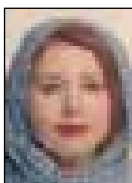


تداخل در نتایج آزمایش‌ها

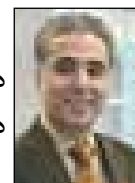
● دکتر هاله حکمتی

دکترای علوم آزمایشگاهی، مرکز جراحی حضرت
فاطمه زهرا (س)، آزمایشگاه



● دکتر سید قاسم مصطفوی

دکترای علوم آزمایشگاهی، عضو هیئت مدیره انجمن
دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران



□ خلاصه

تداخل در آزمایش‌های پزشکی، یعنی وجود ماده دیگری غیر از پارامتر اصلی مورد اندازه‌گیری، نتیجه آزمایش را تغییر دهد و سبب بروز خطا گردد.

نتیجه اشتباه آزمایش می‌تواند سبب درمان نابجا شود و درمان نابجا باعث بروز خسارت مالی و جانی به بیمار گردد. تداخل، پدیده‌ای شایع در آزمایش‌های پزشکی است و شامل انواع تداخلات درون‌زا و تداخلات برون‌زا می‌باشد. مهم‌ترین عواملی که سبب ایجاد تداخل درون‌زا می‌شوند عبارت‌اند از:

۱- هموگلوبین (همولیز)، ۲- لیپید (لیپمی)،
۳- بیلی‌روبین (ایکتریک) و ۴- پاراپروتئین‌ها
اصلی‌ترین عوامل ایجاد تداخل برون‌زا هم داروهای
مصرفی توسط بیمار هستند.

گاهی هم موادی که به لوله‌های جمع‌آوری نمونه اضافه می‌شوند سبب بروز تداخل می‌شوند.

ما در این نوشتار نحوه بروز تداخل توسط عوامل شایع را مورد بررسی قرار داده و راه‌های تشخیص و برطرف نمودن تداخلات مورد نظر را شرح خواهیم داد.

کلمات کلیدی: تداخل درون‌زا، تداخل برون‌زا، همولیز، لیپمی، افزایش بیلی‌روبین، آزمایشگاه تشخیص طبی

□ مقدمه

تداخل یا Interference یعنی وجود یک ماده در نمونه مورد آزمایش که نتیجه اندازه‌گیری آنالیت دیگری را به طور کاذب تغییر دهد. به طور مثال چنانچه در

آزمایش اندازه‌گیری کراتینین سرم به روش jaffe، مقدار بیلی‌روبین سرم بالا باشد در واکنش تداخل ایجاد نموده و مقدار کراتینین به طور کاذب کمتر از حد واقعی به دست می‌آید. مثال دیگر مصرف داروهای مختلف است که متعاقب آن سطح دارو در سرم بالا رفته و سبب ایجاد تداخل در اندازه‌گیری آنالیت‌های دیگر می‌شود.

تداخل از مهم‌ترین عوامل ایجاد خطا در نتایج آزمایشگاهی است. بروز تداخل سبب ایجاد نتایج اشتباه شده و نتیجه اشتباه سبب درخواست‌های آزمایش‌های اضافی و بی‌مورد بعدی و نهایتاً سبب تشخیص اشتباه و درمان ناصحیح می‌شود که می‌تواند با خسارات مالی و جانی زیادی همراه شود.

تداخل به انواع Endogenous (درون‌زا) و Exogenous (برون‌زا) طبقه‌بندی می‌شود.

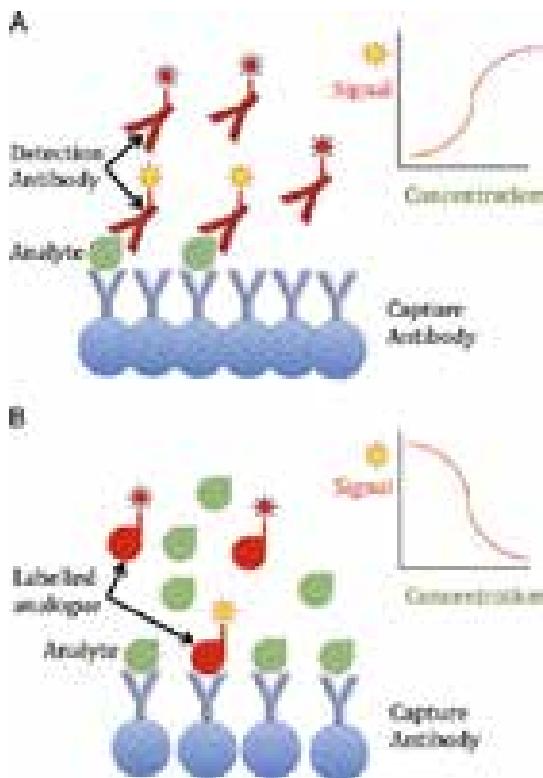
□ تداخل درون‌زا Endogenous interference

مربوط به وجود موادی است که ذاتاً در نمونه خود بیمار موجود هستند. به طور مثال هنگامی که تری‌گلیسرید بیمار بیش از حد بالا باشد ظاهر نمونه شیری رنگ شده و کدورت حاصله سبب ایجاد تداخل در اندازه‌گیری سایر آنالیت‌ها می‌شود.

□ تداخل برون‌زا Exogenous interference

مربوط به وجود موادی است که در حالت طبیعی در نمونه بیمار وجود ندارند و به طریقی به نمونه اضافه شده‌اند. مثال واضح آن وجود ترکیباتی است که به لوله‌های جمع‌آوری

است. به طور مثال در آزمایش‌های ایمونولوژیک و هورمونی، وجود انواع آنتی‌بادی‌های مداخله‌گر سبب ایجاد تداخل می‌شوند منتهی این مداخله بیشتر در روش‌های two-site immunometric یا همان روش‌های ساندویچ مشاهده می‌شوند بدین طریق که آنتی‌بادی مزاحم بین آنتی‌بادی capture و آنتی‌بادی detection پلی ایجاد می‌نمایند و سبب تداخل می‌شوند.



□ نوع دیگری از تداخل هم وجود دارد به نام carryover interference

این نوع تداخل هنگامی روی می‌دهد که مقداری از نمونه با غلظت زیاد به نمونه بعدی منتقل شود. علت اصلی carryover نقص در شستشوی پروب‌های دستگاه‌ها است. البته انواع دیگری از تداخل هم وجود دارند که ندرتاً و در موارد محدودی مشاهده می‌شوند مثلاً تداخلی که به علت cross reaction روی می‌دهد به طور مثال در اندازه‌گیری یون کلر، وجود بی‌کربنات می‌تواند تداخل ایجاد کند.

نمونه اضافه می‌شوند مثل ژل‌های جدا کننده و یا مواد نگهدارنده که می‌توانند گاهی در نتیجه اندازه‌گیری برخی از آنالیت‌ها تداخل ایجاد نمایند.

هدف این نوشتار آشنایی با انواع مداخله‌گرهای درون‌زا و برون‌زا، بررسی مکانیسم اثر آن‌ها، نحوه مواجهه با مواردی که تداخل روی می‌دهد و روش‌های برطرف نمودن تداخل می‌باشد.

□ مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده تداخل درون‌زا

تداخل درون‌زا یا Endogenous interference هنگامی بروز می‌نماید که مواد مداخله‌گر به طور طبیعی در نمونه مورد آزمایش وجود داشته باشند.

مهم‌ترین عواملی که ایجاد کننده تداخل درون‌زا هستند عبارت‌اند از:

- ۱- همولیز
- ۲- لیپمیا (Lipemia) یا افزایش شیلومیکرون‌های سرم
- ۳- زردی (Icterus) یا افزایش بیلی‌روبین سرم
- ۴- پاراپروتئین‌ها (Paraproteins) مثل انواع آنتی‌بادی‌ها (اتوآنتی‌بادی‌ها و آنتی‌بادی‌های هتروفیل)

□ مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده تداخل برون‌زا

این نوع از تداخل مربوط به وجود موادی است که در حالت طبیعی در نمونه یافت نمی‌شوند و گاهی به طور موردی ممکن است در نمونه یافت شوند. مهم‌ترین موارد شامل:

- ۱- تداخل مربوط به مصرف داروها Drug interference
 - ۲- مصرف بعضی از ساپلمنت‌ها مثل بیوتین
 - ۳- گاهی خود دارو مزاحمتی ایجاد نمی‌کند بلکه موادی که به عنوان نگه‌دارنده به دارو اضافه می‌شوند (additives) ایجاد تداخل می‌نمایند.
 - ۴- موادی که به لوله‌های جمع‌آوری نمونه‌ها اضافه می‌شوند.
 - ۵- وجود انواع سموم شیمیایی
 - ۶- وجود محصولات گیاهی (herbal products)
 - ۷- مایعاتی که به صورت IV تزریق می‌شوند.
- گاهی تداخل روی داده وابسته به متد انجام آزمایش

گاهی هم مقدار آنالیت مورد اندازه گیری بسیار زیاد است (پدیده هوک) و هنگامی که به روش معمول کار می‌کنیم قادر به برآورد صحیح نخواهیم بود. در ادامه بحث مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده تداخل را یک به یک مورد بررسی قرار می‌دهیم.

Sources of Analytical Error in Clinical Immunoassays

- Endogenous substances
 - Optical interferences
 - + Hemolysis, icterus, lipids
 - Cross-reacting molecules
 - Interfering antibodies
- Exogenous interferences
 - Therapeutic drugs
 - Dietary supplements

همولیز

از بین عوامل ایجاد کننده تداخل، همولیز مهم‌ترین و شایع‌ترین عاملی است که در همه آزمایشگاه‌های پزشکی در سراسر جهان سبب بروز تداخل و ایجاد خطا در ارزیابی‌های آزمایشگاهی می‌شود.

مهم‌ترین عواملی که سبب همولیز نمونه اخذ شده می‌شوند عبارت‌اند از:

- طولانی شدن زمان نمونه گیری و تکنیک ضعیف در نمونه گیری
- استفاده از سر سوزن‌های بسیار باریک
- مکش ناگهانی و پر فشار هنگام خون گیری
- تخلیه خون از سر سوزن به داخل لوله جمع آوری نمونه
- خشک نشدن الکل به کار رفته برای ضد عفونی کردن موضع خون گیری
- سانتریفیوژ نمودن خون بلافاصله پس از نمونه گیری و قبل از آن که خون منعقد شود.
- سانتریفیوژ با دور شدید و نامتناسب و مدت خیلی طولانی
- و ...

اما در مورد همولیز سؤالات مهم و متعددی وجود دارد که آزمایشگاه‌ها باید به آن‌ها پاسخ دهند.

اول این که از کجا تشخیص دهیم که نمونه ای همولیز است یا نه؟ آیا صرفاً ارزیابی چشمی کافی است؟

دوم این که آیا همه نمونه‌هایی که دارای همولیز باشند باید reject شوند یا مقدار همولیز مهم است؟

سوم این که آیا روشی برای اصلاح و برطرف نمودن تداخل ایجاد شده توسط همولیز وجود دارد؟

و بالاخره مهم تر از همه این که همولیز با چه مکانیسمی سبب تداخل در نتایج آزمایش‌ها می‌شود؟ و چه تست‌هایی بیشتر تحت تأثیر همولیز قرار می‌گیرند؟

دستورالعمل ارزیابی نمونه سرم از نظر وجود همولیز به طور کلی دو روش کیفی و کمی برای ارزیابی نمونه از نظر شدت همولیز وجود دارد.

۱- روش کیفی: همه نمونه‌ها قبل از انجام آزمایش باید به صورت چشمی مورد ارزیابی قرار گیرند. چنانچه نمونه سرم پس از سانتریفیوژ کاملاً شفاف و دارای رنگ طبیعی (زرد کهربایی) بود مشکلی برای ادامه آزمایش وجود ندارد، ولی چنانچه با چشم مقادیری همولیز رویت شود، باید میزان غلظت هموگلوبین آزاد سرم serum free hemoglobin تعیین تا شدت همولیز مشخص گردد.

۲- روش کمی: برای آن که میزان همولیز را به روش کمی تعیین کنیم ابتدا باید محلول همولیزات با روش شوک اسمزی تهیه گردد.

روش کار: ابتدا ۶ میلی لیتر خون EDTA دار تهیه شده و پس از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰، پلاسما را جدا کرده و دور ریخته و گلبول‌ها را ۲ بار با محلول سالین ۰.۹٪ شستشو می‌دهیم. سپس ۲ cc از سلول‌های شسته شده را به ۳ cc آب مقطر اضافه می‌کنیم و تکان می‌دهیم تا کاملاً همولیز شود. (همولیز ۱۰۰٪ به وجود بیاید)

سپس مجدداً سانتریفیوژ نموده و محلول روبی را که همان همولیزات است را مورد استفاده قرار می‌دهیم غلظت هموگلوبین را در محلول همولیزات با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۱۰ نانومتر مشخص می‌کنیم:

- چنانچه غلظت هموگلوبین آزاد سرم کمتر از ۱۰ mg/dl باشد بدون همولیز

۲۵۰-۱۰۱ mg/dl باشد همولیز شدید
 - چنانچه غلظت هموگلوبین آزاد سرم بیش از
 ۲۵۰ mg/dl باشد همولیز خیلی شدید است.
 برای بلانک از نمونه سرم فاقد همولیز استفاده
 می‌کنیم.

- چنانچه غلظت هموگلوبین آزاد سرم بین
 ۵۰-۱۰ mg/dl باشد همولیز خفیف
 - چنانچه غلظت هموگلوبین آزاد سرم بین
 ۱۰۰-۵۰ mg/dl باشد همولیز متوسط
 - چنانچه غلظت هموگلوبین آزاد سرم بین



می‌نماید. مهم‌ترین مثال برای تداخل طیفی یا spectral اندازه گیری آلکالن فسفاتاز و گاماگلوبولین ترانسفرز است.
 ۳- تداخل شیمیایی (Chemical): گاهی هموگلوبین آزاد شده از لیز سلول‌ها می‌تواند با آنالیت مورد اندازه گیری cross reaction داشته باشد. مهم‌ترین مثال برای تداخل شیمیایی تست CK است.

۴- رقیق شدن (Dilutional): در همولیزهای شدید مقدار مایعی که از لیز سلول‌ها رها شده و وارد سرم می‌شود می‌تواند در سنجش بعضی از آنالیت‌ها همانند یون‌های Na و Cl ایجاد اختلال نماید.

اما مهم‌ترین سؤال در مواجهه با همولیز این است: در ازاء چه مقداری از همولیز باید نمونه را reject کنیم؟؟؟
 پاسخ این است که برای هر آنالیتی باید یک cut-off تعریف شود که در همولیز بیش از آن، نتیجه سنجش فاقد اعتبار است.

□ مکانیسم‌های تداخل ناشی از همولیز

همولیز با مکانیسم‌های متفاوتی می‌تواند سبب ایجاد تداخل در تست‌های آزمایشگاهی شود.

مهم‌ترین این مکانیسم‌ها عبارت‌اند از:

۱- اضافه شدن غلظت آنالیت مورد اندازه گیری (Additive): متعاقب همولیز، آنالیت‌های درون گلبول‌ها وارد سرم می‌شوند و سبب افزایش غلظت آن آنالیت در سرم می‌گردند. این مکانیسم خصوصاً در مورد موادی که غلظتشان درون سلول زیاد است اهمیت دارد و مثال‌های واضح آن افزایش LDH، K، و Ast در نمونه‌های همولیز است.

۲- افزایش جذب نوری در طول موج خاص (Spectral): متعاقب همولیز هموگلوبین وارد سرم می‌شود. این هموگلوبین آزاد بیشترین جذب نوری را در طول موج‌های ۴۱۵، ۵۴۰ و ۵۷۰ نانومتر دارد و لذا در سنجش آنالیت‌هایی که در این طول موج‌ها اندازه گیری می‌شوند ایجاد تداخل



نمی‌کند.
اغلب اوقات تجمع شیلو میکرون‌ها است که سبب ایجاد کدورت می‌شود.
شایع‌ترین علت بروز لیپمی در نمونه‌ها، رعایت نکردن زمان کافی و مناسب ناشتایی است.

□ مکانیسم ایجاد تداخل توسط لیپمی

۱- پراکندگی نور (Light scatter): که خصوصاً در روش‌های فتومتریک مثل اندازه‌گیری آنزیم‌ها تداخل ایجاد می‌نماید.

۲- جابجایی حجمی (Volume displacement): لیپیدها سبب تغییر فاز آبی نمونه می‌شوند. این مورد خصوصاً در متدهای indirect ISE ایجاد تداخل می‌نماید.



□ روش‌های برطرف نمودن تداخل ایجاد شده توسط لیپمی

برای این منظور باید با روشی خاص اقدام به برداشت لیپیدها از نمونه نمود و مقدار لیپیدها را در نمونه به حداقل رساند. ترجیحاً بهتر است که مقدار تری‌گلیسرید در نمونه را به کمتر از 15 mmol/L رساند.
مهم‌ترین روش‌های شفاف‌سازی سرم برای از بین بردن اثر تداخلی لیپمی عبارت‌اند از:

- ۱- اولتراسانتریفیوژ (ultracentrifugation): برای این منظور باید نمونه با سانتریفیوژهای مخصوص، به مدت ۱۵ دقیقه با دور $90,000 \text{ rpm}$ سانتریفیوژ شود.
- ۲- High speed centrifugation: در این روش باید مدت ۱۵ دقیقه با دور $13,000 \text{ rpm}$ سانتریفیوژ شده و سپس قسمت رویی که شفاف شده به لوله دیگری منتقل شده و آزمایش‌ها بر روی آن انجام شود.
- ۳- استفاده از عامل شفاف‌کننده سرم

بعضی از کمپانی‌های معروف و بزرگ در مورد سیستم‌های خود cut-off تعریف کرده‌اند، مثلاً Beckman برای مدل DxC800 مقدار هموگلوبین معادل 5 g/L را به عنوان cut-off ذکر کرده است. در حالی که کمپانی Roche برای سیستم‌های Integra خود هموگلوبین 6 g/L را ذکر کرده است.

به طور کلی باید توجه داشت که در صورت استفاده از لوله‌های جمع‌آوری نمونه که حاوی ژل‌های جداکننده باشند، مقدار همولیز به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد. همچنین رعایت اصول نمونه‌گیری و رعایت زمان مناسب جهت انعقاد خون قبل از سانتریفیوژ، می‌تواند از بروز همولیز به میزان زیادی بکاهد.

توجه داشته باشید که در کنترل چشمی، نمونه‌هایی که مقدار هموگلوبین آزاد سرم آن‌ها کمتر از 50 mg/dl باشد بدون همولیز تشخیص داده می‌شوند، حال آن‌که در روش کمی قادر خواهیم بود همولیزهای خفیف که در آن‌ها غلظت هموگلوبین آزاد سرم بین 10 تا 50 mg/dl است را هم تشخیص دهیم. همین مقدار همولیز خفیف در بعضی از تست‌ها همانند اسید فسفاتاز و LDH می‌تواند تأثیر چشمگیری داشته باشد و خطای نسبتاً بزرگی ایجاد کند.
همولیز سبب افزایش اسید فسفاتاز سرم، K، CPK، Mg، Zn و ... می‌شود.

در مورد بیلی‌روبین: همولیز در روش اسپکتروفوتومتری مستقیم سبب افزایش کاذب نتیجه آزمایش می‌شود، حال آن‌که در روش دیازو سبب کاهش کاذب نتیجه آزمایش می‌گردد.

□ Lipemia

پس از همولیز، لیپمی یا Lipemia شایع‌ترین علت تداخل درون‌زا است که می‌تواند بر روی نتایج تست‌های آزمایشگاهی اثر گذاشته و سبب بروز خطا شود.
لیپمی به حضور لیپیدها با غلظت زیاد در سرم می‌گویند. وقتی نمونه سرم لیپمیک باشد رنگ سرم شیری رنگ (milky) شده و ظاهر سرم دارای کدورت (turbidity) می‌گردد. از آنجا که اندازه لیپوپروتئین‌ها متفاوت است لذا تجمع همه انواع لیپوپروتئین‌ها به یک اندازه ایجاد کدورت

به طور مثال یک نمونه ای که غلظت اولیه تری گلیسرید آن ۵۹,۲ mmol/L باشد پس از ۲ بار سانتریفیوژ پر سرعت به غلظت ۱۷,۳ mmol/L می‌رسد، حال آن که با روش اولتراسانتریفیوژ غلظتش به ۸,۱ mmol/L کاهش می‌یابد. نهاد بین المللی استانداردهای آزمایشگاه بالینی The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) برای تشخیص و اصلاح تداخل در آزمایش‌های پزشکی سند مهم و معتبری با نام اختصاری EP07 تدوین نموده است. همچنین جداول تکمیلی برای بررسی تأثیر تداخلات بر روی پارامترهای مختلف در سند EP37 عرضه شده است.

(Lipoclear or Lipid clearing agent): در این روش باید نمونه سرم به نسبت ۱:۱۰ با عامل شفاف کننده مخلوط شود (یک قسمت Lipoclear به علاوه ۹ قسمت سرم) و پس از مخلوط شدن و سانتریفیوژ معمولی، قسمت رویی که کاملاً شفاف است مورد آزمایش‌های بعدی قرار گیرد. ۴- در مورد روش‌های indirect ISE حتماً باید از روش ISE هم برای مقایسه استفاده کرد. باید توجه داشت که روش اولتراسانتریفیوژ (در صورت دسترسی داشتن)، قطعاً به روش سانتریفیوژ با سرعت زیاد ارجح است. خصوصاً در مواردی که شدت لیپمیک بودن سرم خیلی زیاد باشد.

References

- 1- Interference with Clinical Laboratory Analyses Clin.CHEM Vol 40 No 11, 1994. Martin H.Kroll and Ronald J.Elin.
- 2- Clinical Laboratory Testing Interference – CLSI Blog June 3, 2019.
- 3- Endogenous Interferences in Clinical Laboratory Tests; Icteric, Lipemic and Turbid samples. Martin H.Kroll, Christopher R.McCudden-2013.
- 4- Analytical Interference, More than Just a Laboratory Problem Steven C.Kamierczak, PhD and Paul G.Catran, MD American Journal of Clinical Pathologists, 2000, 113, 9-11.
- ۵- مقایسه روش‌های کمی و کیفی تعیین همولیز در نمونه‌های سرم مجله علوم آزمایشگاهی، خرداد و تیر ۱۳۹۴، دوره نهم (شماره ۲): ۳۸-۳۲.

