

Pouzdanost određivanja indeksa hemolize, lipemije i ikterije na koagulacijskim analizatorima

Palić, Jozefina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:793753>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-01-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Jozefina Palić

**Pouzdanost određivanja indeksa hemolize,
lipemije i ikterije na koagulacijskim
analizatorima**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Dunji Rogić na strpljenju, savjetima i omogućenoj izvedbi ovog diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem spec. med. biokemije i laboratorijske medicine Ivani Lapić na svojoj pomoći, trudu, brizi i prenesenom znanju tijekom izrade ovog rada i boravka u KBC-u Zagreb.

Velika zahvala ide mojoj obitelji, posebno roditeljima Franji i Kseniji koji su bili uz mene kroz čitavo školovanje, vjerovali u mene i sa strpljenjem slušali sve moje priče i filozofiranja. Hvala tati na svim čokoladama koje su olakšale učenje prije ispita. Hvala mom dečku Davidu na potpori, motivaciji i smijehu tijekom cijelog studiranja.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama za sve nezaboravne lijepe trenutke, druženja, izlaske, putovanja i smijanja, ali i na zajedništvu u teškim trenucima koje smo prošli zajedno. Hvala što ste mi studiranje učinili nezaboravnim i najljepšim djelom života i na prijateljstvima koja će, sigurna sam, potrajati čitav život.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Hemoliza	1
1.1.1. Spektrofotometrijska interferencija hemolize	3
1.1.2. Interferencija hemolize oslobađanjem unutarstaničnih sastojaka.....	3
1.1.3. Interferencija hemolize razrjeđenjem uzorka	4
1.1.4. Kemijska interferencija hemolize	4
1.2. Lipemija	5
1.3. Ikterija	7
1.4. Utjecaj hemolize, lipemije i ikterije na koagulacijske pretrage	8
1.5. Vizualna i automatska detekcija hemolize, lipemije i ikterije	10
1.6. Princip automatske detekcije na analizatorima	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. Uzorci	13
3.2. Materijali i metode	13
3.2.1. Hemoliza	13
3.2.2. Lipemija.....	15
3.2.2.1 Načelo fotometrijske metode s glicerolfosfat-oksidadom (GPO-PAP).....	16
3.2.3. Ikterija	16
3.2.3.1 Kolorimetrijska metoda s diazoreagensom	17
3.2.4. Metoda određivanja HIL indeksa na analizatoru Cobas c501.....	17
3.2.5. Metoda određivanja HIL indeksa na analizatoru Sysmex CS-5100	17
3.2.6. Metoda određivanja HIL indeksa na analizatoru Attelica COAG 360	18
4. REZULTATI	20
4.1. Određivanje indeksa hemolize	20
4.2. Određivanje indeksa lipemije.....	22
4.3. Određivanje indeksa ikterije	23
5. RASPRAVA	25
6. ZAKLJUČAK	31
7. LITERATURA	33
8. SAŽETAK	37
9. SUMMARY	38

1. UVOD

Važnost laboratorijskih pogrešaka koje se pojavljuju u predanalitičkoj fazi laboratorijskog procesa davno je prepoznata. Predanalitičke pogreške čine čak dvije trećine ukupnih laboratorijskih pogrešaka te je važno intenzivno raditi na tome da se učestalost tih pogrešaka smanjuje. Predanalitički čimbenici koji mogu dovesti do predanalitičkih pogrešaka dijele se na utjecajne i interferirajuće čimbenike. Utjecajni čimbenici su utjecaji na laboratorijske rezultate biološkog podrijetla koji se najčešće pojavljuju *in vivo* (unutar tijela), ali mogu nastati i tijekom transporta i pohrane uzorka te dovode do stvarne promijene koncentracije analita u uzorku. Oni mijenjaju rezultat laboratorijske pretrage neovisno o korištenoj metodi. Interferirajući čimbenici (interferencije) su čimbenici koji mogu dovesti do promjene rezultata laboratorijskog testiranja, pritom ne mijenjajući stvarnu koncentraciju analita u uzorku. Njihov utjecaj na promjenu rezultata ovisi o korištenoj metodi i analizatoru. (Rifai i sur., ured., 2018). Netočni rezultati uzrokovani predanalitičkim pogreškama mogu uzrokovati ponavljanje testova, krivu interpretaciju nalaza, pogrešnu dijagnozu i u konačnici nepovoljan ishod za pacijenta. (Ji i Meng, 2011). Među najčešćim interferencijama koje mogu dovesti do netočnih laboratorijskih rezultata su **hemoliza, lipemija i ikterija**.

Pojam „**HIL indeksi**“ je zajednički naziv za tzv. indekse (tj. kvantitavnu procjenu) hemolize, lipemije i ikterije. HIL indeksi rezultat su automatske detekcije interferencija hemolize, lipemije i ikterije na automatiziranim analizatorima u medicinsko – biokemijskim laboratorijima. To su vrijednosti koje nam govore o prisutnosti i stupnju hemolize, lipemije i ikterije u biološkom uzorku, a važne su za pravilnu interpretaciju laboratorijskih rezultata dobivenih za pojedine analite na određenom analizatoru. Mogućnost automatskog očitavanja HIL indeksa danas je implementirana u gotovo sve biokemijske i suvremene koagulacijske analizatore te su postali zlatni standard u evaluaciji kvalitete uzoraka (Lippi i Cadamuro, 2018).

1.1. Hemoliza

Iako su prve studije o utjecaju hemolize uzorka na rezultate laboratorijskog testiranja objavljene još prije 40-ak godina, učestalost hemoliziranih uzoraka do danas je ostala prilično velika (Lippi i Cadamuro, 2018). *In vitro* (izvan tijela) hemoliza je najčešća predanalitička pogreška, s frekvencijom među ostalim interferencijama do 30% (Rifai i sur., ured., 2018), te

je u više od 60% slučajeva razlog za odbijanje uzoraka koji se primaju u medicinsko-biokemijske laboratorije (Simundic i sur., 2019).

Hemoliza je definirana kao proces razaranja stanične membrane eritrocita i ostalih krvnih stanica pri čemu dolazi do izlivanja staničnog sadržaja u izvanstanični prostor, tj. plazmu, najčešće popraćen crvenom obojenosti seruma ili plazme u različitim stupnjevima nakon centrifugiranja pune krvi (Rifai i sur., ured., 2018). Hemoliza uglavnom nastaje *in vitro* te je najčešće uzrokovana nepravilnim rukovanjem s uzorkom izvan i unutar laboratorija (Lippi i sur., 2011). Samo 3% svih hemolitičnih uzoraka čini *in vivo* nastala hemoliza (Carraro i sur., 2000) koja je posljedica nekog patološkog procesa u organizmu.

In vitro hemoliza nije posljedica patološkog procesa, već posljedica rukovanja uzorkom, stoga se većim dijelom može i treba spriječiti. Može nastati tijekom uzorkovanja (neprimjerena veličina igle, uzorkovanje preko katetera), tijekom transporta u laboratorij (temperatura, trenje, nepažnja) i pripreme uzorka za analizu (uvjeti centrifugiranja, miješanje) te tijekom pohrane uzorka (Simundic i sur., 2019). Pokazano je da je učestalost nastanka hemolize različita ovisno o bolničkim odjelima, karakteristikama populacije pacijenata i stručnjaku koji obavlja flebotomiju (vađenje krvi). Najveća je na odjelu za hitni bolnički prijem, u klinici za pedijatriju i u jedinicama intenzivne njege gdje krv uzimaju većinom medicinske sestre, a najmanja u jedinicama za vađenje krvi vanjskim pacijentima gdje krv uzima educirano laboratorijsko osoblje (Lippi i sur., 2009).

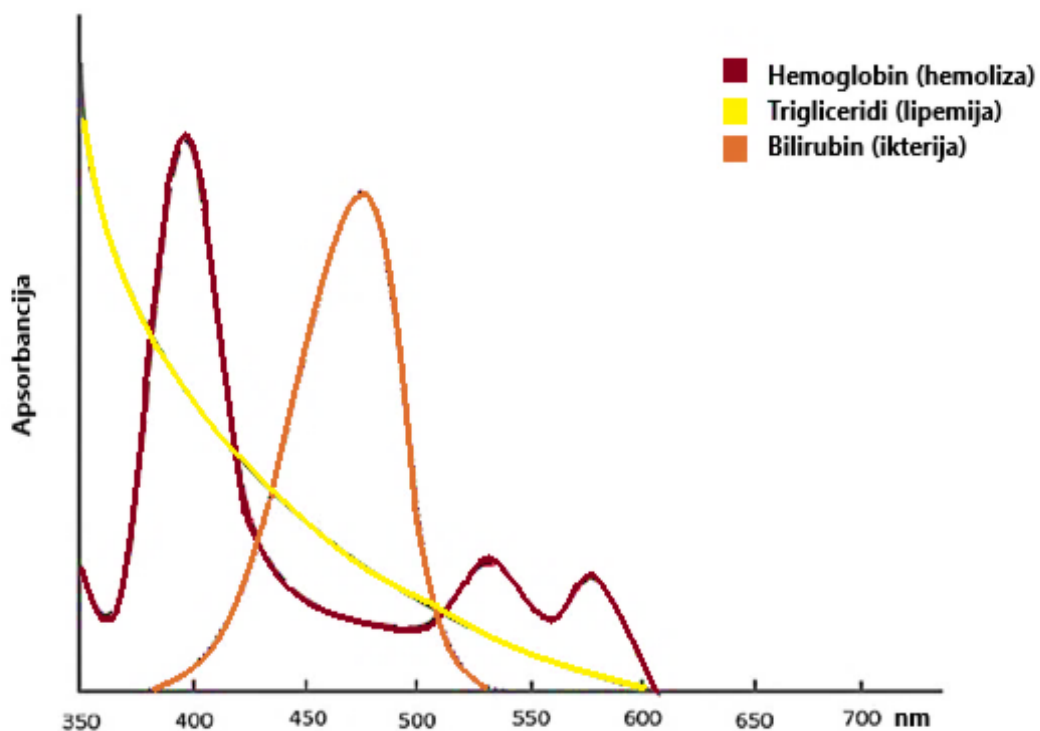
In vivo hemoliza prisutna je u tijelu pojedinca dok uzorak još nije uzet. Ona može biti intravaskularna i ekstravaskularna ovisno o mjestu raspada eritrocita, a moguća je posljedica infekcija (malarija), mehanizama posredovanih imunim sustavom (autoimuna hemolitička anemija, transfuzijska reakcija), nasljednih poremećaja eritrocita (hemoglobinopatije, membranski defekti), mehaničkih faktora (umjetni srčani zalisci, veliki napor), toksičnih efekata (alkohol, droge), opekline, diseminirane intravaskularne koagulacije i drugih mehanizama. S obzirom da je to potencijalno opasno stanje za pacijenta, važno je da laboratoriji imaju proceduru prema kojoj će prepoznati *in vivo* hemolizu, istražiti njen mogući uzrok i odmah javiti saznanja liječniku.

Neovisno o podrijetlu hemolize, postoji više mehanizama kojima hemoliza utječe na netočnost konačnih laboratorijskih rezultata. Oni se općenito mogu podijeliti u četiri skupine: spektrofotometrijska interferencija, oslobađanje unutarstaničnih sastojaka u uzorak, razrjeđenje uzorka i kemijska interferencija. Stupanj interferencije ovisi o stupnju hemolize te

o korištenoj metodi i analizatoru - kod nekih metoda hemoliza značajno utječe na rezultat dok kod drugih ne utječe uopće.

1.1.1. Spektrofotometrijska interferencija hemolize

Hemoglobin koji se oslobađa iz eritrocita apsorbira na različitim valnim duljinama te svojom apsorpcijom mijenja rezultate spektrofotometrijskih metoda, ovisno o tome na kojim valnim duljinama se mjeri apsorbcija u metodi, o korištenom reagensu, o koncentraciji slobodnog hemoglobina, o stajanju uzorka te o korištenoj slijepoj probi. Hemoglobin ima najveću apsorbciju na valnim duljinama od 415, 540 i 570 nm, a oksihemoglobin između 531 i 543 nm (Slika 1.) (Simundic i sur., 2019). Shodno tome, ako se u metodi koristi mjerenje apsorbcije na ovim valnim duljinama kako bi se kvantificirao određeni analit, ovisno o stupnju hemolize može doći do lažno povišenih rezultata za taj analit.



Slika 1: Apsorpcijski spektar hemoglobina, triglicerida i bilirubina.

1.1.2. Interferencija hemolize oslobađanjem unutarstaničnih sastojaka

Oslobađanje sadržaja iz svih krvnih stanica može dovesti do interferencije jer se stanični sadržaj uvelike razlikuje od izvanstaničnog, tj. seruma ili plazme. Neki analiti se u stanici nalaze u puno većoj koncentraciji nego izvan stanice pa njihovim oslobađanjem može doći do

lažno povišenih rezultata prilikom mjerenja tih analita u serumu ili plazmi. Odstupanje od točnih rezultata je veliko već kod manjeg stupnja hemolize za analite koji su u stanici od 30 pa do 160 puta većoj koncentraciji nego u serumu ili plazmi. To su laktat-dehidrogenaza, anorganski fosfati, kalij, aspartat-aminotransferaza i folna kiselina (Simundic i sur., 2019). Do lažno pozitivnih vrijednosti neuron-specifične enolaze može doći i kod najmanjeg stupnja hemolize, nevidljivog ljudskom oku, zato što je u zdravih ljudi praktički nema u serumu i plazmi (Mastroianni i sur., 2019). Kod određivanja analita čija je koncentracija u stanici desetak puta veća nego u serumu ili plazmi, do značajnog odstupanja dolazi pri većem stupnju hemolize. Takvi analiti su alanin-aminotransferaza, bilirubin, kreatinin, ureja, lipaza i magnezij. Slobodni hemoglobin može utjecati na određivanje ukupne koncentracije proteina u serumu te na elektroforezu serumskih proteina gdje je haptoglobin-hemoglobin kompleks vidljiv u području α_2 -globulina i β -globulina, a slobodni hemoglobin u području β -globulina kao vrpca crvene boje.

1.1.3. Interferencija hemolize razrjeđenjem uzorka

Neki analiti se u plazmi i serumu nalaze u većoj koncentraciji nego u stanici zbog čega pri velikom stupnju hemolize može doći do efekta razrjeđenja uzorka, odnosno njihova koncentracija može biti prividno snižena. To su albumin, bilirubin, glukoza i natrij. Ovaj mehanizam interferencije ipak je manje značajan nego oslobađanje unutarstaničnog sadržaja te je njegov efekt vidljiv tek kod velikog stupnja hemolize kada je koncentracija slobodnog hemoglobina u plazmi ili serumu veća od 3 g/L.

1.1.4. Kemijska interferencija hemolize

Kemijski, reagirajući s komponentama testa, prvenstveno može interferirati slobodni hemoglobin. Hemoglobin interferira s komponentama kemijske reakcije direktnim mehanizmom mijenjajući formiranje produkta reakcije zbog svoje pseudo-peroksidazne aktivnosti (npr. inhibiranje reakcije, kompeticija za supstrat). Indirektnim mehanizmom različite komponente krvnih stanica oslobođene prilikom hemolize mogu utjecati na postupak mjerenja analita izravnim ili neizravnim nadmetanjem za molekule u reagensima, inhibiranjem indikatorskih reakcija te modificiranjem analita složenošću, proteolizom ili precipitacijom. Primjerice, enzim katepsin E oslobođen iz eritrocita uzrokuje proteolizu protutijela i antigena u imunokemijskim testovima (Rifai i sur., ured., 2018). Vrlo često više gore objašnjenih mehanizama u kombinaciji dovode do interferencije hemolize kod određivanja analita (Simundic i sur., 2019).

1.2. Lipemija

Lipemija je nakon hemolize najčešća endogena interferencija koja utječe na rezultate laboratorijskih testova. Za razliku od hemolize koja je prepoznata kao bitna i vodeća interferencija, lipemija je nedovoljno primijećena. Učestalost lipemije varira od 0,5 – 2,5%, ovisno o vrsti bolnice te udjelu bolničkih i vanjskih pacijenata (Nikolac, 2014). Pokazano je da je frekvencija lipemije među vanjskim pacijentima veća od ostalih interferencija, čak i od hemolize. Razlog tomu je što vanjski pacijenti često na vađenje krvi ne dolaze natašte ili nisu dovoljno upoznati s mogućim utjecajem lipemije na laboratorijske pretrage i s važnosti pripreme za uzorkovanje krvi (Simundic i sur., 2010). Donedavno nisu postojale jedinstvene smjernice o tome što znači biti natašte, tj. koliko vremena prije uzorkovanja i što pacijenti ne smiju konzumirati, već je svaki laboratoriji izdavao svoje upute na različite načine. Od 2014. postoje jedinstvene smjernice koje je izdao EFLM (The European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) i prema njima pacijenti moraju biti natašte 12 h prije uzorkovanja.

Lipemija je zamućenje uzorka vidljivo golim okom, uzrokovano raspršenjem svjetlosti zbog prisutnosti lipoproteinskih čestica (Rifai i sur., ured., 2018). Lipemija je u serumu i plazmi vidljiva golim okom počevši od koncentracije ukupnih triglicerida 3,4 mmol/L. Lipoproteini se razlikuju u veličini i sastavu pa različito doprinose zamućenju uzorka. Hilomikroni su najveće lipoproteinske čestice te njihovo nakupljanje uzrokuje najveće zamućenje uzorka, nakupljanje VLDL čestica nešto manje, dok nakupljanje LDL-a i HDL-a ne uzrokuje zamućenje (Nikolac, 2014).

Najčešći uzrok lipemije među bolničkim pacijentima je parenteralna infuzija koja sadrži smjesu bogatu trigliceridima kao što je npr. Intralipid, zatim diabetes melitus i nasljedne hiperlipidemije (Mainali i sur., 2017). Drugi uzroci su alkoholizam, nealkoholna masna jetra, hipotireoidizam, pankreatitis, primarna bilijarna ciroza, kronično zatajenje bubrega te uzimanje nekih lijekova, npr. inhibitora proteaze i estrogena (Dasgupta i Sepulveda, ured., 2013).

Četiri su mehanizma interferencije lipemije: fizikalno-kemijski mehanizmi, spektrofotometrijska interferencija, nehomogenost uzorka i razlika u volumenu vode u uzorku (*engl. volume depletion effect*). Fizikalno-kemijskim mehanizmima lipemija najviše interferira u elektroforetskim i imunokemijskim metodama. U kapilarnoj elektroforezi serumskih proteina visoka koncentracija triglicerida u uzorku uzrokuje lažno povećanje α -globulinske

frakcije, a povećanje je proporcionalno koncentraciji triglicerida. U imunokemijskim metodama lipoproteini interferiraju u reakciji antigen-protutijelo tako što blokiraju vezna mjesta na protutijelu što dovodi do netočnog rezultata. Spektrofotometrijska interferencija vjerojatno je najčešći mehanizam interferencije lipemije s obzirom da se spektrofotometrijske metode najviše koriste u laboratorijskoj dijagnostici. Lipoproteinske čestice u lipemičnom uzorku apsorbiraju svjetlost u području valnih duljina od 350 nm do 600 nm bez specifičnih apsorpcijskih pikova (Slika 1.), što uzrokuje smanjenje intenziteta svjetlosti koja prolazi kroz uzorak. Apsorpcija je obrnuto proporcionalna valnoj duljini i najveća je u ultraljubičastom području. Iz tog razloga lipemija jako interferira u optičkom testu kod kojeg se u indikatorskoj reakciji koristi svojstvo koenzima NAD(H) i NADP(H) da apsorbiraju svjetlost na valnoj duljini od 340 nm. Osim apsorpcije, lipemija dovodi do raspršenja svjetlosti koje nastaje u svim smjerovima, a intenzitet raspršenja ovisi o broju i veličini lipoproteinskih čestica te o valnoj duljini mjerenja. Na taj način lipemija interferira u turbidimetrijskim i nefelometrijskim metodama (Rifai i sur., ured., 2018). Utjecaj lipemije na spektrofotometrijske metode ovisi o metodi i reagensu te je različit među proizvođačima (Nikolac i sur., 2013). Lipemija uzrokuje nehomogenost uzorka nakon centrifugiranja tako što se lipoproteinske čestice raspoređuju u frakcije ovisno o gustoći. Hilomikroni i VLDL imaju najmanju gustoću i zadržavaju se na površini epruvete pa se analiti koji su hidrofobni i topljivi u mastima koncentriraju na površini u tom sloju. Hidrofilni analiti topljivi u vodi zato se koncentriraju niže u uzorku. S obzirom da igle u analizatorima većinom uzimaju uzorak u površinskom dijelu epruvete te da analiti u ovom slučaju nisu ravnomjerno raspoređeni u uzorku dolazi do lažno povišenih ili lažno sniženih rezultata ovisno o topljivosti pojedinog analita.

Prisutnost lipoproteinskih čestica stvara razliku u volumenu vode u uzorku što najviše utječe na koncentraciju elektrolita. U zdravih pojedinaca lipidi čine manje od 10% seruma i plazme, a u lipemičnom uzorku njihov sadržaj penje se do 25%. Metode koje određuju elektrolite u ukupnom volumenu plazme ili seruma (uključujući volumen lipida), daju lažno smanjene koncentracije elektrolita zbog velikog razrjeđenja prije analize. To su npr. plamena fotometrija i indirektna potenciometrija. Učinak je primijećen kod jake lipemije kad je koncentracija triglicerida veća od 17 mmol/L (Nikolac, 2014). Najpoznatiji primjer interferencije kod indirektna potenciometrije je pseudohiponatremija (Dasgupta i Sepulveda, ured., 2013). Metode koje određuju elektrolite u vodenoj fazi bez razrjeđivanja (npr. direktna potenciometrija) daju točne rezultate i nisu pod utjecajem lipemije (Nikolac, 2014).

Za razliku od hemolize i ikterije, lipemiju možemo otkloniti te se tako analiza može napraviti u uzorku bez interferencija. Postoji nekoliko metoda za uklanjanje lipida iz seruma ili plazme. Preporučena metoda je ultracentrifugiranje kojim se u jednom koraku mogu otkloniti svi lipidi. Ultracentrifugiranje je centrifugiranje na 10 000 g koje je uspješno ako je lipemija uzrokovana pretežno hilomikronima, ako je uzorkovana VLDL-om postupak treba ponoviti više puta. Površinski sloj lipida koji nastane nakon centrifugiranja se uklanja. Centrifugiranje nije preporučljivo ako se određuju hormoni, lijekovi i druge hidrofobne supstance jer se one zadržavaju u lipidnom sloju koji se uklanja. Lipidi se mogu ukloniti i postupkom delipidiranja koristeći razne uklanjajuće agense kao što su magnezijev klorid, ciklodekstrin, polietilen glikol, heksan i dr. Ova metoda se široko koristi, no potrebno ju je koristiti s oprezom jer utječe na koncentraciju nekih tvari u uzorku, npr. smanjuje koncentraciju proteina. Za analite koji su topljivi u lipidima koristi se metoda razrjeđenja uzorka. Treba paziti da razrjeđenje ne bude preveliko, ali i da bude dovoljno da se ukloni interferencija (Nikolac, 2014).

1.3. Ikterija

Ikterija je klinički definirana kao stanje kod kojeg je koncentracija bilirubina u krvi veća od 100 $\mu\text{mol/L}$ (Rifai i sur., ured., 2018). Normalna koncentracija bilirubina u serumu/plazmi za odrasle je do 20 $\mu\text{mol/L}$, a promjena boje seruma/plazme je vidljiva kod koncentracije bilirubina iznad 34 $\mu\text{mol/L}$. Za razliku od hemolize i lipemije na pojavu ikterije ne možemo utjecati jer joj je uzrok uvijek patološki. Često je prisutna u pacijenata na odjelu intenzivne njege, odjelu gastroenterologije i u klinikama za pedijatriju (Rifai i sur., ured., 2018).

Bilirubin interferira u puno metoda za određivanje enzima, elektrolita, lipida, metabolita, proteina, hormona i dr. Ikterija interferira putem dva mehanizma: spektrofotometrijski i kemijski u reakcijama. Bilirubin uzrokuje spektrofotometrijsku interferenciju zato što apsorbira svjetlost na valnim duljinama između 400 nm i 540 nm s karakterističnim pikom na 460 nm (Slika 1.). Metode u kojima se apsorbancija mjeri na ovim valnim duljinama zato daju netočne rezultate, najpoznatiji primjer je Jaffeova metoda za određivanje kreatinina u kojoj se mjeri apsorbancija obojenog kreatinin-pikrata na 500 nm (Farrell i Carter, 2016). Bilirubin interferira kemijski tako što uzrokuje negativno odstupanje rezultata u metodama koje koriste H_2O_2 u međureakcijama (Rifai i sur., ured., 2018) s peroksidazom i kromogenom (npr. metode za određivanje kolesterola, glukoze, mokraćne kiseline i triglicerida). Peroksidaza katalizira oksidaciju bilirubina s H_2O_2 u biliverdin, pa zato što se H_2O_2 koristi za oksidaciju bilirubina ne dolazi do oksidacije kromogena i nema promjene/nastanka boje u reakciji. Oba

mehanizma interferencije mogu djelovati u istom uzorku te se smjer i intenzitet interferencije razlikuje ovisno o metodi. Postoje i razlike u interferenciji kod istih metoda, ali različitih proizvođača. Primjerice, i u Jaffeovoj i u enzimatskoj metodi za određivanje kreatinina, bilirubin različito interferira ovisno o proizvođaču, ponekad čak i ako su reagensi isti. Bilirubin je u krvi prisutan u više oblika koji se primarno dijele na konjugirani i nekonjugirani. Konjugirani oblik je bilirubin vezan na albumin i nije topljiv u vodi, dok je nekonjugirani oblik slobodan i topljiv. U krvi novorođenčeta dodatno mogu postojati fotometrijski izomeri bilirubina. Svi ti oblici imaju različita fizikalna i kemijska svojstva te drugačije djeluju na različite metode (Rifai i sur., ured., 2018).

Interferencija bilirubina teško se otklanja. Preporučene metode uklanjanja su oksidacija bilirubina i provođenje postupka slijepe probe. Moguće je provesti i razrjeđenje uzorka, ali samo za analite koji su u krvi prisutni u velikim koncentracijama, te promijeniti metodu ili instrument. Za maksimalnu dobrobit pacijenta laboratoriji bi trebali imati posebne protokole za određivanje kritičnih analita u prisutnosti ikterije kako bi se izbjeglo nepotrebno odbijanje uzoraka (Rifai i sur., ured., 2018).

1.4. Utjecaj hemolize, lipemije i ikterije na koagulacijske pretrage

O utjecaju hemolize, lipemije i ikterije na koagulacijske pretrage manje je istraženo nego o utjecaju na druge pretrage, npr. biokemijske i hematološke. Zbog složenosti analitičkih metoda i hemostaze, koagulacijska testiranja su osjetljivija na utjecaj hemolize, ikterije i lipemije nego testiranja u drugim područjima laboratorijske dijagnostike (Lippi i sur., 2013). Rezultati i zaključci u studijama koje su proučavale utjecaj hemolize, lipemije i ikterije na koagulacijske pretrage često su nedosljedni te nisu reproducibilni. Moguć razlog tome je različit utjecaj hemolize, lipemije i ikterije ovisno o instrumentu i metodi, ali i različito dizajnirane studije te korištenje različitih metoda i tehnologija za iste procese kao što je na primjer priprema hemolizata (Simundic i sur., 2019). Primjeri iz literature su sljedeći: Ratzinger i sur. (2014) nisu pokazali značajno odstupanje u rezultatima kada su prisutne interferencije hemolize, lipemije i ikterije za niti jedan koagulacijski parametar na analizatoru Sysmex CS-5100, jedino da je korelacija s rezultatima iz uzorka bez interferencije malo manja, ali ne značajno. Za razliku od njih Nagant i sur. (2016) pokazali su da su na Sysmex-u CS-5100 rezultati pretraga APTV i fibrinogena u prisutnosti hemolize (koncentracija slobodnog hemoglobina > 1 g/L za APTV i > 3 g/L za fibrinogen) imali odstupanje izvan tzv. Ricos kriterija (Ricos je baza podataka koja sadrži podatke o biološkoj varijabilnosti te

minimalne kriterije kvalitete analitičke izvedbe temeljene na biološkoj varijabilnosti - ukupnu pogrešku, nepreciznost i *bias*), da su rezultati za fibrinogen bili samo lagano pogođeni lipemijom (koncentracija triglicerida > 12,8 g/L) te da za PV, APTV i fibrinogen postoji veliki bias u prisutnosti ikterije (koncentracija ukupnog bilirubina > 235 µmol/L za PV i fibrinogen te >110 µmol/L za APTV). Novelli i sur. (2018) pokazali su da hemoliza snažno utječe na rezultate APTV-a i D-dimera, a slabo na antitrombin i fibrinogen, no na drugom koagulacijskom analizatoru (ACL TOP 750-CTS, Instrumentation Laboratory, Bedford, USA). Prema proizvođaču Sysmex-a CS-5100 hemoliza snižava rezultate APTV-a, antitrombina i fibrinogena, a povisuje rezultate PV-a i D-dimere (Di Fabio, 2013).

Hemoliza, lipemija i ikterija u koagulaciji uzrokuju analitičku i biološku interferenciju. Za detekciju stvorenog ugruška koagulometri koriste optičke ili mehaničke/elektromehaničke metode. Kod optičkih metoda koje se koriste na koagulacijskim analizatorima, razlog analitičke interferencije hemolize je slobodni hemoglobin koji zaostaje u plazmi nakon centrifugiranja, a apsorbira svjetlost na valnim duljinama koje se konvencionalno koriste u koagulacijskim metodama. Mehaničke metode koje prate kretanje metalne kuglice u uzorku nisu podložne takvoj spektralnoj interferenciji (Nougier i sur., 2019). Biološka interferencija nastaje zato što se prilikom hemolize iz citoplazme i stanične membrane krvnih stanica oslobađaju proteaze, fosfolipidi, tkivni faktor i ADP (adenozin difosfat) koji mogu potaknuti aktivaciju koagulacije i trombocita te time lažno skratiti vrijeme zgrušavanja krvi zbog potaknutog nastanka ugruška (PV i APTV su lažno skraćeni) ili je moguće lažno produljenje zgrušavanja krvi zbog potrošnje koagulacijskih faktora. Nadalje, uslijed nepravilnog uzorkovanja može doći do oštećenja krvnih žila pri čemu se oslobađa tromboplastin i izlaže površina subendotela krvnih žila što potiče koagulacijsku kaskadu te je time uzorak kompromitiran. Biološka interferencija utječe i na optičke i mehaničke metode te se stoga ne može izbjeći promjenom metodologije (Lippi i sur., 2013).

Lipemija prvenstveno interferira u optičkim metodama, na način koji je prethodno opisan u poglavlju Lipemija. Analizatori koji koriste mehaničku ili elektromehaničku detekciju manje su podložni interferenciji lipemije, iako lipidne čestice mogu direktno interferirati s procesom hemostaze pa se interferencija ne može potpuno zanemariti već treba biti oprezan (Lippi i sur., 2013). Naprimjer, teška lipemija uzrokuje potiskivanje plazme zbog čega dolazi do produljenog vremena zgrušavanja koagulacijskih pretraga i kod mehaničkih i

elektromehaničkih metoda (Bronić i sur., 2019). Također, hilomikroni lažno smanjuju agregaciju trombocita.

Ikterija u koagulacijskim metodama interferira sprekratno kao što je opisano prethodno u poglavlju Ikterija. Optička inteferencija može se spriječiti mjerenjem na alternativnim valnim duljinama, no u slučajevima kada je uzorak ikteričan analizu je preporučeno napraviti mehaničkom/elektromehaničkom detekcijom kojoj ikterija ne smeta (Bronić i sur., 2019).

1.5. Vizualna i automatska detekcija hemolize, lipemije i ikterije

Dugi niz godina hemoliza, lipemija i ikterija detektirale su se vizualno te se na taj način i danas detektiraju u nekim laboratorijima. Vizualni pregled je dugotrajan, subjektivan i nestandardiziran zbog čega može biti izvor pogrešaka. Radi toga, te zbog potrebe za standardizacijom i povećanja opsega posla unazad nekoliko godina, javila se potreba za automatiziranom provjerom ovih interferencija (Nougieri sur., 2017). Pokazano je da su automatski HIL indeksi točniji i precizniji od vizualne detekcije (Simundic i sur., 2009) te je podudarnost između vizualne i automatske detekcije loša. Tehničke i kliničke prednosti automatskih HIL indeksa su neupitne jer pružaju standardiziranu procjenu kvalitete uzoraka te je rezultate procjene HIL indeksa moguće inkorporirati u algoritme automatske validacije što ubrzava rutinski rad i sprečava sporove oko neizdavanja rezultata s kliničarima (Lippi i Cadamuro, 2018). Uz to automatska detekcija je jeftina i smanjuje nastanak predanalitičkih pogrešaka. S obzirom na sve prednosti automatskih HIL indeksa, CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) u svojim CLSI C56A smjernicama preporučio je implementaciju automatskih HIL indeksa u rutinsku analizu (Nikolac i sur., 2018). Prema nedavnoj anketi EFLM-a 43% laboratorija u Europi koristi isključivo automatske HIL indekse, dok ostali još uvijek koriste vizualnu detekciju samostalno ili u kombinaciji s automatskom. Uz to, samo 28% onih koji koriste automatske HIL indekse provodi njihovu svakodnevnu unutarnju kontrolu kvalitete (Cadamuro i sur., 2019). Iako su danas automatizirani HIL indeksi sveprisutni u laboratorijskoj dijagnostici, relativno su nova pojava na koagulacijskim analizatorima (Hedeland i sur., 2020) te se u koagulaciji koriste i prate puno manje u odnosu na kliničku biokemiju (Cadamuro i sur., 2019).

1.6. Princip automatske detekcije na analizatorima

HIL indeksi na analizatorima obično su generirani spektrofotometrijskom procjenom te su stoga podložni interferencijama kao i bilo koje druge spektrofotometrijske metode. Obično se

u sklopu procjene HIL indeksa provode spektrofotometrijska mjerenja na više različitih valnih duljina, a što ovisi o samom analizatoru. Kao i ostale metode koje se koriste u laboratorijskoj dijagnostici, određivanje HIL indeksa treba zadovoljiti zahtjeve regulatornih i akreditacijskih tijela. Potrebno je provoditi kontrolu kvalitete, što trenutačno može predstavljati problem jer su se tek počele pojavljivati komercijalne kontrole te je pokazano da im je stabilnost upitna. Istraživanjima je pokazano se da su *in house* kontrolni uzorci pripremljeni iz *pool*-a plazme odgovarajući za provedbu kontrole kvalitete i da čak imaju bolje karakteristike od komercijalnih kontrola (Lippi i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Hemoliza, lipemija i ikterija česte su interferencije koje ometaju provođenje laboratorijskih postupaka tako da mogu uzrokovati dobivanje lažnih rezultata što u konačnici može dovesti do nepravilne interpretacije nalaza te nepoželjnih ishoda za pacijenta. Neizbježno je pravovremeno prepoznati uzorke s ovim interferencijama kako bi izdali provjeren i pouzdan rezultat određene pretrage. Dugi niz godina prisutnost ovih interferencija provjeravala se vizualno, no to se pokazalo kao nepouzdana, subjektivna i nereproducibilna metoda što je rezultiralo pojavom automatske procjene HIL indeksa na analizatorima. HIL indeksi danas su neizbježni kako bi se zadovoljili standardi dobre laboratorijske prakse. Prema normi ISO 15189 nužno ih je implementirati u svakodnevni rad. Njihovim korištenjem smanjuje se učestalost predanalitičkih pogrešaka, vrijeme analize i izdavanja rezultata, izbjegava se nepotrebno ponavljajuće uzorkovanje i ubrzava se vrijeme do prave dijagnoze.

Iako automatski HIL indeksi na analizatorima postoje preko 10 godina, ne postoji harmonizacija u načinu mjerenja i prikazivanju rezultata HIL indeksa među proizvođačima. Također nije uvijek specifično definiran kriterij prihvatljivosti za odlučivanje na kojoj razini hemoliza, lipemija i ikterija značajno interferiraju za pojedinu metodu i pretragu, već proizvođači generalno uzimaju kriterij od 10%. Iz tog razloga potrebno je da svaki laboratorij verificira HIL indekse, utvrdi kriterije prihvatljivosti i provodi kontrolu kvalitete HIL indeksa kako bi osigurao točnost rezultata njihovog određivanja (Farrell i Carter, 2016).

Automatski HIL indeksi na koagulacijskim analizatorima pojavili su se tek u skorije vrijeme, nema puno verifikacijskih studija, a rezultati postojećih često su kontradiktorni. U praksi se koriste daleko rjeđe ili gotovo nikad u odnosu na biokemijske analizatore, iako su jednako nužni za pravilnu interpretaciju i brže izdavanje rezultata koagulacijskih pretraga. Iz tog razloga je potrebno provjeriti njihovu pouzdanost i raditi na implementaciji u rutinski rad.

Cilj ovog rada je procijeniti pouzdanost određivanja HIL indeksa na automatiziranim koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U ovom radu korišten je *pool* plazme dobiven iz uzoraka zaprimljenih u sklopu rutinske laboratorijske analize. Primarni uzorci dobiveni su vađenjem pune venske krvi u epruvete s 3,2% Na-citratom (0.105-0.109 M) kao antikoagulansom, nakon čega su odmah centrifugirani 15 minuta na 4000 okr/min. U uzorcima je nakon centrifugiranja vidljiva od stanica odvojena plazma koja je korištena za izradu *pool*-a plazme.

Za pripremu uzoraka korišten je *pool* plazme bez vidljivih interferencija hemolize, lipemije i ikterije zato što je za ovakvo ispitivanje važno da korišteni uzroci nemaju istovremeno hemolizu, lipemiju i ikteriju, već samo jednu od tih interferencija. Svaka od tih interferencija može utjecati na određivanje drugih dviju pa možemo dobiti netočne rezultate mjerenja.

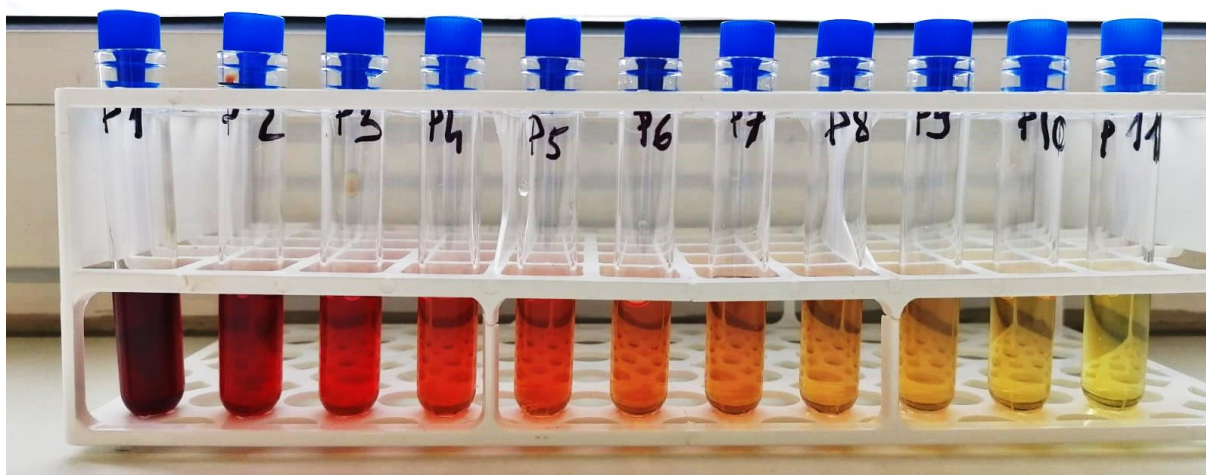
Za izradu hemolizata korištena je puna venska krv uzeta u epruvete s Li-heparinom, iz uzoraka zaprimljenih u sklopu rutinske laboratorijske analize. Uzorci nisu bili lipemični ni ikterični.

Svi uzorci su uzorkovani u Kliničkom bolničkom centru Zagreb i obrađeni u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku. Nakon rutinske obrade, u ovom radu korišteni su kao ostatni uzorci.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Hemoliza

Uzorci s različitim stupnjem hemolize pripremljeni su prema sljedećem postupku: Pripremljeno je devet radnih otopina hemolizata s različitim koncentracijama hemoglobina, 60 g/L, 30 g/L, 15 g/L, 12 g/L, 7,5 g/L, 6 g/L, 3,75 g/L, 3 g/L, 1,5 g/L, te je po 200 µL svake radne otopine hemolizata dodano u 1800 µL *pool*-a plazme kako bi dobili konačne hemolizirane uzorke koji su slični stvarnim uzorcima pacijenata. Kao uzorak koji ima stupanj hemolize 0 korišten je netaknuti *pool* plazme u kojem je koncentracija hemoglobina manja od 0,3 g/L.



Slika 2: Uzorci s različitim stupnjevima hemolize, stupanj obojenja proporcionalan je koncentraciji hemoglobina u g/L.

Hemolizat je napravljen modificiranom metodom osmotskog šoka prema Dimenskom (2008) sljedećim postupkom: Puna venska krv (bez lipemije i ikterije) uzeta u epruvete s Li-heparinom centrifugira se, nakon čega se sloj plazme odbacuje i dodaje jednak volumen fiziološke otopine (9% NaCl). Pri odvajanju sloja plazme u epruveti treba ostaviti *buffy coat*. Stanice se miješanjem resuspendiraju u fiziološkoj otopini te se ponavlja centrifugiranje. Postupak resuspendiranja stanica u fiziološkoj otopini ponavljan je 4 puta. Pri zadnjem ispiranju stanice se resuspendiraju u destiliranoj vodi nakon čega se uzorak pohranjuje na -20°C tijekom noći. Uzorak se otopi, dobro promiješa i centrifugira kako bi se uklonila stroma. Tako dobiveni hemolizat prebaci se u čistu epruvetu te se izmjeri koncentracija hemoglobina u hemolizatu. Koncentracija hemoglobina u hemolizatu izmjerena je na hematološkom brojaču i iznosila je 120 g/L. Iz ovog početnog hemolizata pripremljene su ostale radne otopine hemolizata.

Točna koncentracija hemoglobina u pripravljenim hemoliziranim uzorcima određena je spektrofotometrijskom metodom prema Harboe-u na tri valne duljine (380, 415 i 450 nm) te je korištena kao referenca s kojom se uspoređuju indeksi hemolize na analizatorima Cobas c501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360. Spektrofotometrijskom metodom prema Harboe-u određuje se apsorbancija slobodnog hemoglobina u plazmi. Slobodni hemoglobin u plazmi oksidira se natrijevim karbonatom u oksihemoglobin. Apsorbancija stvorenog oksihemoglobina mjeri se na 415 nm, a nespecifične apsorbancije na 380 i 450 nm. Radna otopina Na_2CO_3 (0,1 g/L) korištena u ovoj metodi dobiva se dodatkom 100 μL matične otopine Na_2CO_3 (10 g/L) u odmjernu tikvicu od 10 mL

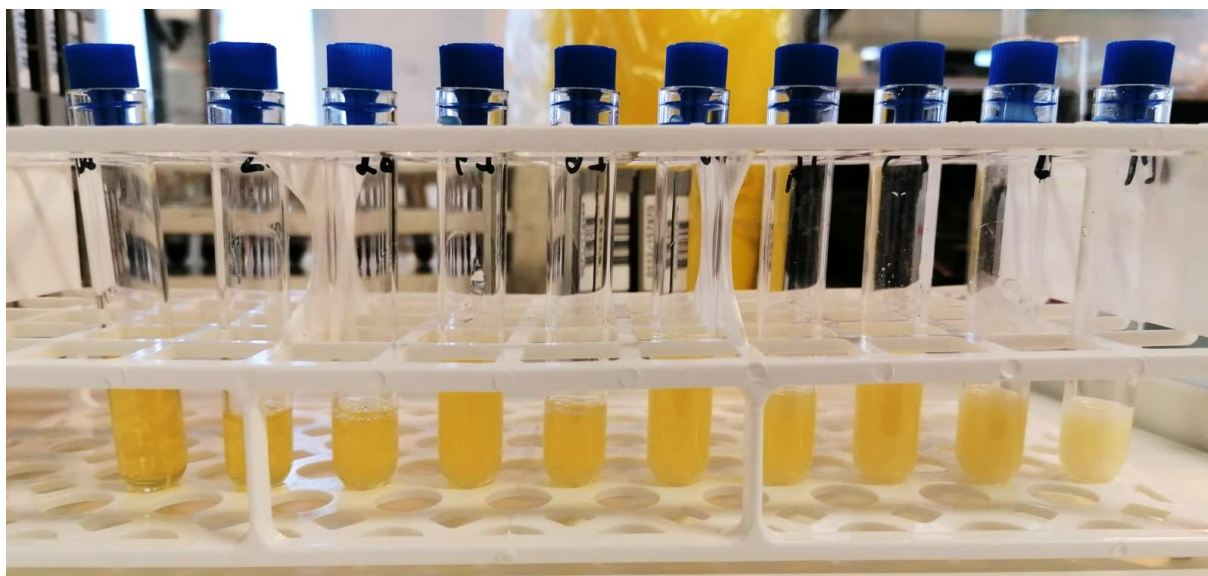
koja se zatim nadopunjuje redestiliranom vodom do oznake. U 200 μ L Li- heparinizirane plazme treba dodati 2 mL radne otopine Na_2CO_3 , promiješati, preliti u kivetu i izmjeriti apsorbancije na tri valne duljine. Rezultat se izračunava prema formuli:

$$\text{Slobodni hemoglobin (mg/L)} = 836 \times ((2 \times A_{415}) - A_{380} - A_{450})$$

Uzorke s apsorbancijom $> 2,5$ treba razrijediti fiziološkom otopinom. Svaki oblik lipemije i ikterija (bilirubin $> 80 \mu\text{mol/L}$) utječu na ishod rezultata. U ovom radu za izvedbu ove metode korišten je spektrofotometar Camspec M-508 (Spectronic Camspec Ltd, Leeds, Ujedinjeno Kraljevstvo).

3.2.2. Lipemija

Uzorci s različitim stupnjem lipemije pripremljeni su prema sljedećem postupku: Matična otopina emulzije lipida za infuzijske otopine SMOFlipid 200 mg/ml, razrijeđena je deset puta čime je dobivena radna otopina s koncentracijom triglicerida 58,7 mmol/L. Miješanjem te radne otopine s pool-om plazme u odgovarajućim omjerima dobiveni su lipemični uzorci s koncentracijama triglicerida 28,71 mmol/L, 15,11 mmol/L, 11,93 mmol/L, 7,66 mmol/L, 6,13 mmol/L, 4,47 mmol/L, 3,66 mmol/L, 2,83 mmol/L, 1,96 mmol/L, 1,51 mmol/L, 1,08 mmol/L. Točna koncentracija triglicerida u uzorcima određena je na biokemijskom analizatoru Cobas c501 fotometrijskom metodom s glicerolfosfat-oksidadom (GPO-PAP) te je korištena kao referenca s kojom se uspoređuju indeksi lipemije na analizatorima Cobas c501, Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360.



Slika 3: Uzorci s različitim stupnjevima lipemije.

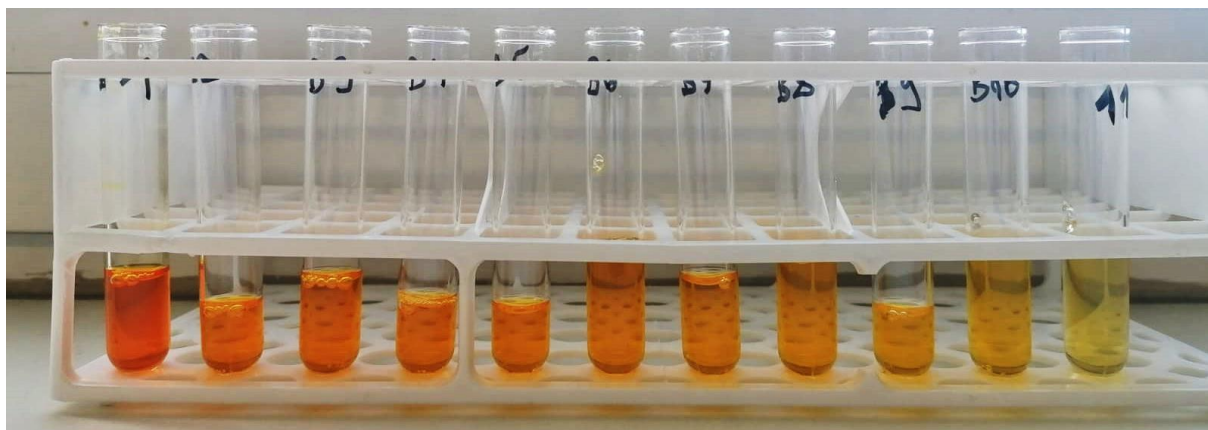
3.2.2.1 Načelo fotometrijske metode s glicerolfosfat-oksidadom (GPO-PAP)

Lipaza iz mikroorganizama hidrolizira trigliceride pri čemu nastaje glicerol koji se zatim uz ATP, djelovanjem glicerolkinaze, prevodi u glicerol-fosfat. Katalitičkim djelovanjem glicerolfosfatoksidaze iz glicerol-fosfata nastaju dihidroksiaceton-fosfat i H_2O_2 . U indikatorskoj reakciji H_2O_2 reagira s p-klorofenolom i 4-aminofenazonom uz peroksidazu pri čemu nastaje obojeni 4-(p-benzokinon-monoimino)-fenazon. Intenzitet obojenja direktno je proporcionalan koncentraciji triglicerida i mjeri se fotometrijski (Siedel i sur.,1993).

3.2.3. Ikterija

Uzorci s različitim stupnjem ikterije pripremljeni su prema sljedećem postupku: Matična otopina bilirubina pripremljena je otapanjem 58,9 mg SIGMA-ALDRICH bilirubina u prahu. Izvagano je 58,9 mg bilirubina koji je prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL. U odmjernu tikvicu dodano je 6 mL 0,1 M otopine Na_2CO_3 , 4,5 mL 0,1 M otopine NaOH i 4 mL *pool*-a plazme. Ostatak odmjerne tikvice napunjen je fiziološkom otopinom do oznake te je sve dobro promiješano. Koncentracija bilirubina u tako pripremljenoj matičnoj otopini izmjerena je na biokemijskom analizatoru Cobas c501 te iznosi 844 $\mu\text{mol/L}$.

Miješanjem matične otopine bilirubina koncentracije 844 $\mu\text{mol/L}$ s *pool*-om plazme u odgovarajućim omjerima dobiveni su ikterični uzorci s koncentracijama bilirubina 609,0 $\mu\text{mol/L}$, 408,9 $\mu\text{mol/L}$, 301,8 $\mu\text{mol/L}$, 204,4 $\mu\text{mol/L}$, 152,2 $\mu\text{mol/L}$, 102,5 $\mu\text{mol/L}$, 75,7 $\mu\text{mol/L}$, 56,6 $\mu\text{mol/L}$, 40,4 $\mu\text{mol/L}$, 21,1 $\mu\text{mol/L}$, 4,5 $\mu\text{mol/L}$. Točna koncentracija bilirubina u uzorcima određena je na biokemijskom analizatoru Cobas c501 kolorimetrijskom metodom s diazoreagensom te je korištena kao referenca s kojom se uspoređuju indeksi ikterije na analizatorima Cobas c501, Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360.



Slika 4: Uzorci s različitim stupnjem ikterije.

3.2.3.1 Kolorimetrijska metoda s diazoreagensom

Ukupni bilirubin u jako kiselom mediju reagira s 3,5-diklorfenil diazonijem pri čemu nastaje azobilirubin crvene boje. Intenzitet obojenja direktno je proporcionalan koncentraciji ukupnog bilirubina i mjeri se fotometrijski.

3.2.4. Metoda određivanja HIL indeksa na analizatoru Cobas c501

Analizatori Cobas c501 mjere HIL indekse tzv. Serum Index Gen 2 testom (SI2 test). Taj test se ne smije koristiti za kvantitativno određivanje triglicerida, hemoglobina i bilirubina već samo za određivanje HIL indeksa. Serum Index Gen 2 test baziran je na izračunavanju kvantitativnih indeksa hemolize, lipemije i ikterije iz izmjerenih apsorbancija u razrijeđenim uzorcima seruma ili plazme, pri različitim parovima bikromatskih valnih duljina. Izračuni pružaju kvantitativni prikaz razina hemolize, lipemije i ikterije u uzorcima pacijenata. Alikvot uzorka razrjeđuje se s fiziološkom otopinom (9% NaCl) te se zatim mjeri apsorbancija na tri para valnih duljina: 660 nm i 700 nm za lipemiju, 570 nm i 600 nm za hemolizu te 480 nm i 505 nm za ikteriju. Iz tako izmjerenih apsorbancija instrument automatski izračunava HIL indekse preko određenih faktora. Prikazane vrijednosti serumskih indeksa nemaju mjernu jedinicu, osim H indeksa koji je izražen u mg/dL, ali ta mjerna jedinica nije prikazana uz izdan rezultat na analizatoru. Mjerni raspon, baziran na faktorima skaliranja za konvencionalne jedinice, za L indeks je 10-2000, za H indeks 5-1200 i za I indeks 0.5-60. H indeks je u provjereno visokom stupnju korelacije s koncentracijom hemoglobina u g/L u uzorcima pacijenata. L indeks temelji se na optičkom ponašanju emulzijske otopine lipida Intralipid te daje procjenu zamućenosti uzorka, a ne koncentracije triglicerida, zato što je mjera rasipanja svjetlosti koja je ovisna o veličini čestica. I indeks je u korelaciji s koncentracijom ukupnog bilirubina u $\mu\text{mol/L}$ u uzorcima pacijenata (Roche Diagnostics, 2014).

3.2.5. Metoda određivanja HIL indeksa na analizatoru Sysmex CS-5100

HIL indeksi na analizatoru Sysmex CS-5100 određuju se kvalitativno. Automatski sustav detekcije HIL-a na Sysmex-u CS-5100 provjerava interferencije u svakom uzorku na valnim duljinama od 405 nm za ikteriju, 575 nm za hemolizu i 660 nm za lipemiju (Mukaide 2013). Provjera HIL-a vrši se na netretiranom i nerazrijeđenom alikvotu uzoraka koji su obrađeni u normalnom načinu rada. Nije potreban dodatan volumen uzoraka i nema utjecaja na proces testiranja uzoraka. Prema podacima proizvođača detekcijski limiti za H indeks je

koncentracija hemoglobina 0,4 g/L, za I indeks koncentracija ukupnog bilirubina 17 $\mu\text{mol/L}$ i za L indeks zamućenje uzorka koje odgovara 600 FTU (*engl. formazine turbidity unit*, 1 FTU odgovara zamućenju uzorka kod koncentracije formazina 1 g/L). Na ekranu se pojavljuje zastavica uz rezultat analize kada je u uzorku vrijednost nekog od indeksa iznad postavljene granice. Svaki laboratoriji mora za svaku pretragu ispitati koje razine interferencija smetaju u izdavanju točnog rezultata te se prema tome postavljaju granice indeksa kod kojih analizator javlja zastavicu kao upozorenje (Di Fabio, 2013).

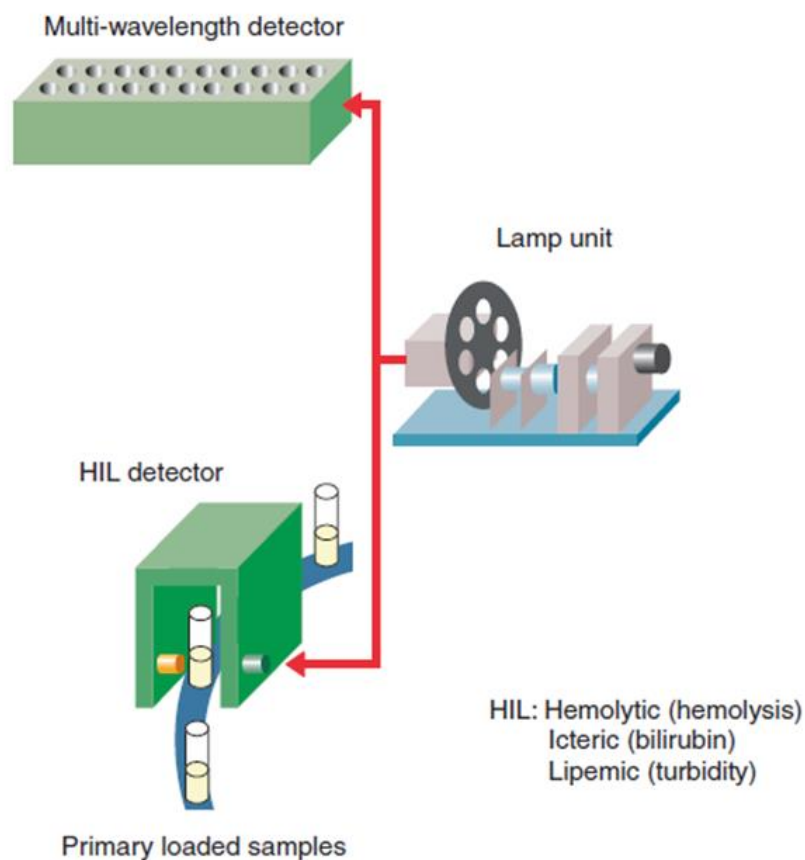


Fig. 10 HIL detector

Slika 5. Detektor hemolize, lipemije i ikterije na analizatoru Sysmex CS-5100.

3.2.6. Metoda određivanja HIL indeksa na analizatoru Attelica COAG

360

Na Attelici COAG 360 kvaliteta plazme procjenjuje se kvantifikacijom HIL indeksa u četiri-kanalnom fotometru, istodobno na valnim duljinama od 365 do 645 nm. Prvo se izvodi

mjerenje slijepe probe pročišćenom vodom, a zatim se mjerenja izvode u triplikatu za svaki indeks. Ukupan volumen potreban za određivanje HIL indeksa je 50 μL , a mjerenje se izvodi samo 16 sekundi.

4. REZULTATI

4.1. Određivanje indeksa hemolize

HIL indeksi u svim uzorcima mjereni su na biokemijskom analizatoru Cobas c501 i na koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360. Dodatno, u hemolitičnim uzorcima određena je koncentracija slobodnog hemoglobina spektrofotometrijskom metodom prema Harboe-u.

Tablica 1: Rezultati određivanja indeksa hemolize.

Spektrofotometrijska metoda/(g/L)	Cobas c501/(mg/dL)	Sysmex CS-5100	Atellica COAG 360
11,70	1133	-	-
5,43	534	5	-
2,77	268	4	9
1,34	131	2	6
1,09	107	1	5
0,67	64	1	4
0,56	52	0	3
0,33	32	1	2
0,25	27	0	2
0,12	13	0	2
0	0	0	1

U Tablici 1. prikazani su rezultati usporedbe indeksa hemolize na koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360 s indeksima hemolize na biokemijskom analizatoru Cobas c501, te sa stvarnom koncentracijom slobodnog hemoglobina u uzorku koja je određena spektrofotometrijskom metodom prema Harboeu.

Indeksi hemolize izmjereni na analizatoru Cobas c501 u rezultatima su prikazani kvantitativno, izračunati su iz apsorbancija i o razrjeđenju ovisnih i mjernim jedinicama ovisnih faktora. U izračun su uključeni i korekcijski faktori koji korigiraju spektre interferencija koji se preklapaju (Roche Diagnostics, 2014). U poglavlju Materijali i metode je

detaljno opisano načelo mjerenja HIL indeksa na analizatoru Cobas c501. Indeksi hemolize dobiveni na analizatoru Cobas c501 izrazito dobro odgovaraju koncentracijama slobodnog hemoglobina u uzorku, odnosno u potpunoj su korelaciji što je već ranije potvrđeno.

Indeksi hemolize izmjereni na analizatoru Sysmex CS-5100 izraženi su kvalitativno pomoću skale u rangu od 1 do 5 pri čemu 1 odgovara najnižem, a 5 najvišem stupnju hemolize. Prema proizvođaču kod koncentracije slobodnog hemoglobina do 0,48 g/L analizator ne prepoznaje hemolizu, koncentracije slobodnog hemoglobina od 0,48 g/L do 0,97 g/L odgovaraju indeksu hemolize 1, koncentracije slobodnog hemoglobina od 0,97 g/L do 1,45 g/L odgovaraju indeksu hemolize 2, koncentracije slobodnog hemoglobina od 1,45 g/L do 1,94 g/L odgovaraju indeksu hemolize 3, koncentracije slobodnog hemoglobina od 1,94 g/L do 2,9 g/L odgovaraju indeksu hemolize 4 i koncentracije slobodnog hemoglobina iznad 2,9 g/L odgovaraju indeksu hemolize 5. Iz naših rezultata je vidljivo da oznaka 1 otprilike odgovara vrijednostima od 0,33 g/L do 1,09 g/L, 2 odgovara vrijednosti oko 1,34 g/L, za 3 nema uzorka s pripadajućom vrijednosti, 4 odgovara vrijednosti oko 2,77 g/L, a 5 oko 5,43 g/L slobodnog hemoglobina u uzorku. Kod izrazite hemolize kada je koncentracija slobodnog hemoglobina u uzorku veća od 11 g/L prema dobivenim rezultatima, a inače moguće i manje, Sysmex CS-5100 ne izdaje indeks hemolize.

Indeksi hemolize izmjereni na analizatoru Atellica COAG 360 System izraženi su kvalitativno pomoću skale u rangu od 1 do 9. Indeks 9 odgovara vrijednosti slobodnog hemoglobina oko 2,77 g/L, dok kod vrijednosti od 5,43 g/L, a moguće i manje, Atellica COAG 360 System ne izdaje indekse jer je hemoliza prevelika.

Vrijednosti indeksa od 0 do 1 te 2 do 4 na analizatoru Sysmex CS-5100 otprilike odgovaraju vrijednostima od 1 do 5, odnosno 6 do 9 na analizatoru Atellica COAG 360. Kod Atellica COAG 360 System analizatora je koncentracija slobodnog hemoglobina, kod koje se indeksi više ne izdaju zbog prevelike hemolize, upola manja nego kod Sysmex CS-5100 analizatora. Na analizatoru Sysmex CS-5100 indeks 0 znači da nema hemolize, a na analizatoru Atellica COAG 360 je to indeks 1. Na Atellica COAG 360 analizatoru hemoliza je prepoznata i označena već kod koncentracije slobodnog hemoglobina od 0,12 g/L što nije vidljivo golim okom, dok kod Sysmex CS-5100 kod 0,33 g/L kada hemoliza postaje vidljiva golom oku.

Kvalitativni indeksi hemolize na analizatoru Atellica COAG 360 bolje koreliraju sa kvantitativnim indeksima hemolize na Cobas c501 od kvalitativnih indeksa hemolize na

analizatoru Sysmex CS-5100, no korelacija indeksa između Cobasa c501 i Sysmex-a CS-5100 je također dobra.

4.2. Određivanje indeksa lipemije

Tablica 2: Rezultati određivanja indeksa lipemije.

c(TG)/(mmol/L)	Cobas c501	Sysmex CS-5100	Atellica COAG 360 System
28,71	915	-	9
15,11	452	-	6
11,93	348	5	5
7,66	234	4	3
6,13	121	3	3
4,47	94	2	2
3,66	64	2	2
2,83	61	1	1
1,96	36	0	1
1,51	22	0	1
1,08	8	0	1

U Tablici 2. prikazani su rezultati usporedbe indeksa lipemije na koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360 s indeksima lipemije na biokemijskom analizatoru Cobas c501, te s točnom koncentracijom triglicerida u uzorku koja je određena na analizatoru Cobas c501.

Indeksi lipemije izmjereni na analizatoru Cobas c501 u rezultatima su prikazani kvantitativno, dobivaju se računom iz apsorbancija te o razrjeđenju i mjernim jedinicama ovisnih faktora. U izračun su uključeni i korekcijski faktori koji korigiraju spektre interferencija koji se preklapaju. Indeksi lipemije su u linearnom odnosu s točnom koncentracijom triglicerida u uzorku. Na analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360 indeksi lipemije se određuju kvalitativno te su na Sysmex CS-5100 izraženi pomoću skale od 0 do 5, a na Atellica COAG 360 pomoću skale od 1 do 9.

Sysmex CS-5100 je lipemiju prepoznao kod koncentracije triglicerida 2,83 mmol/L kod koje lipemija još nije posve jasno vidljiva golim okom, dok je Atellica COAG 360 System lipemiju prepoznao kod koncentracije triglicerida 3,66 mmol/L kada je lipemija već vidljiva

golim okom. Na analizatoru Sysmex CS-5100 najviši indeks lipemije 5 odgovara koncentraciji triglicerida od oko 12 mmol/L što je otprilike upola manje nego koncentracija triglicerida kojoj odgovara najviši indeks lipemije 9 na analizatoru Atellica COAG 360. Analizator Sysmex CS-5100 ne izdaje indekse lipemije kod izrazito visoke lipemije. Prema rezultatima je to kod koncentracije triglicerida preko otprilike 12 mmol/L. Za razliku od indeksa hemolize, indeksi lipemije skalom se više podudaraju između analizatora Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360, u smislu da vrijednosti duž cijele skale od 0 do 5 na Sysmex-u CS-5100 odgovaraju vrijednostima od 1 do 5 na Atellica COAG 360.

Kvalitativni indeksi lipemije i na analizatoru Sysmex CS-5100 i analizatoru Atellica COAG 360 jako dobro koreliraju sa kvantitativnim indeksima lipemije na analizatoru Cobas c501, odnosno rastu ravnomjerno u skladu s njima.

4.3. Određivanje indeksa ikterije

Tablica 3: Rezultati određivanja indeksa ikterije.

c(BIL)/(μmol/L)	Cobas c501	Sysmex CS-5100	Atellica COAG 360 System
609,0	35	-	9
408,9	29	-	9
301,8	22	-	8
204,4	15	-	6
152,2	11	-	5
102,5	7	3	4
75,7	6	2	3
56,6	4	1	3
40,4	3	1	2
21,1	2	0	2
4,5	1	0	1

U Tablici 3. prikazani su rezultati usporedbe indeksa ikterije na koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360 s indeksima ikterije na biokemijskom analizatoru Cobas c501, te s točnom koncentracijom ukupnog bilirubina u uzorku određenom na analizatoru Cobas c501.

Indeksi ikterije izmjereni na analizatoru Cobas c501 u rezultatima su prikazani kvantitativno, dobivaju se računom na isti način kao indeksi hemolize i lipemije te su u dobroj korelaciji s točnom koncentracijom ukupnog bilirubina u uzorku što je već ranije pokazano. Na analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360 indeksi ikterije izdaju se kvalitativno. Na Sysmex-u CS-5100 indeksi ikterije su izraženi pomoću skale od 0 do 3 što se razlikuje od skale za indekse hemolize i lipemije, a na analizatoru Atellica COAG 360 pomoću skale od 1 do 9.

Analizator Sysmex CS-5100 ikteriju prepoznaje kod koncentracije ukupnog bilirubina oko 40 $\mu\text{mol/L}$ kada je ona već vidljiva golim okom, a Atellica COAG 360 ikteriju prepoznaje već kod upola manje koncentracije ukupnog bilirubina oko 21 $\mu\text{mol/L}$ kada ikterija nije vidljiva golim okom i kada vrijednost ukupnog bilirubina u uzorku prelazi gornju granicu referentnog intervala za odrasle (20 $\mu\text{mol/L}$). Na analizatoru Sysmex CS-5100 najviši indeks ikterije je 3 i odgovara koncentraciji ukupnog bilirubina od oko 100 $\mu\text{mol/L}$ te iznad ove vrijednosti analizator ne izdaje indekse ikterije. Koncentracija ukupnog bilirubina kojoj odgovara najviši indeks ikterije 9 na analizatoru Atellica COAG 360 System iznosi oko 400 $\mu\text{mol/L}$ što je 4 puta više nego na Sysmex-u CS-5100, te analizator za sve vrijednosti iznad te koncentracije ukupnog bilirubina također izdaje vrijednost 9. Za razliku od indeksa hemolize i lipemije, vrijednosti na skalama za indekse ikterije na analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica COAG 360 uopće se ne podudaraju.

Indeksi ikterije na Sysmex-u CS-5100 relativno dobro koreliraju s indeksima na Cobas-u c501, no indeksi ikterije na analizatoru Atellica COAG 360 su u boljoj korelaciji s Cobas-om c501, a time i s ukupnom koncentracijom bilirubina u uzorku.

5. RASPRAVA

Određivanje HIL indeksa danas je neizbježno u rutinskoj analizi kako bi se osigurala najveća kvaliteta i pouzdanost dobivenih rezultata. Zbog nepotpunih i upitnih navoda u uputama proizvođača, metode kojima se određuju HIL indeksi je potrebno verificirati kao i svaku drugu metodu koja se koristi u medicinsko-biokemijskom laboratoriju. Iz tog razloga, kako bi provjerili određivanje kvalitativnih HIL indeksa na koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica 360 COAG, napravljen je ovaj rad u kojem se oni uspoređuju sa kvantitativnim indeksima na biokemijskom analizatoru Cobas c501 i s točnim koncentracijama pojedinog interferenta u uzorku. Za usporedbu je korišten biokemijski analizator Cobas c501 zato što su na njemu HIL indeksi kvantitativni, verificirani i u odličnoj korelaciji s koncentracijama pojedinih interferenata u uzorku što je u ovom radu također potvrđeno. Zanimljiva je činjenica da u uputama proizvođača za SI2 test na Cobas-u c501 stoji da L indeks slabo korelira s trigliceridima, a u ovom radu je pokazano drukčije. To može objasniti činjenica koju su pokazali Twomey i sur. (2003), a to je da kod umjetno stvorenih lipemičnih uzoraka L indeks korelira s koncentracijom triglicerida u uzorku, dok kod uzoraka pacijenata to nije slučaj.

Hemolizirani, lipemični i ikterični uzorci pripremljeni su s *pool*-om plazme kako bi bili komutabilni, odnosno što više sličili stvarnom uzorku pacijenata. Korištenjem vodenih otopina hemoglobina, triglicerida i bilirubina dobili bismo drugačije i manje vjerodostojne rezultate. Za pripremljanje hemolizata korištena je modificirana metoda osmotskog šoka prema Dimeskom (2008) koja uključuje smrzavanje i otapanje zato što na taj način dolazi do lize ne samo eritrocita, nego i leukocita i trombocita što je prava odlika hemolize. Uz to, ovu metodu je lakše provesti i ima bolju reproducibilnost u odnosu na npr. prošpricavanje, iako je u teoriji prošpricavanje bolja tehnika jer na taj način najčešće nastaje *in vitro* hemoliza u stvarnim uvjetima vađenja krvi. Najbolje bi bilo koristiti stvarne hemolizirane uzorke pacijenata jer bi takvi uzorci bili najreprezentativniji, no skupljanje takvih uzoraka trajalo bi jako dugo te bi bilo teško obuhvatiti sve koncentracijske razine koje su potrebne za studiju (Hedeland i sur., 2020). Za pripremljanje lipemičnih uzoraka korištena je emulzijska otopina za infuzije SMOFlipid, zato što je česti uzrok nastanka lipemičnih uzoraka vađenje krvi prerano nakon davanja infuzije u kojoj se nalazi ova otopina, a uz to je i lako dostupna. Za pripremljanje ikteričnih uzoraka korišten je ukupni bilirubin zato što direktni i indirektni bilirubin mogu različito utjecati na metode, a ikteriju mogu uzrokovati oba oblika (Farrell i Carter, 2016).

Princip koagulacijskih testova na analizatoru Sysmex CS-5100 je korištenje viševalne fotometrije na valnim duljinama 340, 405, 575, 660 i 800 nm za koagulometriju (detekcija ugruška, određivanje PV-a, APTV-a i fibrinogena), metode s kromogenim supstratima (određivanje antitrombina), imunoturbidimetriju (određivanje D-dimera) i agregacijske metode (Geens i sur., 2015.). Uz osnovne koagulacijske pretrage, na ovom analizatoru mogu se određivati razni drugi parametri kao što su zasebni koagulacijski faktori, von Willebrandov faktor, antitrombin III, protein C i drugo. S obzirom da Sysmex CS-5100 koristi optičke i agregacijske metode koje su podložne interferencijama hemolize, lipemije i ikterije, treba imati dobar sustav prepoznavanja ovih interferencija. U radu Hedelanda i sur. (2019) sažeto je da su različite studije pokazale različite rezultate utjecaja hemolize, lipemije i ikterije na koagulacijske pretrage ovisno o reagensu i analizatoru te da je generalno za analizatore koji koriste optičke metode kao Sysmex CS-5100 u tri studije pokazano da hemoliza utječe na rezultate APTV-a. Ovakvi kontradiktorni rezultati studija dodatna su potvrda potrebe za verifikacijom HIL indeksa koagulacijskim analizatorima.

Cobas c501 i Sysmex CS-5100 su biokemijski i koagulacijski analizatori različitih proizvođača (Cobas c501, Roche Diagnostics i Sysmex CS-5100, Siemens Healthcare GmbH) te je stoga razumljivo da koriste različite tehnologije određivanja HIL indeksa. Unatoč tome i razlici u izdavanju rezultata, iz rezultata je vidljivo da kvalitativne vrijednosti HIL indeksa na Sysmex-u CS-5100 rastu u skladu s porastom kvantitativnih vrijednosti HIL indeksa na Cobasu c501, odnosno u linearnom su odnosu, što je zadovoljavajuće. S obzirom na ovaj prikazani odnos kvalitativnih i kvantitativnih vrijednosti indeksa, te kvalitativnih vrijednosti indeksa i stvarnih koncentracija interferenata u uzorku iz rezultata ovog rada, trebalo bi procijeniti za koji kvalitativni HIL indeks na Sysmex-u CS-5100 analizator treba javiti alarm kod pojedine pretrage te na koji način uskladiti izdavanje rezultata pretrage sa svakim stupnjem HIL indeksa. Za tu procjenu valjalo bi, za svaki koagulacijski parametar koji se određuje na ovom analizatoru, provjeriti kod koje razine interferirajuće tvari dolazi do značajnog odstupanja rezultata, takve koncentracije pridružiti kvalitativnim vrijednostima skale na temelju naših rezultata, te zatim uvesti sustav izdavanja za svaki parametar. S obzirom da i najmanja hemoliza u koagulacijskim testovima potencijalno smeta, odlično je da je Sysmex CS-5100 detektira kao indeks 2 dok još nije vidljiva golim okom. Zanimljivo je da je kod koncentracije slobodnog hemoglobina od 0,33 g/L analizator prepoznao hemolizu i označio je indeksom 1, dok je kod veće koncentracije od 0,56 g/L nije prepoznao, a Cobas c501 i Atellica COAG 360 System u istom uzorku jesu. Također je zanimljivo da su sličan

rezultat dobili Flieder i sur. (2016) gdje je Sysmex CS-5100 indeksom hemolize 1 označio uzorke s koncentracijom slobodnog hemoglobina 0,31 g/L, 0,39 g/L i 0,43 g/L, a jedan uzorak koncentracije slobodnog hemoglobina 0,6 g/L nije bio prepoznat kao hemolitičan. Suprotno njihovim i našim rezultatima, prema proizvođaču Sysmex CS-5100 hemolizu prepoznaje tek kod koncentracije slobodnog hemoglobina 0,48 g/L. Vrijednosti koncentracija slobodnog hemoglobina za pojedini indeks hemolize prema proizvođaču uglavnom se slažu s vrijednostima koncentracija slobodnog hemoglobina za pojedini indeks hemolize koje su dobivene u ovom radu i prikazane u Tablici 1. Možemo zaključiti da kvalitativni HIL indeksi na Sysmexu CS-5100 daju dovoljnu obavijesnu vrijednost jer je prvi stupanj hemolize i lipemije detektiran kada su one još jako niske, međutim kod nešto viših koncentracija moguć je propust. Ikteriju detektira kod koncentracije 40 $\mu\text{mol/L}$ za razliku od dvostruko manje vrijednosti na Attelica 360 COAG, no to je i dalje zadovoljavajuće s obzirom da je ikterija vidljiva kod koncentracija ukupnog bilirubina 38 $\mu\text{mol/L}$ i da prema literaturi ikterija bitno utječe na rezultate koagulacijskih pretraga tek kada je ukupna koncentracija bilirubina veća od otprilike 100 $\mu\text{mol/L}$.

Attelica COAG 360 je prvi koagulacijski analizator koji kombinira pet različitih analitičkih tehnologija na jednoj platformi. To su koagulometrija (optička i optičko-mehanička), metode s kromogenim supstratima, imunokemijske metode, visoko osjetljive imunokemijske metode bazirane na tehnologiji LOCI (Luminescent oxygen channeling assay) i agregacijske metode. Na ovom analizatoru može se određivati širok spektar koagulacijskih pretraga, osnovne i mnoge specijalističke pretrage. Ove metode su podložne interferencijama hemolize, lipemije i ikterije. Prema Lippi i sur. (2019), parametar koji se određuje na ovom analizatoru, a najosjetljiviji je na hemolizu je APTV kada je korišten reagens Actin FS (indeks hemolize > 3 , konc. slob. hemoglobina $> 0,56 \text{ g/L}$), a kada su korišteni drugi reagensi APTV je bio varijabilno osjetljiv na hemolizu ovisno o reagensu. Na ikteriju su PV, APTV, D-dimeri, antitrombin bili osjetljivi varijabilno u odnosu na korišteni reagens, dok je značajno odstupanje rezultata bilo prisutno za fibrinogen, već kod indeksa ikterije 2 (uk.bilirubin 20 $\mu\text{mol/L}$). Iz literature je vidljivo da je ovo za sada jedini reagens koji je u toj mjeri osjetljiv na ikteriju, a istraživanje bi svakako trebalo potvrditi. Na drugim analizatorima kao što je Sysmex CS-5100 ovako niska interferencija možda ne bi bila prepoznata, no to je za sada prihvatljivo s obzirom na prethodnu spoznaju. Bitno je da Atellica COAG 360 prepoznaje tu interferenciju s obzirom da se ovaj reagens koristi na tom analizatoru, no proizvođači bi ubuduće trebali upozoriti na ovakve situacije. Na lipemiju je najviše bio osjetljiv PV kada je

korišten reagens Thromborel sa značajnim odstupanjem rezultata kod indeksa lipemije 3 (konc. triglicerida 6 mmol/L), a kad je korišten drugi reagens uopće mu nije smetala lipemija. APTV je na lipemiju također bio osjetljiv ovisno o reagensu, a antitrombin je imao značajno odstupanje rezultata kod indeksa lipemije 4. S obzirom na ovu varijabilnost utjecaja hemolize, lipemije i ikterije ovisno o reagensu čak i na istom analizatoru, potrebno je da svaki laboratorij zasebno odredi vrijednosti interferencija kod kojih dolazi do značajnog odstupanja rezultata za svaku pretragu, te na temelju toga odrediti kod kojih vrijednosti HIL indeksa i na koji način će se izdati rezultati pretrage.

Atellica COAG 360 kao i Sysmex CS-5100, koristi različitu tehnologiju određivanja HIL indeksa za razliku od Cobas-a c501 (Roche Diagnostics), no iz rezultata je vidljivo da kvalitativne vrijednosti HIL indeksa na Atellica COAG 360 jako dobro koreliraju sa kvantitativnim vrijednostima HIL indeksa na Cobasu c501, odnosno u linearnom su odnosu što je zadovoljavajuće. Također, Atellica COAG 360 prepoznaje hemolizu, lipemiju i ikteriju kod niskih koncentracija interferenata zbog čega se možemo dobro osloniti na HIL indekse koje izdaje. Prema Lippi i sur. (2019), jedna indeks jedinica skale za indeks hemolize na analizatoru Atellica COAG 360 otprilike je odgovarala 0,28 g/L hemoglobina za indeks hemolize, a kao što su oni naveli prema proizvođaču otprilike odgovara 0,37 g/L. Prema našim rezultatima, indeks jedinica skale bi u prosjeku odgovarala 0,31 g/L hemoglobina što odgovara onome što su dobili Lippi i sur. (2019), no taj podatak je diskutabilan. Iz tablice je vidljivo da vrijednost indeksa 1 odgovara maksimalno 0,12 g/L hemoglobina, dok vrijednost indeksa 2 sa sigurnošću odgovara većem rasponu, što bi moglo značiti da jedna indeks jedinica nema konstantnu vrijednost. Stoga, kako bi dobili točan raspon koncentracije slobodnog hemoglobina koji odgovara određenom elementu skale ovih uređaja, morali bismo pripremiti više uzoraka s manjim razlikama u koncentraciji slobodnog hemoglobina nego što je učinjeno u ovom radu. Nadalje, prema Lippi i sur. (2019), jedna indeks jedinica skale za indeks lipemije na analizatoru Atellica COAG 360 otprilike je odgovarala koncentraciji triglicerida 3,4 mmol/L, a prema proizvođaču otprilike odgovara koncentraciji triglicerida 1,4 mmol/L. Prema našim, gore navedenim rezultatima indeks jedinica skale za indekse 1 i 2 odgovarala bi oko 1,7 mmol/L što više odgovara vrijednosti proizvođača, za indeks 3 i 4 odgovarala bi oko 3,2 mmol/L što pak više odgovara vrijednostima Lippi i sur. (2019), a za indekse od 5 nadalje iz naših rezultata ne možemo procijeniti koliko ona iznosi. Prema Lippi i sur. (2019), na analizatoru Atellica COAG 360 jedna indeks jedinica skale za indeks ikterije otprilike je odgovarala koncentraciji ukupnog bilirubina 56 μ mol/L, a prema proizvođaču

otprilike odgovara koncentraciji bilirubina 74 $\mu\text{mol/L}$. Prema našim, gore navedenim rezultatima ne možemo procijeniti koliko indeks jedinica skale iznosi jer za svaku razinu indeksa imamo različiti rezultat te indeks 9 odgovara svim koncentracijama ukupnog bilirubina većima od 400 $\mu\text{mol/L}$ što je veliki raspon. Kao i za indeks hemolize ova saznanja su diskutabilna te bi trebalo pripremiti više uzoraka s međusobno manjim razlikama u koncentraciji triglicerida i ukupnog bilirubina kako bi dobili točnije i smislenije podatke.

Određivanje HIL indeksa i na Sysmex-u CS-5100 i Atellici COAG 360 je zadovoljavajuće za svakodnevnu uporabu, no Atellica COAG 360 System je u odnosu na Sysmex CS-5100 u boljoj korelaciji s koncentracijama interferenata i sa kvantitativnim HIL indeksima na Cobasu c501, te ima vrijednosti skale HIL indeksa duž čitavog raspona koncentracija interferenata što je informativnije u odnosu na skalu koju ima Sysmex CS-5100 gdje se iznad određene vrijednosti HIL indeksi ne izdaju. Zbunjujuće je za korisnika što Sysmex CS-5100 kod visokih koncentracija interferenata ne izdaje indekse, nego izdaje "-". Dakle, Atellica COAG 360 u konačnici ima puno bolju izvedbu HIL indeksa, nego Sysmex CS-5100, što je i očekivano s obzirom na napredak u tehnologiji. Za razliku od Sysmex-a CS-5100, Atellica COAG 360 HIL indekse provjerava u širem spektru valnih duljina i u triplikatu čime je osigurana veća točnost i preciznost. Unatoč toj naprednijoj tehnologiji, na Atellici COAG 360 je pokazano da utjecaj interferenata na rezultate pretraga, na istom analizatoru, ovisi o reagensu, stoga je izrazito važno provesti verifikaciju HIL indeksa i ako se promijeni reagens.

Sysmex CS-5100 i Atellica 360 COAG su analizatori istog proizvođača (Siemens Healthcare GmbH), no svejedno i među njima postoje velike razlike u mjerenju HIL indeksa koje su prethodno navedene. Opravdan razlog je napredak u tehnologiji, no svejedno je u daljnjem razvitku tehnologija za određivanje HIL indeksa potrebno uskladiti izdavanje rezultata HIL indeksa, kako među koagulacijskim analizatorima, tako i među svim ostalim grupama analizatora (biokemijski, imunokemijski, itd.). To je nužno, kako bi se osigurala jednostavnija i pouzdanija verifikacija HIL indeksa te kako bi korisnici bolje i lakše prepoznavali značajnost samih indeksa. Poziv za bolju transparentnost u uputama proizvođača i usklađenost među proizvođačima u postupku mjerenja, pristupu izvještavanja o HIL indeksima, definiranju objektivnih pragova koncentracija interferenata nakon kojih rezultati pretraga mogu značajno odstupati i upozorenje na nedostatak harmoniziranih praksi u opisu utvrđivanja graničnih vrijednosti interferenata, poslan je svim proizvođačima automatskih analizatora od strane radne grupe za predanalitičku fazu EFLM-a (von Meyer i sur., 2018). Sigurno će biti potrebno neko vrijeme da se zahtjevi tog poziva ostvare, no najbitnije je da se

to u konačnici postigne. Proizvođači bi također trebali raditi na tome da razviju dobre kontrolne materijale ili upozore na potrebu za proizvodnjom vlastitih kontrolnih materijala za HIL indekse kako bi se osigurala svakodnevna kontrola kvalitete i pouzdanost određivanja HIL indeksa.

6. ZAKLJUČAK

HIL indeksi postali su standard provođenja dobre laboratorijske prakse. Kao i kod uvođenja bilo koje nove metode, prije korištenja HIL indeksa u svakodnevnoj praksi nužno je provesti verifikaciju, te zatim u svakodnevnom radu provoditi njihovu kontrolu kvalitete. To je nužno prema važećoj europskoj normi kvalitete ISO 15189, te je u nekim državama i zahtjev nadležnih tijela.

U ovom radu provjerena je pouzdanost određivanja HIL indeksa na analizatorima Sysmex CS-5100 i Atellica 360 COAG.

Najvažniji zaključci rada su:

- rezultati određivanja HIL indeksa na Sysmex-u CS-5100 koreliraju s koncentracijom mjerenih interferenata u uzorku i sa kvantitativnim HIL indeksima na Cobasu c501
- rezultati određivanja HIL indeksa na Attelici COAG 360 koreliraju s koncentracijom mjerenih interferenata u uzorku i sa kvantitativnim HIL indeksima na Cobasu c501
- oba analizatora detektiraju prisutnost interferenata već kod vrlo niskih koncentracija
- razlika u izvještavanju HIL indeksa, odnosno u skali, je velika između Sysmex-a CS-5100 i Attelice COAG 360 iako su analizatori istog proizvođača
- HIL indeksi na Sysmex-u CS-5100 i Attelici COAG 360 pouzdani su za korištenje u rutinskom radu

Iz rezultata se može zaključiti da je na oba analizatora određivanje HIL indeksa pouzdano za svakodnevni rad, no Atellica 360 COAG System ipak koristi bolju tehnologiju i sustav izvještavanja u odnosu na Sysmex CS-5100. Za kompletnu verifikaciju HIL indeksa na ovim analizatorima bilo bi potrebno provjeriti utjecaj hemolize, lipemije i ikterije na svaku pojedinu pretragu što je detaljnije opisano u raspravi.

Priličan problem predstavlja neusklađenost proizvođača u određivanju i izvještavanju HIL indeksa te različit utjecaj interferenata na različitim analizatorima, ili njihov različit utjecaj na različite reagense za istu pretragu na istom analizatoru. Zbog toga je tumačenje rezultata verifikacije HIL indeksa puno zahtjevnije nego što bi moglo biti i može biti zbunjujuće. Korisnik u krajnjem slučaju iz ovih razloga može krivo procijeniti kod kojih razina HIL indeksa dolazi do značajnog odstupanja za pojedinu pretragu, pa zato nužno treba napraviti provjeru utjecaja svake interferencije na pojedinu pretragu s reagensom koji koristi u svakodnevnom radu.

Danas još uvijek priličan broj laboratorijskih stručnjaka ne pridaje dovoljnu važnost HIL indeksima, osobito njihovoj verifikaciji i kontroli kvalitete te je i dalje potrebno raditi na prepoznavanju HIL indeksa kao metode koja je jednako bitna kao i svaka druga koju koristimo u laboratorijskoj dijagnostici, osobito na koagulacijskim analizatorima gdje su HIL indeksi relativno nova pojava. HIL indeksi se lako mogu inkorporirati u sustav autovalidacije postavljanjem kriterija prihvatljivosti indeksa za pojedinu pretragu, čime bi se znatno ubrzao i olakšao proces izdavanja rezultata.

Zbog svih postojećih problema potrebno je konstantno educirati osoblje kako bi se u konačnici automatski HIL indeksi u svakodnevnom radu koristili na ispravan način i kako bi se njihovim korištenjem smanjio broj laboratorijskih pogrešaka.

7. LITERATURA

Ana Bronić, Desiree Coen Herak, Marija Milić, Sandra Margetić. Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Nacionalne preporuke za postupke uzorkovanja, pripreme i analize uzoraka te izvještavanje rezultata probirnih koagulacijskih pretraga protrombinskog vremena, aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena, trombinskog vremena, fibrinogena i D-dimera. HDMBLM, 2019, 01-2019/v.1.

Cadamuro J, Lippi G, von Meyer A, et al. European survey on preanalytical sample handling - Part 2: Practices of European laboratories on monitoring and processing haemolytic, icteric and lipemic samples. On behalf of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). *Biochem Med (Zagreb)*, 2019, 29(2):020705.

Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed specimens: A reason for rejection or a clinical challenge?. *Clinical chemistry*, 2000, 46, 306-7.

Di Fabio V. HC DX GCM CSL GPE EMEA IT. Siemens Healthcare Diagnostics Inc. 2013.

Dimeski G. Interference testing. *Clin Biochem Rev.*, 2008, 29 Suppl 1, 43–48.

Farrell CJ, Carter AC. Serum indices: managing assay interference. *Ann Clin Biochem*, 2016, 53(Pt 5), 527-538.

Geens T, Vertessen F, Malfait R, Deiteren K, Maes MB. Validation of the Sysmex CS5100 coagulation analyzer and comparison to the Stago STA-R analyzer for routine coagulation parameters. *Int J Lab Hematol*, 2015, 37, 372-81.

Hedeland Y, Gustafsson CM, Touza Z, Ridefelt P. Hemolysis interference in 10 coagulation assays on an instrument with viscosity-based, chromogenic, and turbidimetric clot detection [published online ahead of print, 2020 Mar 19]. *Int J Lab Hematol*, 2020, 10.1111/ijlh.13188.

Hörber S, Lehmann R, Peter A. Evaluation of the Atellica COAG 360 coagulation analyzer in a central laboratory of a maximum care hospital. *Int J Lab Hematol*, 2020, 42(1), 28-36.

Ji JZ, Meng QH. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta.*, 2011, 412(17-18), 1550-3.

Kazmierczak SC. Chapter 5 - Hemolysis, Lipemia, and High Bilirubin: Effect on Laboratory Tests. U: *Accurate Results in the Clinical Laboratory*. Dasgupta A, Sepulveda JL, urednici, Elsevier, 2013, str. 53-62.

Lippi G, Cadamuro J, Danese E, Gelati M, Montagnana M, von Meyer A, et al. Internal quality assurance of HIL indices on Roche Cobas c702. *PLoS ONE* 13(7): e0200088., 2018. a

Lippi, G, Cadamuro J. Visual assessment of sample quality: quo usque tandem? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2018, 56(4), 513–515.

Lippi G, Cadamuro J, von Meyer A, Simundic AM. Practical recommendations for managing hemolyzed samples in clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med.*, 2018, 56, 718-727. b

Lippi G, Plebani M, Di Somma S, Cervellin G. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2011, 48(3), 143-153.

Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost*, 2013, 39(3), 258-266.

Lippi G, Salvagno GL, Favaloro EJ, Guidi GC. Survey on the prevalence of hemolytic specimens in an academic hospital according to collection facility: opportunities for quality improvement. *Clin Chem Lab Med*, 2009, 47(5), 616 8.

Lippi G, Salvagno GL, Poli G, Gelati M, Favaloro EJ. Assessment of Plasma Sample Quality on Siemens Atellica COAG 360 System. *Semin Thromb Hemost*, 2019, 45(3), 315-318.

Mainali S, Davis SR, Krasowski MD. Frequency and causes of lipemia interference of clinical chemistry laboratory tests. *Pract Lab Med*, 2017, 8, 1-9.

Mastroianni A, Panella R, Morelli D. Invisible hemolysis in serum samples interferes in NSE measurement. *Tumori*, 2020, 106(1), 79-81.

Mukaide K. Introduction of Products, Overview of The Automated Coagulation Analyzer Sysmex CS-5100. *Sysmex Journal International*, 2013, Vol. 23, No. 1.

Nagant C, Rozen L, Demulder A. HIL Interferences on Three Hemostasis Analyzers and Contribution of a Preanalytical Module for Routine Coagulation Assays. *Clin Lab*, 2016, 62(10), 1979-1987.

Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Med (Zagreb)*, 2014, 24(1), 57-67.

Nikolac Gabaj N, Miler M, Vrtarić A, et al. Precision, accuracy, cross reactivity and comparability of serum indices measurement on Abbott Architect c8000, Beckman Coulter AU5800 and Roche Cobas 6000 c501 clinical chemistry analyzers. *Clin Chem Lab Med*, 2018, 56(5), 776-788.

Nikolac N, Simundic AM, Miksa M, Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Caruso B, Guidi GC. Heterogeneity of manufacturers' declarations for lipemia interference - urgent call for standardization. *Gin Chim Acta*, 2013, 426, 33-40.

Nougier C, Joussetme E, Sobas F, Pousseur V, Négrier C. Effects of hemolysis, bilirubin, and lipemia interference on coagulation tests detected by two analytical systems. *Int J Lab Hematol*. 2019, 00:1–7.

Novelli C, Vidali M, Brando B, et al. A collaborative study by the Working Group on Hemostasis and Thrombosis of the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) on the interference of haemolysis on five routine blood coagulation tests by evaluation of 269 paired haemolysed/non-haemolysed samples. *Biochem Med (Zagreb)*, 2018, 28(3):030711.

Ratzinger F, Schmetterer KG, Haslacher H, Perkmann T, Belik S, & Quehenberger P. Evaluation of the automated coagulation analyzer CS-5100 and its utility in high throughput laboratories. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2014, 52(8).

Siedel. J., Schmuck. R. and Staepels. J. Long-term stable liquid ready to use mono-reagent for the enzymatic assay of serum or plasma triglycerides (GPO-PAP method). AACC Meeting. Abstract 34. *Clin Chem*, 1993, 39, 1127.

Simundic AM, Baird G, Cadamuro J, Costelloe SJ, Lippi G. Managing hemolyzed samples in clinical laboratories. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2019.

Simundic AM, Nikolac N, Guder WG. Preanalytical Variation and Preexamination Processes. U: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Rifai N, Horvath AR, Wittwer C, urednici, St. Louis, Missouri, Elsevier, 2018, str. 81-95, 114-115.

Simundic AM, Nikolac N, Vukasovic I, Vrkic N. The prevalence of preanalytical errors in a Croatian ISO 15189 accredited laboratory. *Clin Chem Lab Med*, 2010, 48(7), 1009-1014.

SI2 Opis metoda V 5.0 English, *Roche Diagnostics GmbH*, 11-2014, katalog 04489365190.

Twomey PJ, Don-Wauchope AC, McCullough D. Unreliability of triglyceride measurement to predict turbidity induced interference. *J Clin Pathol*, 2003, 56, 861-2.

von Meyer A, Cadamuro J, Lippi G, Simundic AM. Call for more transparency in manufacturers declarations on serum indices: On behalf of the Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). *Clin Chim Acta*, 2018, 484, 328-332.

Wahlefeld AW, Herz G, Bernt E. Modification of the Malloy-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serum. *Scand J Clin Lab Invest*, 1972, 29.

Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *Int J Lab Hematol*, 2016, 38(4), 375-388.

8. SAŽETAK

HIL indeksi rezultat su automatske detekcije hemolize, lipemije i ikterije na automatskim analizatorima. Danas su implementirani u sustav većine biokemijskih i koagulacijskih analizatora te su postali zlatni standard u evaluaciji kvalitete uzoraka. HIL indeksi su u sustav koagulacijskih analizatora implementirani tek unazad nekoliko godina te se u praksi rijetko koriste i ne postoji mnogo verifikacijskih studija, iako su nužni zbog postojećeg utjecaja hemolize, lipemije i ikterije na rezultate koagulacijskih pretraga. Cilj ovog rada je stoga bio provjeriti pouzdanost određivanja HIL indeksa na koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Attelica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka).

Pouzdanost određivanja HIL indeksa provjerena je usporedbom rezultata određivanja kvalitativnih HIL indeksa na analizatoru Sysmex CS-5100 i Attelica COAG 360 s rezultatima određivanja kvantitativnih HIL indeksa na biokemijskom analizatoru Cobas c501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) i s točnim koncentracijama slobodnog hemoglobina za H indeks, triglicerida za L indeks i ukupnog bilirubina za I indeks u analiziranim uzorcima.

Zaključci ovog rada su da rezultati određivanja HIL indeksa na Sysmex-u CS-5100 i Attelici COAG 360 koreliraju s točnim koncentracijama mjerenih interferenata u uzorku i sa kvantitativnim HIL indeksima na Cobasu c501, da oba analizatora detektiraju prisutnost interferenata već kod vrlo niskih koncentracija te da su HIL indeksi na Sysmex-u CS-5100 i Attelici COAG 360 pouzdani za korištenje u rutinskom radu.

9. SUMMARY

HIL indices are the result of automatic detection of haemolysis, lipemia and icterus on automatic analysers. They are determined on most biochemistry and coagulation analysers and have become the golden standard in sample quality evaluation. Only recently HIL indices have been introduced on coagulation analysers, they are rarely used in routine work and there have not been many verification studies regardless of the fact that haemolysis, lipemia and icterus influence coagulation assays. Therefore, the main goal of this study was to verify the reliability of the HIL indices assessment on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Germany).

The reliability of the HIL indices assessment was examined by comparison of qualitative HIL indices assessment results on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 with the results of the quantitative HIL indices assessment on biochemistry analyser Cobas c501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and with the exact concentrations of free haemoglobin for H index, of triglycerides for L index and of total bilirubin for I index in analysed samples.

Main findings of this study are that the HIL indices assessment results on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 are in correlation with measured interference concentrations and with quantitative HIL indices on Cobas c501; further, that both analysers detect very low concentrations of interferences and that the HIL indices on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 are reliable for usage in everyday routine practice.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Pouzdanost određivanja indeksa hemolize, lipemije i ikterije na koagulacijskim analizatorima

Jozefina Palić

SAŽETAK

HIL indeksi rezultat su automatske detekcije hemolize, lipemije i ikterije na automatskim analizatorima. Danas su implementirani u sustav većine biokemijskih i koagulacijskih analizatora te su postali zlatni standard u evaluaciji kvalitete uzoraka. HIL indeksi su u sustav koagulacijskih analizatora implementirani tek unazad nekoliko godina te se u praksi rijetko koriste i ne postoji mnogo verifikacijskih studija, iako su nužni zbog postojećeg utjecaja hemolize, lipemije i ikterije na rezultate koagulacijskih pretraga. Cilj ovog rada je stoga bio provjeriti pouzdanost određivanja HIL indeksa na koagulacijskim analizatorima Sysmex CS-5100 i Attelica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Njemačka). Pouzdanost određivanja HIL indeksa provjerena je usporedbom rezultata određivanja kvalitativnih HIL indeksa na analizatoru Sysmex CS-5100 i Attelica COAG 360 s rezultatima određivanja kvantitativnih HIL indeksa na biokemijskom analizatoru Cobas c501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka) i s točnim koncentracijama slobodnog hemoglobina za H indeks, triglicerida za L indeks i ukupnog bilirubina za I indeks u analiziranim uzorcima. Zaključci ovog rada su da rezultati određivanja HIL indeksa na Sysmex-u CS-5100 i Attelici COAG 360 koreliraju s točnim koncentracijama mjerenih interferenata u uzorku i sa kvantitativnim HIL indeksima na Cobasu c501, da oba analizatora detektiraju prisutnost interferenata već kod vrlo niskih koncentracija te da su HIL indeksi na Sysmex-u CS-5100 i Attelici COAG 360 pouzdani za korištenje u rutinskom radu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranicu, 5 grafičkih prikaza, 3 tablice i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: HIL indeksi, hemoliza, lipemija, ikterija, koagulacijski analizatori

Mentor: **Prof. Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Željka Vogrinc, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Prof. Dr. sc. Lidija Bach Rojcky, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

The reliability of the HIL indices assessment on coagulation analysers

Jozefina Palić

SUMMARY

HIL indices are the result of automatic detection of haemolysis, lipemia and icterus on automatic analysers. They are determined on most biochemistry and coagulation analysers and have become the golden standard in sample quality evaluation. Only recently HIL indices have been introduced on coagulation analysers, they are rarely used in routine work and there have not been many verification studies regardless of the fact that haemolysis, lipemia and icterus influence coagulation assays. Therefore, the main goal of this study was to verify the reliability of the HIL indices assessment on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 (Siemens Healthcare, Marburg, Germany). The reliability of the HIL indices assessment was examined by comparison of qualitative HIL indices assessment results on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 with the results of the quantitative HIL indices assessment on biochemistry analyser Cobas c501 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and with the exact concentrations of free haemoglobin for H index, of triglycerides for L index and of total bilirubin for I index in analysed samples. Main findings of this study are that the HIL indices assessment results on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 are in correlation with measured interference concentrations and with quantitative HIL indices on Cobas c501; further, that both analysers detect very low concentrations of interferences and that the HIL indices on coagulation analysers Sysmex CS-5100 and Attelica COAG 360 are reliable for usage in everyday routine practice.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 5 figures, 3 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: HIL indices, haemolysis, lipemia, icterus, coagulation analysers

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vogrinc, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lidija Bach Rojecky, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Thesis accepted: August 2020