تداخل در نتایج آزمایش‌ها

● دکتر سید قاسم مصطفوی
دکترای علوم آزمایشگاهی، عضو هئیت مدیره انجمن دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران

● دکتر هاله حکمتی
دکترای علوم آزمایشگاهی، مرکز جراحی حضرت فاطمه زهرا (س)، آزمایشگاه

❑ خلاصه

تداخل در آزمایش‌های پزشکی، یعنی وجود ماده دیگری غیر از پارامتر اصلی مورد اندازه گیری، 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، پدیده ای شایع در آزمایش‌های پزشکی است و شامل انواع تداخلات درون زا و تداخلات برون زا می‌باشد.

مهم‌ترین عواملی که سبب ایجاد تداخل درون زا می‌شوند عبارت‌اند از:

۱- هموگلوبین (همولیز)، ۲- لیپید (لیپمی)، ۳- بیلی‌روبین (ایکتریک) و ۴- پارا پروتئین‌ها

اصلی‌ترین عوامل ایجاد تداخل برون زا هم داروهای مصرفی توسط بیمار هستند.

گاهی هم موادی که به لوله‌های جمع آوری 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 درون زا، تداخل برون زا، همولیز، لیپمی، افزایش بیلی روبین، آزمایشگاه تشخیص طبی

❑ مقدمه

تداخل یا Interference یعنی وجود یک ماده در نمونه مورد آزمایش که نتیجه اندازه گیری آنالیت دیگری را به طور کاذب تغییر دهد. به طور مثال چنانچه در آزمایش اندازه گیری کراتینین سرم به روش jaffe، مقدار بیلی روبین 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 آنالیت های 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 بی مورد بعدی و نهایتاً سبب تشخیص اشتباه و درمان ناصحیح می‌شود که می‌تواند با خسارات مالی و جانی زیادی همراه شود.

تداخل به انواع Endogenous (درون زا) و Exogenous (برون زا) طبقه بندی می‌شود.

❑ تداخل درون زا Endogenous interference

مربوط به وجود موادی است که ذاتاً در نمونه خود بیمار موجود هستند. به طور مثال هنگامی که تری گلیسرید بیمار بیش از حد بالا باشد ظاهر نمونه شیری رنگ شده و کدورت حاصله سبب ایجاد تداخل در اندازه گیری سایر آنالیت ها می‌شود.

❑ تداخل برون زا 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-04-26]

نمونه اضافه می‌شـــوند مثل ژل‌های جـــدا کننده و یا مواد نگهدارنده که می‌توانند گاهی در نتیجه اندازه گیری برخی از آنالیت ها تداخل ایجاد نمایند.

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

❑ مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده تداخل درون زا

تداخـــل درون زا یـــا Endogenous interference هنگامی بروز می‌نمایـــد که مواد مداخله گر به طور طبیعی در نمونه مورد آزمایش وجود داشته باشند.

مهم‌ترین عواملی که ایجاد کننده تداخل درون زا هستند عبارت‌اند از:

۱- همولیز

۲- لیپمیا (Lipemia) یا افزایش شیلومیکرون های سرم

۳- زردی (Icterus) یا افزایش بیلی روبین سرم

۴- پـــارا پروتئین‌هـــا (Paraproteins) مثـــل انـــواع آنتی‌بادی‌ها (اتوآنتی بادی‌ها و آنتی بادی‌های هتروفیل)

❑ مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده تداخل برون زا

این نـــوع از تداخل مربوط به وجود موادی اســـت که در حالت طبیعـــی در نمونه یافت نمی‌شـــوند و گاهی به طور موردی ممکن اســـت در نمونه یافت شوند. مهم‌ترین موارد شامل:

۱- تداخل مربوط به مصرف داروها Drug interference

۲- مصرف بعضی از ساپلمنت ها مثل بیوتین

۳-گاهـــی خود دارو مزاحمتی ایجاد نمی‌کند بلکه موادی که به عنوان نگه دارنده به دارو اضافه می‌شوند (additives) ایجاد تداخل می‌نمایند.

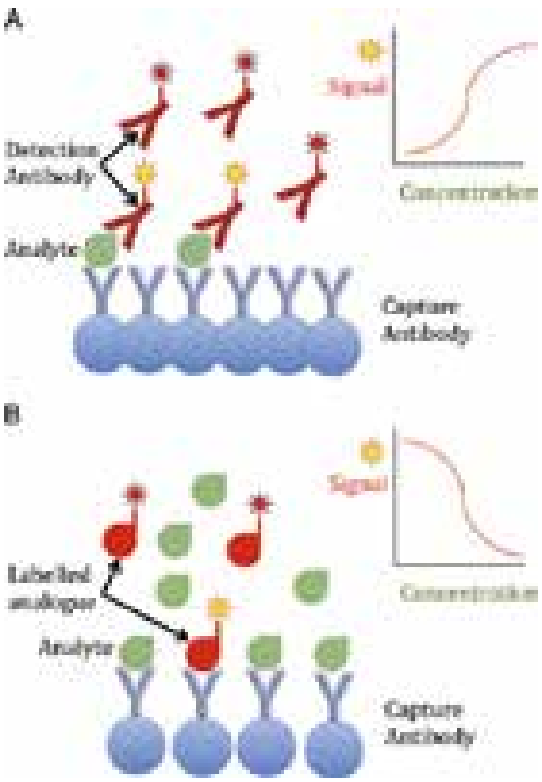
۴- مـــوادی که بـــه لوله‌های جمـــع آوری نمونه‌ها اضافه می‌شوند.

۵- وجود انواع سموم شیمیایی

۶- وجود محصولات گیاهی (herbal products)

۷- مایعاتی که به صورت IV تزریق می‌شوند.

گاهی تداخل روی داده وابســـته به متـــد انجام آزمایش اســـت. بـــه طـــور مثـــال در آزمایش‌هـــای ایمونولوژیک و هورمونی، وجود انواع آنتی بادی‌های مداخله گر سبب ایجاد تداخل می‌شـــوند منتهی این مداخله بیشـــتر در روش‌های two-site immunometric یـــا همـــان روش‌هـــای ســـاندویچ مشـــاهده می‌شـــوند بدین طریق که آنتی بادی مزاحم بین آنتی بادی capture و آنتی بادی detection پلی ایجاد می‌نمایند و سبب تداخل می‌شوند.



❑ نوع دیگری از تداخل هـــم وجود دارد به نام carryover interference

این نـــوع تداخل هنگامـــی روی می‌دهد کـــه مقداری از نمونه با غلظت زیاد به نمونه بعدی منتقل شـــود. علت اصلی carryover نقص در شستشوی پروب های دستگاه‌ها است.

البته انواع دیگری از تداخل هم وجود دارند که ندرتاً و در موارد محدودی مشـــاهده می‌شوند مثلاً تداخلی که به علت cross reaction روی می‌دهد به طور مثال در اندازه‌گیری یون کلر، وجود بی کربنات می‌تواند تداخل ایجاد کند.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-04-26]

گاهی هم مقدار آنالیت مورد اندازه گیری بسیار زیاد است (پدیده هـــوک) 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.

❑ همولیز

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

مهم‌تریـــن عواملی که ســـبب همولیز نمونه اخذ شـــده می‌شوند عبارت‌اند از:

- طولانی شـــدن 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
- خشـــک 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.
- ســـانتریفیوژ با دور شدید و نامتناســـب 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 تشـــخیص دهیم که نمونه ای همولیز است یا نه؟ آیا صرفاً ارزیابی چشمی کافی است؟

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

ســـوم این که آیا روشـــی برای اصـــلاح 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؟

دســـتورالعمل ارزیابی نمونه سرم از نظر وجود همولیز به طـــور 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 ســـانتریفیوژ کاملاً شفاف و دارای رنگ طبیعی (زرد کهربایی) بود مشـــکلی برای ادامه آزمایش وجود ندارد، ولی چنانچه با چشـــم مقادیری همولیز رویت شـــود، باید میزان غلظت هموگلوبین آزاد سرم serum free hemoglobin تعیین تا شدت همولیز مشخص گردد.

۲- روش کمـــی: برای آن که میـــزان 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 ســـانترفیوژ 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)

ســـپس مجدداً ســـانتریفیوژ نموده و محلول رویی 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:

- چنانچـــه غلظـــت هموگلوبیـــن آزاد ســـرم کمتـــر از ۱۰ mg/dl باشد بدون همولیز

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-04-26]

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

❑ 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، آنالیت های 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 K، LDH 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 آنالیت هایی که در این طول موج‌ها اندازه گیری می‌شوند ایجاد تداخل می‌نماید. مهم‌ترین مثال برای تداخل طیفی یا spectral، اندازه گیری آلکالن فسفاتاز و گاماگلوتامیل ترانسفراز 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 آنالیت ها 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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-04-26]

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 جمع آوری نمونه که حاوی ژل‌های جدا کننده باشند، مقدار همولیز به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد.

همچنین رعایت اصول نمونه گیری 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 آن که در روش کمی قادر خواهیم بود همولیزهای خفیف که در آن‌ها غلظت هموگلوبین آزاد سرم بین ۱۰ تا ۵۰ 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 فسفاتازسرم، K، CPK، Mg، Zn و ... می‌شود.

در مورد بیلی روبین: همولیز در روش اسپکتروفتومتری مستقیم سبب افزایش کاذب نتیجه آزمایش می‌شود، حال آن که در روش دیازو سبب کاهش کاذب نتیجه آزمایش می‌گردد.

❑ Lipemia

پس از همولیز، لیپمی یا Lipemia شایع‌ترین علت تداخل درون زا است که می‌تواند بر روی نتایج تست‌های آزمایشگاهی اثر گذاشته و سبب بروز خطا شود.

لیپمی به حضور لیپیدها با غلظت زیاد در سرم می گویند. 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 نمی‌کند.

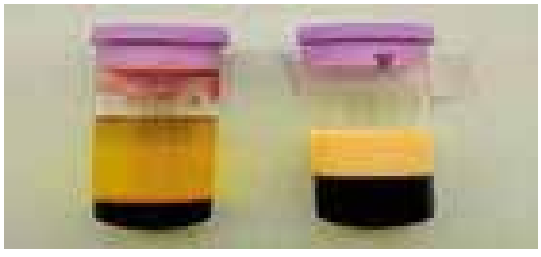
اغلب اوقات تجمع شیلو میکرون‌ها است که سبب ایجاد کدورت می‌شود.

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 اندازه گیری 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 تری گلیسرید در نمونه را به کمتر از ۱۵ mmol/L رساند.

مهم‌ترین روش‌های شفاف سازی 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 ۹۰,۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شود.

۲- High speed centrifugation: در این روش باید مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳,۰۰۰ 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 شفاف کننده سرم

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-04-26]

(**Lipoclear or Lipid clearing agent**): در این روش باید نمونه سرم به نسبت ۱:۱۰ با عامل شفاف کننده مخلوط شـــود (یک قسمت Lipoclear به علاوه ۹ قسمت سرم) و پس از مخلوط شدن و ســـانتریفیوژ 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 داشـــت که روش اولتراسانتریفیوژ (در صورت دسترسی داشتن)، قطعاً به روش سانتریفیوژ با سرعت زیاد ارجح اســـت. خصوصاً در مواردی که شـــدت لیپمیک بودن سرم خیلی زیاد باشد.

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 می‌رســـد، حـــال آن که با روش اولتراسانتریفیوژ غلظتش به ۸,۱ mmol/L کاهش می‌یابد.

نهاد بیـــن المللـــی اســـتانداردهای آزمایشـــگاه 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.

همچنیـــن جـــداول تکمیلـــی بـــرای بررســـی تأثیـــر تداخـــلات بـــر روی پارامترهای مختلف در ســـند EP37 عرضه شده است.

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- مقایســـه روش‌های کمی و کیفی تعیین همولیز در نمونه‌های ســـرم مجله علوم آزمایشگاهی، خرداد و تیر ۱۳۹۴، دوره نهم (شماره ۲): ۳۸-۳۲.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-04-26]