

Kterak se bilirubin potkal s paraproteinem v těsné kyvetě

Dovolte mi oprášíť jednu větu, která se vyskytuje v mnoha příbalových letácích, kde je zpravidla pominuta, aby se pak její praktické projevy objevovaly v odborné literatuře.

Věta zní: Ve velmi vzácných případech gamapatie, především IgM (Waldenströмова makroglobulinémie), může způsobit nespolehlivé výsledky. Rád bych vám popsal, jak jsme se v Liberci potkali s jejími konkrétními projevy, které kolega rozvinul a uvedl do souvislosti.

Poněkud poetický úvod

Léto je krásný čas. Počet vzorků protékajících laboratoří klesne, dovolené odčerpají část pracovníků a zbytek se většinou soustředí na práci, vyhýbá se průšvihům, čímž roste produktivita. Klesá i počet vzorků zasílaných Společností pro extrémní kontrolu kolegů, dokonce i vrcholné orgány Společnosti ustávají v chrlení doporučení a společně s akreditačními pracovníky nabírají síly k dalšímu páchání dobra v podobě zvyšování kvality v laboratořích od zeleného stolu.

V ten moment má člověk šanci zachytit a věnovat se dříve běžným zájmům, třeba lovit biochemické zvláštnosti. Tak jsem potkal praktické dopady výše zmíněné věty z příbalového letáku.

Nález

Při potvrzování výsledků z analyzátorů jsem si všiml opakovaně stanoveného celkového bilirubinu, automaticky iniciovaného analyzátořem. Podivné na tom bylo to, že prvotní výsledek byl 54 $\mu\text{mol/l}$ s hláškou „Prozone“, a opakované stanovení (automatický rerun) poskytlo výsledek 5 $\mu\text{mol/l}$. S ním byl stanoven i přímý

bilirubin s hodnotou 3 $\mu\text{mol/l}$. Po tomto vzorku zůstal otazník. K čemu došlo? Co to bylo a jak souvisí Prozone se stanovením bilirubinu, když je primárně určen ke sledování nerovnováhy antigenu/protilátky v imunoturbidimetrických stanoveních? Pak zafungovala shoda náhod. Efekt se zopakoval a současně jsem potkal článek z kongresového sborníku z Istanbulu (1). Pak už to bylo jen lehce vzrušující pátrání.

Literatura aneb co není v hlavě

Během exkurze do minulosti jsem se setkal opět se společností Boehringer Mannheim, která si nechala složení reagensů pro stanovení celkového bilirubinu patentovat. Když si vezmete patent CA2254357A1 z roku 1999 (publikovaný též jako DE69801266D1, EP0918220A1, EP0918220B1, US5935861) a porovnáte se současným bezpečnostním listem soupravy, zjistíte, že se moc nezměnilo, surfaktant Triton, rozpouštědlo sulfolan ((CH₂)₄SO₂), kyselina 4-aminobenzoová atd. To znamená, že odtud změna nepochází.

V časové ose o něco blíže k současnosti se počínají objevovat články shodně

popisující náhodné zvýšení hladiny bilirubinu u pacientů s paraproteinem IgG nebo IgM, jehož velikost překračuje několik desítek gramů na litr. Velice pečlivý v dokumentaci tohoto fenoménu byl Lirion Pantanowitz (2), který roku 2003 na reakčních grafech z Hitachi 917 dokázal odlišný průběh reakce, aby to završil zkumavkovým testem, ve kterém sérum s paraproteinem přidané k reagensům způsobilo místo červeného zabarvení zákal.

O rok později k dokonalosti přivedla technickou stránku fenoménu Agata Smogorzewska (3). Se svým kolektivem nejenže potvrdila možnost náhodného zvýšení výsledku bilirubinu reagensy nyní již Roche na Hitachi 917, ale rozšířila to i na arteficiální snížení hodnot výsledků stanovení HDL přímou metodou. Navíc vymysleli způsob, jak na atypický průběh reakce při stanovení celkového bilirubinu upozornit. Použili k tomu právě nastavení sledování Prozone, které je součástí každé definice aplikace Roche metody. Neznám pochopitelně souvislosti, ale dělá to na mne dojem, že nedávno nastoupivší BIL-T 3. generace pro systémy cobas[®] má v sobě zabudován tento mechanismus v pečlivě vyladěném provedení. Nasvědčuje tomu článek dvojice Andries J. Bakker,

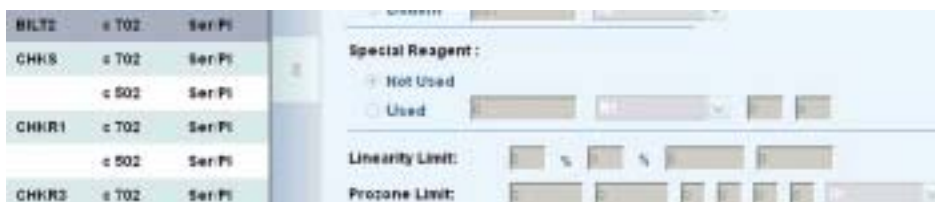
Matthias Mücke (4), ve kterém jsou prezentovány výsledky spojení odborníka na problematiku interference paraproteinů a zástupce firmy vyrábějící krmivo pro naše nenasyté systémy, který si uvědomuje narůstající frekvenci výskytu paraproteinémií a nebezpečnost v nepředvídatelnosti jejich účinků. Je vcelku lhostejno, zda se tak děje kvůli prodlužujícímu se věku pacientů, nebo za to může snížená kvalita životního prostředí a životní styl. Jejich popis způsobu interference se trochu liší od předešlých autorů. Tvrdí, že k precipitaci dochází až po přidání činidla R2. Používají však reagentie Bilirubin Liquid a falešné zvýšení absorbance je na systému MODULAR D detekováno pomocí funkce Prozone. Autoři připomínají, že podchycení interferencí paraproteinu, monoklonální komponenty, je prakticky neřešitelný problém, závislejší na zajištění rozpustnosti paraproteinu během měnicích se podmínek reakce. Do té doby jsem si neuvědomil, že hraje svou roli i materiál. Plazma obsahuje fibrinogen, jehož látková hmotnost nemusí být vždy do 4 g/l. Takže objem bílkovinné složky se může rychleji dostat meze rozpustnosti. Počítat je nutné i s multiplikačním efektem přítomnosti heparinu.

Vedlejší efekt vylepšení aplikace

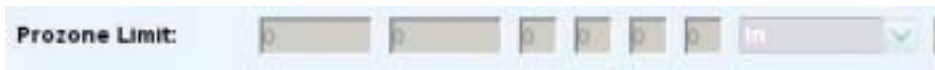
Zpět do provozu. Co když jsem si rerunu dříve nevšiml? Faktem však je, že aplikace pro BIL-T gen. 3 se od předchozích, BILTS a BILT2, poněkud liší (obrázky). Bohužel ke starším Modulárovým již nemám přístup.



Obr. 1: Výřez obrazovky aktuální aplikace BIL-T gen. 3



Obr. 2: Výřez obrazovky předchozí aplikace BILT2 a BILTS (níže)



Zde by šlo povídati uzavřít a konstatovat smutně, že jsme zase nenalezli nic

nového. Jen jakýsi vedlejší efekt vylepšení aplikace, která měla upozorňovat na možná chybná měření vysokých koncentrací bilirubinu. Proč však házet hned zkumavky do odpadu? Vždyť lze alespoň rozšířit využití stanovení sérových indexů! V obou systémech **cobas**[®], které provozujeme, jsou sérové indexy nastaveny tak, že do LISu jsou přenášeny oproti originální aplikaci lehce upravené hodnoty. Hemolýza v mg/l hemoglobinu, chylozita v mg/l Intralipidového ekvivalentu a ikterita v µmol/l bilirubinu. Dosud byly výsledky takto nastavených sérových indexů využívány k okamžité indikaci interference u výsledků, což systém **cobas**[®] 8000 umí, a dokonce jimi dokáže ve formě značek/flagů zásobovat informační systém. Nebo lze porovnávat výsledky stanovení bilirubinu s hodnotami ikterity. Již teď mám jistotu, že u pediatrických vzorků není vyšetření zkresleno chybným pipetováním, třeba kontaktem jehly s boční stěnou mikrozukavky, kdy hrozí nasátí menšího objemu vzorku, než je požadováno. Stejně pravidlo může být tedy použito i na nižší hladiny bilirubinu a ikterického indexu pro případ, že by selhala indikace Prozone. Prakticky totéž doporučuje Chelsea A. Sheppard (5).

Analýza výsledků

Ku pomoci ve fázi určení četnosti výskytu tohoto fenoménu přišel informační systém. Podmínkový export dokáže vytáhnout z databáze prakticky všechny možné informace třeba od 1. 1. 2014, tedy záznamy kombinace metod bilirubin, celková

ně, je zkontrolovat historii výsledku bilirubinu, zda nedošlo k rerunu. Pak následuje, kuchařskou terminologií řečeno, redukování vývaru. Dne 21. 3. 2014 byla nasazena souprava BIL-T 3. generace. Do té doby byla používána souprava BILTS a výsledky jí stanovené je tedy nutno vyloučit, protože je již nelze ověřit. Pomocí analýzy zbývajících takřka 250 záznamů vzorků, které vyhledal informační systém a obsahovaly kombinaci stanovení bilirubin, celková bílkovina, kvantifikovaný paraprotein, imunoglobuliny, lze říci, že efekt nastává, když paraprotein, kvantifikovaný na základě elektroforézy bílkovin, překročí hranici položenou lehce nad 40 g/l. Při poklesu paraproteinové frakce pod tuto hodnotu efekt mizí, což bylo zaznamenáno u dvou pacientů ze šesti nalezených. U dvou pacientů byl pozorován nárůst hodnoty paraproteinu s následnou iniciací rerunu při stanovení bilirubinu překročením parametrů Prozone. Raritou pak je jedinec, u něhož byl zaznamenán nárůst paraproteinu s aktivací rerunu a vymizením při poklesu paraproteinémií. Podle několika pacientů však nelze usuzovat na jiné zákonitosti. I když lze konstatovat, že jsme se nesetkali s jiným zákal tvořícím paraproteinem než třídy IgG. Na druhou stranu by bylo vhodné prověřit průběhy stanovení u vzorků, které zůstaly těsně pod vrcholem, zda nastavená hodnota Prozone dokáže zachytit vždy vznik zákalu společně se zabarvením reakční směsi. Lze však měnit hodnoty Prozone? Bohužel nikoliv. Leda byste si postavili aplikaci na volný, tzv. vývojový kanál.

Zpět na začátek

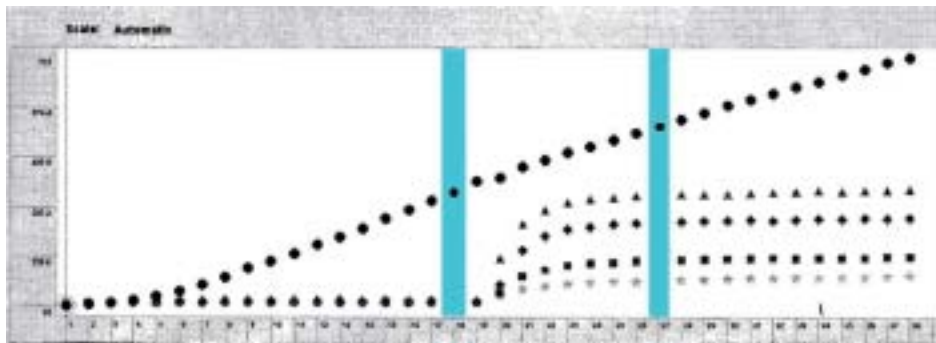
Dovolím se vrátit k úvodní větě. Jistě jste si všiml určitého rozporu. My jsme našli interference u paraproteinů třídy IgG, a upozornění hovoří o gamapatii a zdůrazňuje třídu IgM. Vysvětlení nemám, leč mohu se dohadovat, že v třídě IgM se vyskytují řidčeji paraproteiny s vysokou gramáží a současně ochrana soupravy proti vzniku zákalu přestane fungovat po překročení hodnoty 40 g/l, a to ještě ne vždy.

Potěšitelným faktem je skutečnost, že ve srovnání s literaturou nikdy nepřesáhla falešně zvýšená hodnota bilirubinu 60 µmol/l a hodnoty změřené v rerunu se sníženým objemem vzorku odpovídají

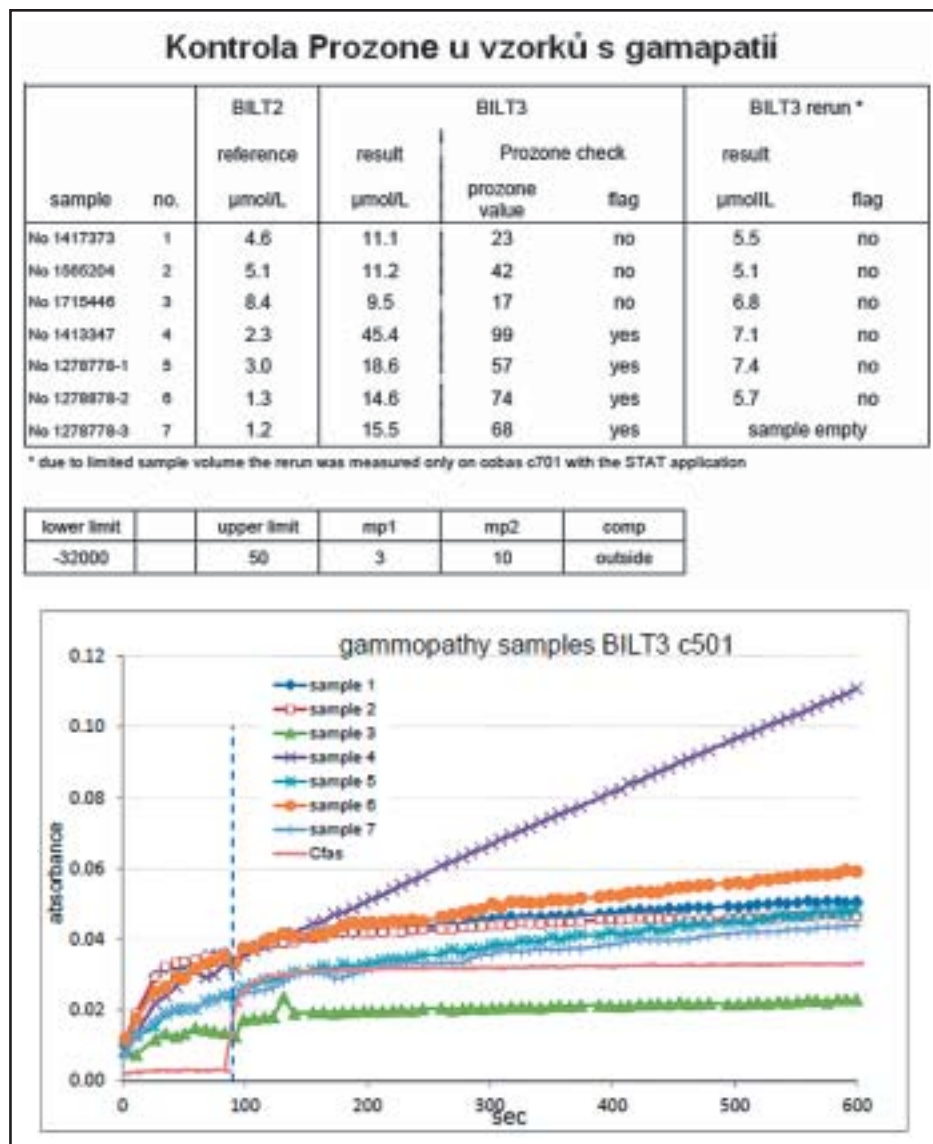
hodnotám indexu ikterity.

Zcela stranou zůstalo stanovení HDL cholesterolu, které by dle literárních pramenů mělo být ovlivňováno též. Bohužel se v hledané kombinaci prakticky nevykytlo. Hematologická ambulance, ze které pocházela většina vzorků, frakce cholesterolu většinou nevyšetřuje.

Kdo by měl zájem, výčet metod, které jsou ovlivněny vyššími hladinami paraproteinové složky séra, se snažil postihnout M. Berth (8) a mnozí další se zabývají dokumentací jednotlivých případů a případně prevencí chybných výsledků. Vliv paraproteinu se nesoustřeďuje na jednu konkrétní firmu, a dokonce jde o vliv multioborový.



Graf 1: Graf průběhu reakce s interferencí (kolečka) a normálních vzorků (ostatní) s vyznačenými měřicími body. (Vytvořeno pomocí funkce Overlay na cobas® 8000.) Je zde patrné, že zákal se začíná tvořit již po přidání R1 (silně kyselé prostředí pH1).



Originální dokumentace stejného jevu na modulu c 501, pro který se zařazení kontroly Prozone do aplikace plánuje.

Výpočet Prozone (PC) ve vzorku s interferujícím paraproteinem

$$PC = A_{mp2} - d * A_{mp1}$$

$$kde \quad d = \frac{V_{samp} + V_{R1}}{V_{samp} + V_{R1} + V_{R2}}$$

Symbol	Význam	Hodnota
PC	Hodnota Prozone	
A_{mp2}	Absorbance v měřicím bodu Prozone č. 2	1524
A_{mp1}	Absorbance v měřicím bodu Prozone č. 1	181
d	Faktor ředění (korekce naředění přidáním R2/3)	
V_{samp}	Objem vzorku	2
V_{R1}	Objem R1	120
V_{R2}	Objem R2	20

$$d = \frac{2 + 120}{2 + 120 + 20} \quad d = 0,859$$

$$PC = 1524 - 181 * 0,859$$

PC = 1369 tzn. leží mimo interval -32 000 až 100 a splňuje podmínku pro vznik hlášky Prozone

Výpočet Prozone (PC) v normálním vzorku

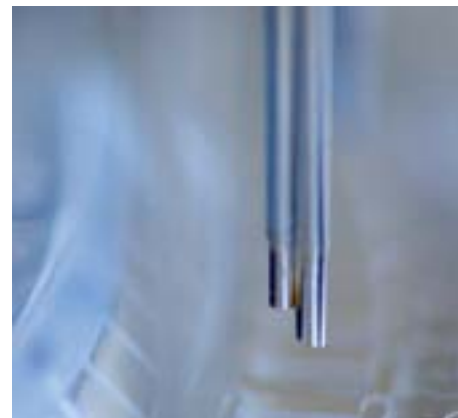
Symbol	Význam	Hodnota
PC	Hodnota Prozone	
A_{mp2}	Absorbance v měřicím bodu Prozone č. 2	86
A_{mp1}	Absorbance v měřicím bodu Prozone č. 1	80
d	Faktor ředění (korekce naředění přidáním R2/3)	
V_{samp}	Objem vzorku	2
V_{R1}	Objem R1	120
V_{R2}	Objem R2	20

$$d = 0,859$$

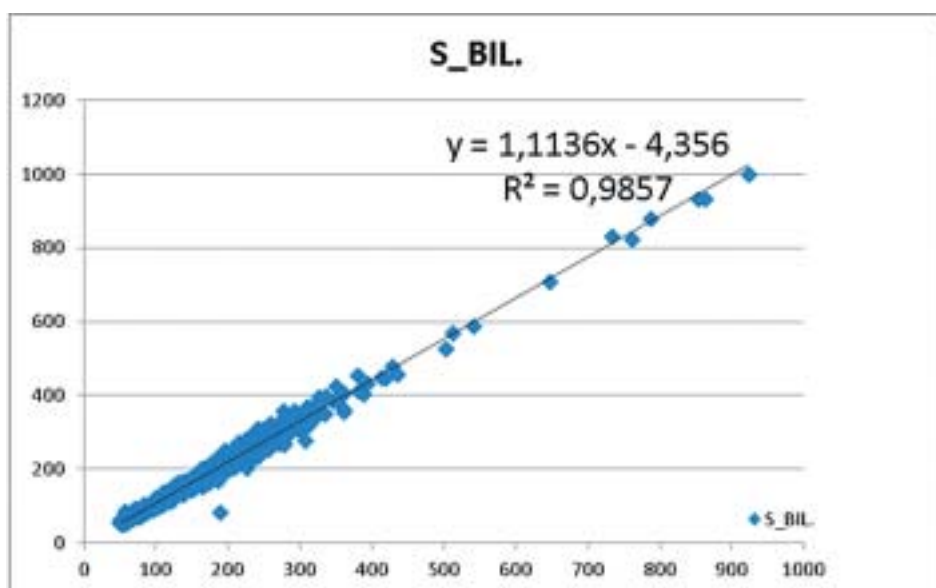
$$PC = 86 - 80 * 0,859$$

PC = 17 tzn. leží uvnitř intervalu -32 000 až 100 a nesplňuje podmínku pro vznik hlášky Prozone

Datum odb	Jméno	Rerun	S_BIL.	S PROT	S PP	S FNAP	S FLAM	kappa/lambda
31.03.2014	H.M.	ne	9	94,8	43,5	237	9,3	IgG-kappa
16.04.2014	H.M.	ne	5	71,9	25,6	212	1,77	IgG-kappa
26.04.2014	H.M.	17	4	102,3	49,6	366	1,67	IgG-kappa
23.05.2014	H.M.	ne	4	77,8	21,7	28,8	2,1	IgG-kappa
20.06.2014	H.M.	ne	5	71,4	16,2	74,5	8,66	IgG-kappa
10.07.2014	H.M.	ne	9	82,6	26,2	69,8	8,95	IgG-kappa
17.08.2014	H.A.	54	5	137,5	82,6	1920	1,19	IgG-kappa
20.08.2014	H.A.	ne	12	90,9	43,5	565	7,56	IgG-kappa
30.08.2014	K.E.	ne	13	120,2	64,3	1,55	24,6	IgG-lambda
14.07.2014	K.E.	ne	6	96,1	45,3	5,85	20,4	IgG-lambda
11.08.2014	K.E.	ne	10	95,9	32,8	7,4	17,2	IgG-lambda
29.04.2014	P.A.	ne	7	81,8	10,7	25,2	14,6	IgG-kappa
10.06.2014	P.A.	ne	9	90	22,5	23,5	10,7	IgG-kappa
08.07.2014	P.A.	58	9	130,4	65,5	23,1	5,83	IgG-kappa
13.03.2014	V.M.	ne	4	126,9	68,1	22,5	2640	IgG-lambda
27.03.2014	V.M.	36	8	101,6	48,2	11,7	2640	IgG-lambda
24.04.2014	V.M.	36	5	102	49,3	19,7	3180	IgG-lambda
12.05.2014	V.M.	39	5	103,5	49,5	14,6	2700	IgG-lambda
19.06.2014	V.M.	26	4	98,6	44,8	39,1	2400	IgG-lambda
13.08.2014	V.M.	41	5	105,3	49,6	19,5	3060	IgG-lambda
21.08.2014	V.S.	27	11	126,6	64,7	59,7	7,79	IgG-kappa
27.08.2014	Z.D.	ne	14	97,1	38,7	1,37	456	IgG-lambda
16.08.2014	Z.D.	19	4	118,2	44,8	10,2	516	IgG-lambda



Tab. 1: Tabulka všech výsledků pacientů s paraproteinem vyšším než 40 g/l a jejich další výsledky. Červeně jsou zvýrazněny záznamy s reagensmi BILTS. Zeleně jsou podbarveny záznamy s rerunem. Výjimkou je pacient K.E., který splňuje předpoklady, ale byl bez rerunu.



Graf 2: Graf vztahu stanoveného bilirubinu (souprava BIL-T 3. gen) a fotometricky měřené ikerity jako sérového indexu.

Literatura:

- 1) Seimiya M., Y. Suzuki, T. Yoshida, Y. Sawabe, K. Matsushita, F. Nomura, *The Abnormal Reaction Data-detecting Function of the Automated Biochemical Analyzer Was Useful to Prevent Erroneous Total Bilirubin Measurement and to Identify Monoclonal Proteins*, Poster, Istanbul.
- 2) Pantanowitz, L., G. L. Horowitz, J. N. Upalakalin, and B. A. Beckwith. *Artifactual hyperbilirubinemia due to paraprotein interference*. *Arch Pathol Lab Med* 2003. 127:55-59.
- 3) Smogorzewska, A., J. G. Flood, W. H. Long, and A. S. Dighe. *Paraprotein interference in automated chemistry analyzers*. *Clin Chem* 2004. 50:1691-1693.
- 4) Bakker A. J., Mücke M. *Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention* *Clin Chem Lab Med* 2007; 45(9):1240-1243.
- 5) Sheppard, C. A., R. C. Allen, and G. E. Austin, et al. *Paraprotein interference in automated chemistry analyzers*. *Clin Chem* 2005. 51:1077-1078.
- 6) Nauti, A., A. Barassi, G. Merlini, and G. V. d'Eril. *Paraprotein interference in an assay of conjugated bilirubin*. *Clin Chem* 2005. 51:1076-1077.
- 7) Dutta, A. K. *A Curious Case of Hyperbilirubinemia*, *Ind J Clin Biochem (Apr-June 2012)* 27(2):200-201.
- 8) Berth M., Delanghe J. *Protein precipitation as a possible important pitfall in the clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of the literature*. *Acta Clin Belg* 2004; 59:263-73.
- 9) Yusong Yang, MD, PhD; Peter J. Howanitz, MD; Joan H. Howanitz, MD; Helen Gorfajn, MS; Keung Wong, MS, *Paraproteins Are a Common Cause of Interferences With Automated Chemistry Methods*. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Feb;132(2):217-23.
- 10) Kadri N., Douville P., Lachance P. *Monoclonal paraprotein may interfere with the Roche direct HDL-C Plus assay*. *Clin Chem* 2002; 48:964.