	0,11	36	0,17	66	0,12	96	0,38	126	0,07
7	0,07	37	0,14	67	0,03	97	0,13	127	0,02
8	0,1	38	0,36	68	0,08	98	0,09	128	0,03
9	0,1	39	0,07	69	0,14	99	0,13	129	0,14
10	0,03	40	0,08	70	0,03	100	0,08	130	0,06
11	0,11	41	0,08	71	0,04	101	0,05	131	0,05
12	0,08	42	0,14	72	0,04	102	0,09	132	0,09
13	0,07	43	0,04	73	0,04	103	0,1	133	0,11
14	0,17	44	0,07	74	0,1	104	0	134	0,12
15	0	45	0,06	75	0,2	105	0,15	135	0,07
16	0,1	46	0,07	76	0,17	106	0,11	136	0
17	0,04	47	0,13	77	0,09	107	0,1	137	0,06
18	0,13	48	0,04	78	0,09	108	0,15	138	0,03
19	0,17	49	0,04	79	0,07	109	0,08	139	0,07
20	0,07	50	0,16	80	0,08	110	0,07	140	0,09
21	0,21	51	0,13	81	0,14	111	0,19	141	0,04
22	0,07	52	0,08	82	0,03	112	0,16	142	0,08
23	0,15	53	0,06	83	0,05	113	0,1	143	0,14
24	0,1	54	0,19	84	0,02	114	0,02	144	0,07
25	0,07	55	0,11	85	0,07	115	0,11	145	0,03
26	0,1	56	0,07	86	0,08	116	0,01	146	0,07
27	0,16	57	0,08	87	0,07	117	0,04	147	0,07
28	0,09	58	0,14	88	0,1	118	0,11	148	0,09
29	0,14	59	0,09	89	0,11	119	0,03	149	0,06
30	0,03	60	0,15	90	0,16	120	0,22	150	0,03

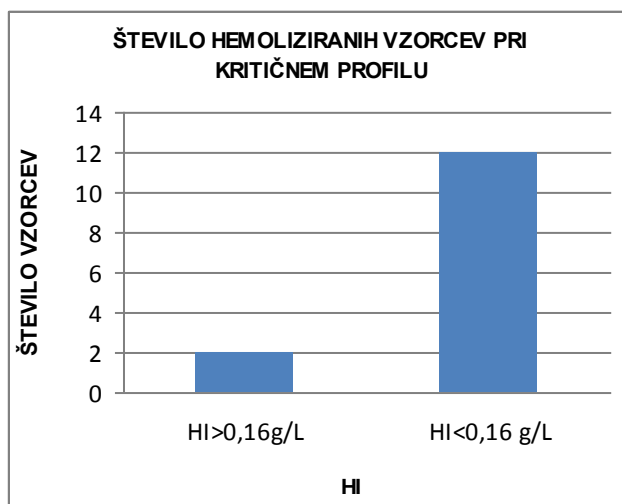
Nadaljevanje **Preglednice II:**

VZOREC	HI (g/L)	VZOREC	(HI g/L)	VZOREC	HI (g/L)	VZOREC	(HI g/L)
150	0,03	191	0,21	232	0,08	273	0,12
151	0,14	192	0,07	233	0,1	274	0,16
152	0,1	193	0,1	234	0,17	275	0,07
153	0,11	194	0,33	235	0,19	276	0,07
154	0,08	195	0,21	236	0,22	277	0,12
155	0,22	196	0,04	237	0,15	278	0,13
156	0,1	197	0,3	238	0,04	279	0,09
157	0,06	198	0,19	239	0,08	280	0,08
158	0,12	199	0,13	240	0,04	281	0,15
159	0,04	200	0,13	241	0,22	282	0,23
160	0,22	201	0,09	242	0,22	283	0,37
161	0,09	202	0,12	243	0,09	284	0,15
162	0,17	203	0,05	244	0,53	285	0,13
163	0,1	204	0,1	245	0,16	286	0,16
164	0,09	205	0,08	246	0,18	287	0,13
165	0,04	206	0,2	247	0,2	288	0,13
166	0,03	207	0,08	248	0,09	289	0,13
167	0,06	208	0,16	249	0,19	290	0,26
168	0,13	209	0,03	250	0,17	291	0,18
169	0,02	210	0	251	0,07	292	0,15
170	0,14	211	0,23	252	0,13	293	0,13
171	0,03	212	0,19	253	0,04	294	0,09
172	0,14	213	0,12	254	0,12	295	0,15
173	0,18	214	0,14	255	0,26	296	0,16
174	0,13	215	0,03	256	0,15	297	0,08
175	0,07	216	0,04	257	0,14	298	0,12
176	0,11	217	0,2	258	0,05	299	0,14
177	0,14	218	0,11	259	0,08	300	0,09
178	0,07	219	0,07	260	0,35		
179	0,1	220	0,08	261	0,03		
180	0,11	221	0,06	262	0,11		
181	0,04	222	0,06	263	0,22		
182	0,15	223	0,08	264	0,16		
183	0,07	224	0,06	265	0,01		
184	0,17	225	0,12	266	0,04		
185	0,13	226	0,07	267	0,02		
186	0,15	227	0,05	268	0,02		
187	0,2	228	0,07	269	0,16		
188	0,13	229	0,16	270	0,12		
189	0,32	230	0,11	271	0,11		
190	0,03	231	0,16	272	0,07		

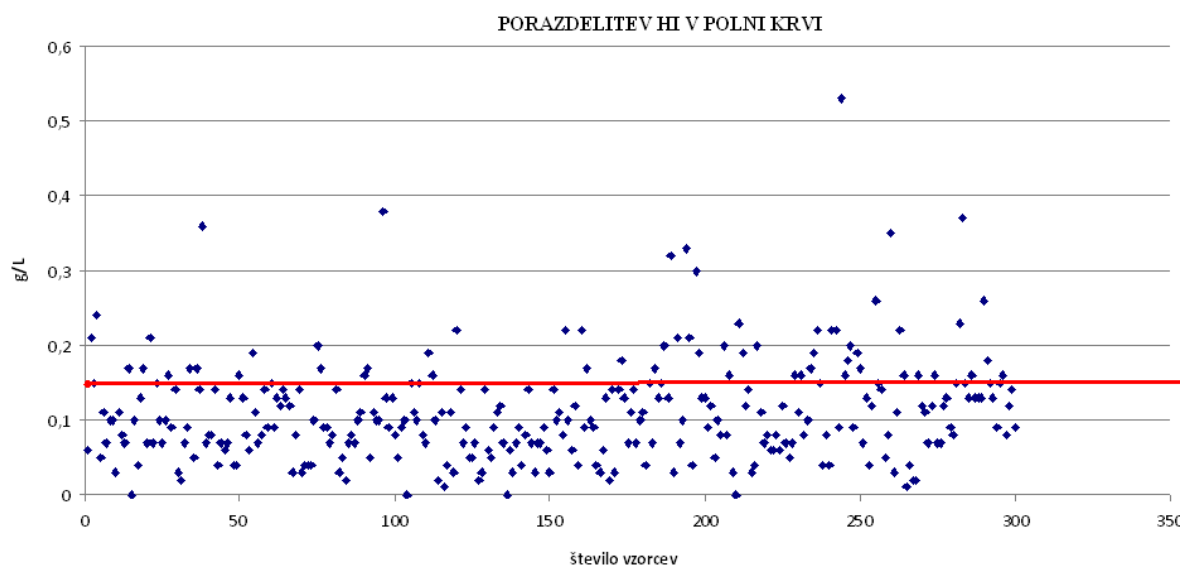
Od 300 vzorcev polne krvi za plinsko analizo je imelo 59 vzorcev $HI > 0,16 \text{ g/L}$ (19,6 %), 241 pa manj kot $0,16 \text{ g/L}$ (**graf 5**). Pri 14 preiskovancih z naročenim kritičnim profilom iz polne krvi sta bila samo dva (14 %) s $HI > 0,16 \text{ g/L}$ (**graf 6**). Glede na porazdelitev HI v vzorcih polne krvi za plinsko analizo se od 300 vzorcev 80 % vrednosti giblje od $0-0,15 \text{ g/L}$, 18 % od $0,16-0,30 \text{ g/L}$, pri 2 % pa je večja od $0,31 \text{ g/L}$ (**graf 7**).



Graf 5: Število hemoliziranih vzorcev v vzorcih polne krvi (vrednost $HI > 0,16 \text{ g/L}$).



Graf 6: Število vzorcev s $HI > 0,16 \text{ g/L}$ pri 14 vzorcih polne krvi za plinsko analizo krvi z naročenim kritičnim profilom.



Graf 7: Prikaz porazdelitve HI (g/L) v vzorcih polne krvi za plinsko analizo. Rdeča črta prikazuje mejo za hemolizo.

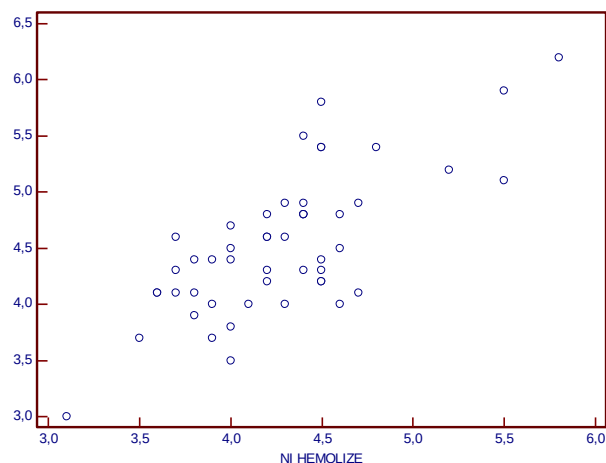
4.3. REZULTATI KORELACIJE S-KALIJA

Statistično smo obdelali 50 rezultatov preiskovancev, ki so imeli naročen S-kalij (v letu 2012) in HI > 0,16 g/L ter rezultate istih preiskovancev, kjer je bil S-kalij ponovljen po izdanem komentarju: «Vpliv hemolize! Prosimo za ponovni odvzem!» Ta S-kalij je imel HI < 0,16 g/L. Izvedena je bila korekcija vrednosti S-kalija hemoliziranega vzorca. Število 0,3 je izbrano iz povprečnega odstopanja hemoliziranega od nehemoliziranega vzorca (preglednica III).

Preglednica III: Vrednosti S-kalija (mmol/L) ob hemolizi, ob nehemolizi ter korekcija s številom 0,3.

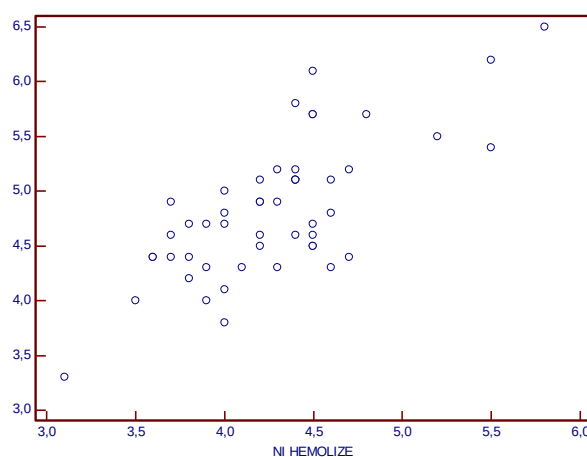
hemoliza	ni hemolize	korekcija s številom 0,3 (hemoliza+0,3)	hemoliza	ni hemolize	korekcija s številom (hemoliza+0,3)
3	3,1	3,3	4,2	4,2	4,5
4,6	4,2	4,9	4,3	4,5	4,6
4,8	4,2	5,1	4	3,9	4,3
4,6	4,3	4,9	4,4	4,5	4,7
4,3	3,7	4,6	5,4	4,8	5,7
3,7	3,9	4	5,2	5,2	5,5
4,8	4,6	5,1	4,4	3,9	4,7
3,7	3,5	4	4,8	4,4	5,1
5,8	4,5	6,1	5,4	4,5	5,7
4,2	4,5	4,5	4,9	4,4	5,2
4	4,3	4,3	4,1	3,6	4,4
3,9	3,8	4,2	4,1	3,6	4,4
4,2	4,5	4,5	5,4	4,5	5,7
3,5	4	3,8	4,3	4,1	4,6
4,3	4,2	4,6			
6,2	5,8	6,5			
4,1	3,6	4,4			
4,1	3,7	4,4			
4	4,6	4,3			
4,1	3,8	4,4			
4,4	4	4,7			
4,1	4,7	4,4			
4,6	4,2	4,9			
4,7	4	5			
4	4,1	4,3			
4,9	4,7	5,2			
4,5	4	4,8			
4,3	4,4	4,6			
4,8	4,4	5,1			
4,6	3,7	4,9			
5,9	5,5	6,2			
4,9	4,3	5,2			
5,5	4,4	5,8			
5,1	5,5	5,4			
4,5	4,6	4,8			
5,4	4,5	5,7			

Iz statistično obdelanih 50 rezultatov preiskovancev smo izvedli korelacijo med rezultati S-kalija pri hemoliziranem vzorcu in nehemoliziranem vzorcu pri istem preiskovancu. Koeficient korelacije je bil $r = 0,7$ in $p < 0,001$ (**graf 8**). Izvedli smo tudi korelacijo med rezultati S-kalija pri hemoliziranem vzorcu in rezultati korekcije hemoliziranega vzorca s številom 0,3. Koeficient korelacije pri 50 vzorcih je bil $r = 0,7$ in $p < 0,001$ (**graf 9**).



Število vzorcev	50
Korelacijski koeficient r	0,7316
Signifikanca	P<0,0001
95% interval zaupanja za r	0,5692 to 0,8391

Graf 8: Prikaz korelacije med hemoliziranimi in nehemoliziranimi vzorci.



Število vzorcev	50
Korelacijski koeficient r	0,7316
Signifikanca	P<0,0001
95% interval zaupanja za r	0,5692 to 0,8391

Graf 9: Prikaz korelacije med hemoliziranimi vzorci in korekcije hemoliziranega vzorca.

4.4. REZULTATI VERJETNOSTI

Postavili smo si vprašanje, kakšna je verjetnost, da se bo v 100 poskusih (plinskih analizah krvi) zgodil dogodek ($HI > 0,16 \text{ g/L}$) natanko 20-krat, če se vsak poskus zgodi z verjetnostjo 0,2.

$$f_X(x) = P(X = x) = \binom{n}{x} p^x (1-p)^{n-x}$$

$$P_{(X=x)} = \binom{100}{20} 0,2^{20} (1-0,2)^{100-20}$$

$$P_{(20)} = 0,0993 \quad P_{(x=x)} = \text{izraženo v \% je } 9,93\%$$

Kakšna je verjetnost, da se bo v 100 poskusih (plinskih analizah krvi z naročenim kritičnim profilom) zgodil dogodek ($HI > 0,16 \text{ g/L}$) natanko 20-krat, če se vsak poskus zgodi z verjetnostjo 0,14.

$$P_{(X=x)} = \binom{100}{20} 0,14^{20} (1-0,14)^{100-20}$$

$$P_{(20)} = 0,0258 \quad P_{(x=x)} = \text{izraženo v \% je } 2,58\%$$

5. RAZPRAVA

Predanalizne napake so najpogostejše napake v celotnem procesu testiranja vzorcev (7,36). Hemoliza je še vedno eden izmed največjih izzivov laboratorijskih strokovnjakov (37) in je priznana kot ena najpogostejših napak in motenj v laboratorijski praksi. V Laboratoriju za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetne klinike Golnik smo v raziskavo vključili 62.993 serumskih vzorcev. Iz let 2010/2011 – 30.086 serumskih vzorcev, iz leta 2012 pa 32.907 serumskih vzorcev. Po podatkih, dosegljivih iz literature, smo sklenili, da pri vrednosti $HI > 0,16$ g/L ne podajamo vrednosti S-kalija. Izda se komentar: *»Hemoliza! Posamezne preiskave niso izvedljive, prosimo za ponovni odvzem!«* Vsi serumski vzorci z vizualno ocenitvijo močne hemolize ($Hb > 1$ g/L) se že takoj ob sprejemu zavrnejo s komentarjem: *»Hemoliza! Preiskave niso izvedljive. Prosimo za ponovni odvzem!«* V obdobju enega leta pred sklepom (2010/2011) smo že začeli uvajati avtomatski sistem za serumski indeks in ugotovili, da smo pri 30.086 serumskih vzorcih vizualno napačno ocenili 1.105 vzorcev, pri katerih je bila vrednost Hb v serumu več kot 0,16 g/L. Glede na subjektivno oceno smo zavrnili le 56 serumskih vzorcev. 1.105 vzorcev je približno 4 %, pri teh preiskovancih je bil izdan S-kalij brez komentarjev. To je povzročilo neenotno izdajanje komentarjev ter neustrezne rezultate tega analita. Vizualno ocenjevanje hemoliziranih vzorcev je subjektivno in zato nezanesljivo. Dejansko razširjenost hemoliziranih serumskih vzorcev lahko podcenimo (tudi usposobljeni opazovalci ne morejo natančno razvrstiti stopnje hemolize v serumu). Upoštevati moramo tudi morebitno prisotnost neželenih interferenc. Zvišana koncentracija bilirubina zmanjša sposobnost vizualnega odkrivanja hemolize. Tako nerealno ovrednotimo hemolizirane vzorce v neonatalnih vzorcih, pri katerih je zvišan bilirubin normalen. Že dolgo je znano, da je vizualno ocenjena stopnja ikteričnosti, hemolize in lipidov v vzorcih nezanesljiva. Glick in sodelavci so raziskovali pogostost lipemije, hemolize, ikteričnosti (38) v vzorcih. Vizualno ocenjevanje je bilo izvedeno z uporabo barvne fotografije serumskih vzorcev, ki vsebujejo različne koncentracije interferentov. Da bi lahko ocenili natančno vizualno razvrščanje, so preiskovanci določili dejanske koncentracije bilirubina, hemoglobina in trigliceridov v vsakem vzorcu. Rezultati so pokazali, da tudi usposobljeni opazovalci ne morejo natančno in enakovredno razvrstiti motenj v serumu. Zanesljivost vizualne ocene je dodatno raziskoval tudi Hawkins s sodelavci (39). Študija poroča o tem, da je vizualni pregled zelo nezanesljiv. Odvisen je od vrste vzorca. V eni od objavljenih študij so primerjali vizualno

in avtomatsko detekcijo lipemije, ikteričnosti in hemolize v vzorcih (40). Vizualno zaznavanje temelji na primerjavi s fotografijami vzorcev, ki vsebujejo različne koncentracije hemoglobina, bilirubina in trigliceridov. Število serumskih preiskav leta 2012 je bilo 32.907, od tega 1.443 komentarjev: »Hemoliza! Posamezne preiskave niso izvedljive, prosimo za ponovni odvzem!« To je 4 % serumov s HI > 0,16 g/L. Glede na subjektivno oceno smo zavrnili le 80 vzorcev. Tako je z uvedbo avtomatiziranega sistema za določanje HI prišlo do zmanjšanja napak, boljše ponovljivosti in izboljšanje odkrivanja hemoliziranih vzorcev. Število preiskav S-kalij leta 2012 je bilo 23.705, od tega 1.360 komentarjev: »Hemoliza! Posamezne preiskave niso izvedljive, prosimo za ponovni odvzem!« Vrednosti za S-kalij niso bile izdane (okrog 6 %). Moduli biokemijskih analizatorjev avtomatizirano odkrivajo serumski indeks. To je koristno pri hemoliziranih vzorcih (38). Običajno uporabljajo semikvantitativno spektrofotometrično merjenje. Različni analizni moduli imajo različne pragove za določitev serumskih indeksov. Zato je potrebno prizadevanje usmeriti k poenotenju, saj je to pomemben indeks, ki nam da informacije o kakovosti zbiranja vzorcev. Ključna ugotovitev je bila, da je vizualni pregled slabši kot avtomatska detekcija hemolize. Opaziti je bilo tudi neskladnost med sodelavci glede ocenjevanja interferenc. Laboratorijsko osebje ne more točno in ponovljivo odkrivati razlike v barvi in motnosti vzorca, tudi če imajo barvno lestvico. Vendar pa je vizualno ocenjevanje interferenc v serumu na žalost še vedno razširjeno v številnih laboratorijih (37). Izvajanje meritev HI na avtomatiziranem sistemu je koristno iz več razlogov. Poleg povečane produktivnosti pride tudi do zmanjšanja napak, večje ponovljivosti in izboljšanje odkrivanja rahlo hemoliziranih vzorcev (37). Lippi in sodelavci so objavili rezultate hemolize indeksa v več avtomatiziranih sistemih (41) in opazili, da je med več različnimi biokemijskimi moduli visoko primerljiva analizna občutljivost odkrivanja serumskih indeksov. Da bi odpravili pomanjkanje standardizacije, je bila pobuda na Nizozemskem ugotoviti enotne uporabe serumskih indeksov in usklajenosti pri hemolizi, lipemiji, ikteričnosti na nacionalni ravni (42-44). Raziskovalci so soglasno sprejeli serumske indekse za več analitov na aparatu Beckman Coulter LX-20. Na podlagi prazne vrednosti so določili pravila za ravnanje pri vzorcih z interferencami. Potekala je tudi razprava o tem ali poročati rezultate hemoliziranih vzorcev. Ko vzorec prispe v laboratorij, ga lahko glede na zavrnitvena merila zavrnemo in prosimo za ponovni odvzem ali opravimo analizo in rezultate podamo s komentarjem. Tako hemolizirani vzorci se različno obravnavajo glede na laboratorij ali nacionalne smernice posamezne države. Na Hrvaškem so objavili

raziskavo, kjer 30 % laboratorijskih strokovnjakov redko ali nikoli ne prosi za nov vzorec, če je serum nekoliko hemolitičen, tudi če je zahtevana določitev S-kalija. Vsi se strinjajo, da bi bilo idealno dobiti nov vzorec brez interferenc (45). Vendar pa to ni vedno mogoče. V Laboratoriju za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetne klinike Golnik smo naredili korelacijo med S-kalijem pri hemoliziranem ($HI > 0,16 \text{ g/L}$) in nehemoliziranem vzorcu ($HI < 0,16 \text{ g/L}$). Koeficient korelacije je bil $r=0,7$ ($p < 0,001$), kar kaže na srednje močno povezavo. Poskušali smo uporabiti še korekcijsko formulo, tako da smo rezultatu S-kalij, ki je bil izmerjen ob hemolizi prišteli $+ 0,3$. Koeficient korelacije je bil $r=0,7$ ($p < 0,001$) kar kaže na srednje močno povezavo. To potrjuje, da so lahko rezultati S-kalija pri hemoliziranih vzorcih neustrezni in zavajajoči ter neprimerni za izdajo. V literaturi ni enotnega stališča glede korekcije rezultatov iz hemoliziranih vzorcev (44). Popravek rezultatov se lahko izda le, če je intravaskularna hemoliza dokončno izključena. Raziskava vsebuje tudi podporo ob uporabi korekcijske formule za poročanje kalija pri novorojenih in odraslih osebah, saj je koristno za klinično obravnavo bolnika (46). Vendar pa je treba poudariti, da praksa popravljanja rezultatov lahko privede do določene pristranskosti in posledično do netočnih in zavajajočih rezultatov. Carraro predlaga poročanje laboratorijskih rezultatov z ustreznim komentarjem, kar je v pomoč pri zagotavljanju ustreznega zdravljenja pri akutni negi (47). Nekateri se strinjajo, drugi pa močno nasprotujejo takšnim komentarjem (48,49). Prav tako je potrebno opozoriti, da te pripombe ni enostavno razložiti in tudi zdravstveno osebje, odgovorno za nego bolnika, jih lahko spregleda (50). Končno bi lahko uvedba nezanesljivih rezultatov v okviru laboratorijskih poročil predstavljala resno zavajanje pri pregledu bolnikovih rezultatov. Da bi rešili problem nestandardiziranega poročanja neustreznih vzorcev, je italijanska študijska skupina (SIBioC-SIMEL-CISMEL) izdala priporočila za odkrivanje in odpravljanje neskladnosti vzorcev v kliničnih laboratorijih (51). V Laboratoriju za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetne klinike Golnik se pri rednem delu ne poslužujemo korekcije rezultatov hemoliziranih vzorcev, pač pa poskušamo težiti k čim manjšemu številu hemoliziranih vzorcev iz bolnišničnih oddelkov. Glede na porazdelitev hemoliziranih vzorcev na število serumskih vzorcev po oddelkih prevladujejo Oddelek za intenzivno terapijo in nego (10,6 %), oddelek VI (8,7 %) ter oddelek V (7,7 %). Nižja stopnja hemoliziranih vzorcev na oddelkih v primerjavi z Oddelkom za intenzivno terapijo in nego je verjetno posledica triaže v Sprejemni urgentni ambulanti. Visoka stopnja hemoliziranih vzorcev na Oddeleku za intenzivno terapijo in nego je posledica težkega odvzema vzorca,

zaradi narave bolnikov. Posledično smo na bolnišničnih oddelkih uvedli dodatna strokovna izobraževanja, predstavitev dejanskih rezultatov, podkrepljenih s podatki iz strokovne literature. Uveden imamo skupni notranji nadzor ustreznosti odvzema venske krvi v Univerzitetni kliniki Golnik.

Zaradi težkega odvzema vzorca osebe na oddelkih ne more zagotoviti vzorca brez hemolize. Ker pri takšnih vzorcih ne izdajamo rezultatov S-kalija, so se zdravniki po priporočilih laboratorija začeli pri kritičnih pacientih odločati za plinsko analizo polne krvi. Novejši analizatorji (Radiometer® ABL 800 Flex 825, Radiometer® ABL 800 Flex 835) za izvedbo plinske analize iz polne krvi namreč izvajajo tudi meritve koncentracije nekaterih elektrolitov v polni krvi (kalij, natrij, kloridi, ioniziran kalcij). Pričeli smo z avtomatsko meritvijo HI vzorcev centrifugirane polne krvi pri preiskovancih, ki so imeli naročeno plinsko analizo ter kritičen profil. Ker je potrebno zagotavljati kakovost vzorcev, je treba pomisliti tudi na interferente v plinski analizi krvi. Zato klinične smernice CLSI C46-A2 odsvetujejo neustrezne vzorce za plinsko analizo polne krvi, ker hemoliza lahko vpliva na nekatere preiskave (npr. K^+ , pH, pO_2 , pCO_2) (52). Zasledili smo 20 % hemoliziranih vzorcev glede na vse vzorce polne krvi za plinsko analizo. Pri izbranih vzorcih kritičnega profila (14 vzorcev polne krvi za plinsko analizo) pa je bilo 14 % hemoliziranih vzorcev. Če pregledamo razpršenost HI, ugotovimo, da se 80% vrednosti HI iz centrifugirane polne krvi giblje od 0 - 0,15 g/L, 18 % vrednosti HI iz centrifugirane polne krvi pa od 0,16 - 0,3 g/L, medtem, ko je le 2 % HI iz centrifugirane polne krvi $> 0,31$ g/L. Literatura označuje rahlo hemolizo od 0,3 - 0,6 g/L (37). V primerjavi s strokovno literaturo bi pri nas imeli le 2 % hemoliziranih vzorcev iz polne krvi za plinsko analizo. Če primerjamo z rezultati Salvagna GL in sodelavcev, sta se raziskavi razlikovali v času centrifugiranja, centrifugalni sili in številu vzorcev. V njihovi raziskavi so centrifugirali 5 minut pri 1500 x g, mi smo centrifugirali 15 min pri 2150 x g. Mejo za hemolizo smo postavili glede na priporočila proizvajalca biokemijskega analizatorja Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija. V priporočilih proizvajalca je sicer meja za HI pri S-kaliju 0 g/L. Glede na strokovno literaturo in priporočila smo se odločili, da prevzamemo za S-kalij najnižji HI drugih analitov. V Salvagna GL in sodelavci so v novejši raziskavi hemolizo označili 0,6 g/L. 4 % vzorcev centrifugirane polne krvi je imelo HI $> 0,60$ g/L (53). Glede na njihovo mejo HI in naše rezultate smo ugotovili, da noben naš vzorec polne krvi za plinsko analizo ni presegel HI 0,6 g/L. Odvzem polne krvi za plinsko analizo krvi se na Univerzitetni kliniki Golnik vrši ob upoštevanju določenih standardov in usposobljenosti kadra za odvzem. Rezultati

raziskave avtorja Lippi G in sodelavcev potrjuje, da je prevalenca hemoliziranih vzorcev za testiranje vzorcev iz plinske analize krvi še vedno pomembna in obstaja realna možnost izdaje nepravilnih rezultatov, kjer ima hemoliza vpliv (kalij, pH, pO_2 , pCO_2) (55). V raziskavi zaključujejo, da bi izvedli po končani plinski analizi krvi centrifugiranje in vsaj vizualni pregled plazme in s tem zmanjšali škodljive posledice nepravilnih rezultatov. Na podlagi naših rezultatov nista potrebna centrifugiranje in vizualni pregled plazme. Nobeden od vzorcev ni presegel $HI > 0,6$ g/L. Ker pa se zavedamo morebitnih negativnih posledic pri nepravilni izdaji rezultatov, smo to odločitev skušali še podkrepiti z izračunom verjetnosti. Pri izračunu verjetnosti smo upoštevali verjetnost 0,2 glede na delež hemoliziranih vzorcev, dobljenih iz naših raziskav. $HI > 0,16$ g/L se bo v 100 vzorcih polne krvi za plinsko analizo zgodil natanko 20-krat z verjetnostjo 10 %. Pri izračunu verjetnosti polne krvi za plinsko analizo krvi s kritičnim profilom smo upoštevali verjetnost 0,14 glede na delež hemoliziranih vzorcev dobljenih iz naših raziskav. $HI > 0,16$ g/L se bo v 100 vzorcih natanko 20-krat zgodil z verjetnostjo 2 %. V našem laboratoriju bi lahko le ob naročilu Ka-kalija iz polne krvi za plinsko analizo s kritičnim profilom izvedli hitro centrifugiranje 5 min pri $2685 \times g$. Pri polni krvi za plinsko analizo krvi pa je to skoraj nemogoče, ker so rezultati resnično nujni, še posebej pri reanimaciji preiskovancev. Glede na naše ugotovitve (izračun verjetnosti in število hemoliziranih vzorcev v polni krvi za kritičen profil) postopek centrifugiranja ni potreben. Omeniti je še potrebno vedno večjo uporabo POCT, kjer gre za izvajanje plinske analize iz polne krvi ob preiskovancu. V tem primeru je nemogoče ugotoviti HI v polni krvi za plinsko analizo, ker na oddelkih nimajo niti ustreznih centrifug niti usposobljenega kadra. Na teh oddelkih bi bilo potrebno strokovno izobraževanje in notranji nadzor nad izvajanjem odvzema polne krvi za plinsko analizo. HI je domena laboratorija, saj so tu usposobljeni strokovni delavci, ki se znajo v ključnem trenutku, glede na dejstva, ki jih določa standard ISO 15189, pravilno in strokovno odločiti.

Glede na razpravo in rezultate bi lahko zaključili, da naj laboratorij uporablja za določanje HI avtomatiziran sistem, osebje pa naj se čim manj subjektivno odloča pri določitvi HI v serumu. Če je vzorec hemolitičen ($Hb > 1$ g/L), mora laboratorij vedno zahtevati nov vzorec. V primeru kritičnih bolnikov (novorojenčki, kemoterapevtski bolniki, reanimacija) se je vedno treba posvetovati z vodjo oziroma s pooblaščen osebo, ki odloči o posebnem postopku v primeru kritičnih bolnikov, ne sme se poročati oziroma izdajati rezultatov S-kalija v primeru vpliva interferentov (hemoliza). Na bolnišničnih oddelkih bo potrebno

izvesti usposabljanje osebja ter povečati notranji nadzor pri odvzemu venske krvi. Po analizi polne krvi za plinsko analizo nam ni potrebno izvesti hitrega centrifugiranja, saj v naši študiji nobeden od vzorcev ni presegel $HI > 0,6 \text{ g/L}$.

6. SKLEPI

Na osnovi rezultatov lahko postavimo naslednje sklepe:

- Potrdimo lahko vpliv subjektivne ocene hemolize pri vzorcih.
- Največ hemoliziranih vzorcev glede na število serumskih vzorcev ima v okviru Univerzitetne klinike Golnik Oddelek za intenzivno terapijo in nego.
- Koeficient korelacije S-kalija v humanem serumu pri hemoliziranem in nehemoliziranem vzorcu istega preiskovanca kaže na srednje močno povezavo in potrjuje, da so rezultati za S-kalij iz hemoliziranih vzorcev zavajajoči.
- Nobeden od vzorcev polne krvi za plinsko analizo ni presegel $HI > 0,6 \text{ g/L}$.
- Po analizi polne krvi za plinsko analizo ni potrebno izvesti centrifugiranja za preverjanje hemolize. Ponovni odvzem in izvedba Ka-kalija iz polne krvi za plinsko analizo je ustrezna.
- $HI > 0,16 \text{ g/L}$ se bo pojavil v 100 vzorcih polne krvi za plinsko analizo natanko 20-krat z verjetnostjo 10 % . Pri plinski analizi krvi s kritičnim profilom se bo $HI > 0,16 \text{ g/L}$ v 100 vzorcih zgodil natanko 20-krat z verjetnostjo 2 %.

7. LITERATURA

1. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B: Samples: From the Patient to the Laboratory, Darmstadt: Git Verlag GMBH, 1996:1-101.
2. Štrákl G: Vpliv predanalitičnih dejavnikov na kvaliteto laboratorijskih dejavnikov. Zbornik predavanj Ljubljana, Maribor, Murska Sobota – Seminar za tehnike laboratorijske medicine, Slovensko združenje za klinično kemijo, 2007:1-14.
3. Dofour DR: Sources and control of preanalytical variation. III: Kaplan LA, Pesce AJ: Clinical Chemistry theory, analysis, correlation, 3.izdaja, CV Mosby Co. St.Louis, 1996:65-82.
4. Jelen D: Analiza vrste in prevalence predanalitičnih napak v medicinskem laboratoriju regijske bolnišnice, Diplomaska naloga, Ljubljana, 2011.
5. Young D, Bermes E: Preanalytical variables and biological variation. V: Burits CA, Ashwood: Tietz fundamentals of clinical chemistry, 5. izdaja, WB Saunders Company, Philadelphia, 2006: 449-473.
6. Plebani M: Errors in laboratory medicine and patient safety: the road ahead. Clin Chem Lab Med 2007; 45: 700-7
7. Plebani M: Laboratory errors: how to improve pre-and post-analytical phases? Biochemia Medica, 2007; 17: 5-9.
8. Lothar T: Clinical laboratory diagnostic: Use and assesment of clinical laboratory results 1. izdaja, TH books, Germany,1998: 1453-1457.
9. Clinical Laboratory standards Institute: Procedures for the Handling and Procesing of Blood Specimens far common laboratory test; Approved Guideline, 4.izdaja, Clinical and laboratory standards institute, 2010:H18-A4.
10. Clinical Laboratory standards Institute: Procedures for the Handling and Procesing of Blood Specimens by venipuncture;Approved Guideline, 6.izdaja, Clinical and laboratory standards institute, 2007: H3-A6.
11. Clinical Laboratory standards Institute: Procedures for the Handling and Procesing of Blood Specimens for testing plasma.based coagolation assay;Approved Guideline, 6.izdaja, Clinical and laboratory standards institute, 2008:H21-A5.
12. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F: Errors in Laboratory Medicine. Clin Chem Lab Med 2002; 48: 5691-698.
13. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC: Influence of short term venous stasis on clinical chemistry. Clin Chem Lab Med 2005; 43: 869-875.

14. Cengiz M, Ulker P, Meiselman HJ, Baskurt OK: Influence of tourniquet application on venous blood sampling for serum chemistry, hematological parameters, leukocyte activation and erythrocyte mechanical properties. Clin Chem Lab Med 2009; 47: 769-776.
15. Prezelj M: Priporočila za ravnanje s krvnimi vzorci, Ljubljana:Slovensko združenje za klinično kemijo, 2006.
16. Rehak NN, Chiang BT: Storage of whole blood: Effect of temperature on the measured concentration of analytes in serum. Clin Chem 1988; 34:2111-2114.
17. Sharp MK, Mohammad SF: Hemolysis in needleless connectors for phlebotomy. ASAIO 2003; 49: 128-30.
18. Wayne PA: Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. CLSI, 2007: H3-A6.
19. Wilding P, Zilva JF, Wilde CE: Transport of specimens for clinical chemistry analysis. Ann Clin Biochem 1977;14(6):301-6.
20. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, Vassault AJ, Plebani M: Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med 2008; 46: 764-772.
21. Plumhoff EA, Masoner D, Dale JD: Preanalytic Laboratory Errors: Identification and Prevention. Communique. Mayo Clinic. Dostopno na: <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2008/12.html> (maj 2013).
22. A global preanalytical resource centre: Factors Affecting Haemolysis. Specimenscare BD. Dostopno na: <http://www.specimenscare.com/main.aspx?cat=711&id=3031> (junij 2013)
23. Merlani P, Garnerin P, Diby M, Ferring M, Ricou B: Quality improvement report: linking guideline to regular feedback to increase appropriate request for clinical test: blood gas analysis in intensive care. BMJ 2001; 323: 620-4.
24. Meško Brguljan P: Plinska analiza krvi, Zbornik predavanj Ljubljana, Celje, Golnik – Seminar za tehnike laboratorijske medicine, Slovensko združenje za klinično kemijo 2008.
25. NCCLS. Blood Gas and pH Analysis and Related Measurements; Approved Guideline. NCCLS C46A; Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA, 2001.
26. NCCLS. Blood Gas and pH Analysis and Related Measurements; Approved Guideline. NCCLS H11A4; Clinical and Laboratory Standards Institute; Wayne, PA, USA, 2001.
27. Lock R, Francke K, Notzli B: The Whole-Blood Sampling Handbook, Radiometer Copenhagen, 2001.

28. Radiometer. The Blood Gas Handbook, Cobengahen, 2000.
29. Wenecke G, Juel G: Avoiding preanalytical errors – in blood gas testing. Radiometer medical ApS. Dostopno na:
<http://www.radiometeramerica.com/~media/Files/RadiometerComCloneset/RAME/Educational%20downloads/Handbooks/Avoiding%20preanalytical%20errors%20-%20syringe.pdf> (maj 2013)
30. Černe D, Avberšek-Lužnik I, Ostanek B: Merjenje najpogostejših elektrolitov v klinični biokemiji, Zbornik predavanj Ljubljana, Celje, Maribor, Trbovlje – Seminar za tehnike laboratorijske medicine, Slovensko združenje za klinično kemijo, 2009.
31. Lothar T: Clinical laboratory diagnostic: Use and assesment of clinical laboratory resalts, 1. izdaja, TH books, Germany, 1998: 306-313.
32. Operation's Manual of the Cobas 6000 systems: Operation's Manual Software Version 04-01/04-02, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 2009.
33. Method Manual of the Elecsys and Cobas systems: Operation', Serum indeks, Verzija 1 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, 2006-06.
34. Košmelj K: Uporabna statistika, Biotehnična fakulteta, Ljubljana, 2007.
35. Šumenjak T: Statistika 21.3.2011. Univerza v Mariboru. Dostopno na:
<http://www.fk.uni-mb.si/fkbv/images/stories/matematika/10pred-stat.pdf> (julij 2013)
36. Plebani M: Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin Chem Lab Med 2006; 44: 750-9
37. Simundic A, Topic E, Nikolac N, Lippi G: Hemolysis detection and management of hemolyzed specimens. Biochemia Medica 2010; 20(2): 154-9.
38. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR: Unrealible visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis and icterus serum from hospitalized patiens. Clin Chem 1989; 35: 837-9.
39. Hawkins R: Discrepancy between visual and spectrofotometric assesment of sample haemolysis. Ann Clin Biochem 2002; 39: 521-2.
40. Simundic AM, Nikolac N, Ivankovic V, Ferenec-Ruzic D, Magdic B, Kvaternik M, Topic E: Comparision 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.
41. Lippi G, Luca Salvagno G, Blanckaert N, Giavarina D, Green S, Kitchen S, Palicka V, Vassault AJ, Plebani M: Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. Clin Chem Lab Med 2009; 47: 934-9.

42. Vermer HJ, Thomassen E, de Jonge N: Automated procesing of Serum Indices Used for Interference Detection by the LIS. Clin Chem Lab Med 2005; 51: 244-7.
43. Steen G, Vermeer HJ, Naus AJ, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CH: Multicenter of evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assay. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 413-9.
44. Vermeer HJ, Steen G, Naus AJ, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CH: Correction of pacient results for Beckman Coulter LX-20 assay affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids: a practical approach. Clin Chem Med 2007; 45: 114-9.
45. Bilić-Zulle L, Šimundić A, Smolčić V, Nikolac N, Honović L: Self reported routines and procedures for the extra-analytical phase of laboratory practice in Croatia-cross sectional survey study. Biochem Med 2010; 20: 64-74.
46. Jefferery J, Sharma A, Ayling RM: Detection of haemolysis and reporting of potassium results and sample from neonates. Ann Clin Biochem 2009; 46: 222-5.
47. Carraro P: Potassium report of hemolyzed serum samples. Clin Chem Lab Med 2008; 46: 425-6.
48. Lippi G: Replay to the letter by Carraro:appropriate actions in the detection of haemolytic specimens. Clin Chem Lab Med 2008; 46: 426.
49. Challand GS, Li P: The assesment of inetrpretation of test results in laboratory medicine. Biochem Med 2009; 19: 146-53
50. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, Caputo M, Giavarina D, Montagnana M, Miconi V, Milanesi B, Mosca A, Morandini M, Salvagno GL: Recommendations for detection and managmend of unsuitable samples in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med 2007; 45: 728-36.
51. Clinical and Laboratory Standard Institute: Blood gas and pH analysis and relatedmeasurmets, approved guideline. CLSI, 2009; C46-A2.
52. Salvano GL, Lippi G, Gelati M, Guidi GS: Hemolysis, lipaemia and icterus in specimens for arterial blood gas analysis. Clinical Biochemistrry 2012; 45: 372-373.
53. Lippi G: Prevalence of hemolytic specimens reffered for arterial blood gas analysis. Clin Chem Lab Med 2011; 49(5): 931-932.