

SOMMAIRE

Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	12
Liste des abréviations	13
INTRODUCTION.....	15
GÉNÉRALITÉS.....	16
I. L'erreur.....	17
II. Substances interférentes.....	18
1. Hémolyse.....	18
2. Ictère.....	19
3. Lipémie	20
III. Mécanismes d'interférence.....	20
1. Effet pré-analytique.....	20
1. Interférences d'apport	20
2. Interférences chimiques.....	20
2. Interférences physiques	21
1. Interférences liées à la modification de la matrice	21
2. Interférences de détection et interférences spectrales.....	21
3. Interférences chimiques.....	22
IV. Détermination des indices sériques	23
V. Objectifs de l'étude	24
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	25
I. Constitution des pools de plasma	26
II. Surcharge des échantillons plasmatiques	26
1. Préparation de l'hémolysat	26
2. Surcharge en hémoglobine des échantillons plasmatiques	27
3. Surcharge en Intralipid® des échantillons plasmatiques	27
4. Surcharge en bilirubine des échantillons plasmatiques.....	27
III. Instrumentation	27

1.	Techniques de dosage	27
2.	Paramètres étudiés	28
1.	Interférence de l'hémolyse	28
2.	Interférence de la lipémie	28
3.	Interférence de l'ictère.....	28
3.	Mesure des indices sériques	30
4.	Principe de dilution automatique.....	31
IV.	Présentation des résultats - Statistiques.....	32

RÉSULTATS 33

I.	Corrélation.....	34
1.	Hémolyse.....	34
2.	Lipémie	34
3.	Ictère.....	35
II.	Alanine Amino-Transférase.....	37
III.	Albumine	40
IV.	Aspartate amino transférase	42
V.	Acide urique	45
VI.	Calcium.....	46
VII.	Créatine kinase.....	47
VIII.	Créatinine.....	50
IX.	CRP	53
X.	Cholestérol total.....	54
XI.	Gamma-Glutamyl Transférase	56
XII.	Glucose.....	59
XIII.	HDL-Cholestérol	61
XIV.	Lactate deshydrogénase	62
XV.	Lipase	65
XVI.	Myoglobine	67
XVII.	Magnésium.....	68
XVIII.	NT ProBNP.....	69
XIX.	Phosphore	70
XX.	Phosphatase Alcaline	72
XXI.	Protéines totales	74

XXII. Protéine S100 β	76
XXIII. Triglycérides	77
XXIV. Troponine T hs	79
XXV. Urée.....	81
DISCUSSION	86
I. Rappel des objectifs	87
II. Méthodes utilisées	87
1. Hémolyse.....	87
1. Recommandations.....	87
2. Avantages et limites de la procédure utilisée	87
2. Lipémie	87
3. Recommandations.....	87
4. Avantages et limites de la procédure utilisée	88
3. Ictère.....	88
1. Recommandations.....	88
2. Avantages et limites de la procédure utilisée	88
III. Définition de l'interférence significative	89
1. Recommandations.....	89
2. Limite utilisée et état de l'art	89
IV. Discussion selon le type de surcharge.....	90
1. Hémolyse.....	90
1. Classement des paramètres	90
2. Cas de la troponine T.....	91
2. Lipémie	92
1. Classement des paramètres	92
2. Potentiométrie directe/ indirecte	92
3. Ictère.....	93
1. Classement des paramètres	93
2. Cas du dosage de la créatinine.....	93
V. Quels dosages sont les moins impactés ?	93
VI. Quelles longueurs d'ondes semblent les plus concernées ?.....	94
1. Hémolyse.....	94
2. Lipémie	94

3.	Ictère.....	94
VII.	Selon le sens de l'interférence	94
1.	Hémolyse.....	94
2.	Lipémie	95
3.	Ictère.....	95
VIII.	Mesures de prévention et solutions	95
1.	Phase pré-analytique.....	95
1.	Réalisation des prélèvements, dispositifs utilisés, transport et centrifugation.....	95
2.	Élimination physique des impuretés	95
2.	Phase analytique	96
1.	Détermination des indices sériques	96
2.	Optimisation des méthodes de dosages et de détection.....	97
3.	Dilution de l'échantillon	97
3.	Phase post-analytique	97
IX.	L'harmonisation des pratiques, une évolution indispensable	99
	CONCLUSION	100
	BIBLIOGRAPHIE	101
	ANNEXES	106

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Circuit du prélèvement et interférences
- Figure 2** : Spectre d'absorption de l'hémoglobine, de la lipémie et la bilirubine
- Figure 3** : Exemples d'échantillons hémolysés
- Figure 4** : Évolution des activités ASAT et LDH en fonction de la concentration en hémolysat.
- Figure 5** : Formules de calcul utilisées pour la détermination des indices sériques
- Figure 6** : Corrélation entre la concentration en hémoglobine et l'indice d'hémolyse
- Figure 7** : Corrélation entre la concentration en Intralipid® et l'indice de lipémie
- Figure 8** : Corrélation entre la concentration en Intralipid® et la concentration en triglycérides
- Figure 9** : Corrélation entre la concentration de ditaurate de bilirubine et l'indice d'ictère
- Figure 10** : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'alanine amino-transférase
- Figure 11** : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'albumine
- Figure 12** : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'aspartate amino-transférase
- Figure 13** : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'acide urique
- Figure 14** : Résultats expérimentaux pour le dosage du calcium
- Figure 15** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la créatine kinase
- Figure 16** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la créatinine
- Figure 17** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la CRP
- Figure 18** : Résultats expérimentaux pour le dosage du cholestérol total
- Figure 19** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la gamma-glutamyl-transferase
- Figure 20** : Résultats expérimentaux pour le dosage du glucose
- Figure 21** : Résultats expérimentaux pour le dosage du HDL-Cholestérol
- Figure 22** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la lactate deshydrogénase
- Figure 23** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la lipase
- Figure 24** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la myoglobine
- Figure 25** : Résultats expérimentaux pour le dosage du magnésium
- Figure 26** : Résultats expérimentaux pour le dosage du NT-ProBNP
- Figure 27** : Résultats expérimentaux pour le dosage du phosphore
- Figure 28** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la phosphatase alcaline
- Figure 29** : Résultats expérimentaux pour le dosage des protéines totales
- Figure 30** : Résultats expérimentaux pour le dosage de la protéine S100 β
- Figure 31** : Résultats expérimentaux pour le dosage des triglycérides

Figure 32 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la troponine T hypersensible (méthode Stat)

Figure 33 : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'urée

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Paramètres et caractéristiques des méthodes de dosage étudiées pour l'influence de l'hémolyse

Tableau 2 : Paramètres et caractéristiques des méthodes de dosage étudiées pour l'influence de la lipémie et de l'ictère

Tableau 3 : Interférences observées sur le dosage de l'alanine amino-transférase

Tableau 4 : Interférences observées sur le dosage de l'albumine

Tableau 5 : Interférences observées sur le dosage de l'aspartate amino-transférase

Tableau 6 : Interférences observées sur le dosage de l'acide urique

Tableau 7 : Interférences observées sur le dosage du calcium

Tableau 8 : Interférences observées sur le dosage de la créatine kinase

Tableau 10 : Interférences observées sur le dosage de la créatinine

Tableau 11 : Interférences observées sur le dosage de la CRP

Tableau 12 : Interférences observées sur le dosage du cholestérol total

Tableau 13 : Interférences observées sur le dosage de la gamma-glutamyl-transférase

Tableau 14 : Interférences observées sur le dosage du glucose

Tableau 15 : Interférences observées sur le dosage du HDL-Cholestérol

Tableau 16 : Interférences observées sur le dosage de la lactate déshydrogénase

Tableau 17 : Interférences observées sur le dosage de la lipase

Tableau 18 : Interférences observées sur le dosage de la myoglobine

Tableau 19 : Interférences observées sur le dosage du magnésium

Tableau 20 : Interférences observées sur le dosage de la NT-ProBNP

Tableau 21 : Interférences observées sur le dosage du phosphore

Tableau 22 : Interférences observées sur le dosage de la phosphatase alcaline

Tableau 23 : Interférences observées sur le dosage des protéines totales

Tableau 24 : Interférences observées sur le dosage de la protéine S100 β

Tableau 25 : Interférences observées sur le dosage des triglycérides

Tableau 26 : Interférences observées sur le dosage de la troponine T hs

Tableau 27 : Interférences observées sur le dosage de l'urée

Tableau 28 : Concentrations étudiées et indices limites correspondant pour l'hémolyse

Tableau 29 : Concentrations étudiées et indices limites correspondant pour la lipémie

Tableau 30 : Concentrations étudiées et indices limites correspondant pour l'ictère

Tableau 31 : Principales études et critères utilisés pour définir l'interférence significative

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACTH	Adrenocorticotropin hormone
ADP	Adénosine diphosphate
ALAT	Alanine Amino-Transferase
ALB	Albumine
AMP	Adénosine monophosphate
ASAT	Aspartate Amino-Transferase
ATP	Adénosine triphosphate
AUR	Acide urique
CA	Calcium
CEC	Circulation Extra Corporelle
CIQ	Contrôle Interne de Qualité
CK	Créatine Kinase
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRE	Créatinine
CRP	Protéine C réactive
CT	Cholestérol total
CV	Coefficient de variation
CVa	Coefficient de variation analytique
CVb	Coefficient de variation biologique
DSI	Desirable Specification for Imprecision
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLU	Glucose
GPO	Glycérol Peroxydase
H	Indice d'hémolyse
HDL-C	High Density Lipoprotein-Cholesterol
I	Indice d'ictère
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
L	Indice de lipémie
LDH	Lactate deshydrogénase
LIP	Lipase
LPL	Lipoprotein Lipase
M	Mole/Litre
Mb	Myoglobine
Mg	Magnésium
NAC	N-acétylcystéine
NaCl	Chlorure de sodium
NM-BAPTA	5-nitro-5'-méthyl-1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
NT-Pro BNP	Fragment N-Terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B
P	Phosphore
PAL	Phosphatase alcaline
pH	Potentiel Hydrogène

POD	Peroxydase
PT	Protéines totales
S100	Protéine S100 bêta
SH GTA	Guite Technique d'Accréditation
TAE	Total Allowable Error
TG	Triglycérides
TNT hs	Troponine T cardiaque hypersensible
UR	Urée
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein

INTRODUCTION

La Biologie Médicale est devenue, à la suite de l'évolution importante des connaissances scientifiques et technologiques, un élément déterminant dans le parcours de soin des patients. Les résultats des examens de Biologie Médicale sont directement impliqués dans 60 à 70 % des diagnostics. Cette discipline évolue actuellement à différents niveaux : structures et fonctionnement du laboratoire, automatisation et robotisation des phases pré-analytiques et analytiques, assurance et management de la qualité, responsabilité du biologiste au sein de l'équipe médicale.(1)

Parmi ces évolutions, de nombreuses visent plus particulièrement l'amélioration de la productivité, du rendement et de la cadence d'analyse avec l'utilisation d'automates multiparamétriques. Les réactifs, les méthodes d'analyse et de détection et les outils informatiques gérant ces processus ont des rôles considérables pour l'amélioration de la productivité d'un laboratoire. Ils doivent également contribuer à accroître constamment la précision, la justesse et la reproductibilité des dosages.

Les analyses de Biochimie Générale sont parmi les plus prescrites, elles sont réalisées dans les bilans biologiques de routine et sont également indispensables dans les contextes d'urgence. Logiquement, la Biochimie est donc une des disciplines ayant bénéficiée le plus précocement des progrès en termes d'automatisation.

L'ensemble de ces progrès n'a pourtant pas permis de s'affranchir d'éventuelles erreurs. Actuellement la part prépondérante des erreurs concerne la phase pré-analytique. Ainsi la mesure de certains paramètres sur des échantillons hémolysés, lipémiques ou ictériques peut entraîner un résultat erroné conduisant à de mauvaises interprétations, un mauvais diagnostic, la répétition des analyses et une prise en charge inappropriée du patient.

Lors de ce travail nous avons étudié l'interférence de ces trois facteurs sur les principaux dosages biochimiques réalisés sur le Cobas 6000, Roche®.

Nous procéderons en exposant les principaux mécanismes d'interférences, en détaillant les matériels et la méthode utilisés, en identifiant et en quantifiant les interférences dues à ces substances visibles puis en discutant de la conduite à tenir lors de la détection d'un échantillon présentant une de ces trois caractéristiques.

Généralités

I. L'erreur

La prévention des erreurs médicales est un des enjeux majeurs de la prise en charge des patients. L'hémolyse, le caractère ictérique ou lactescent d'un échantillon plasmatique peuvent interférer avec la mesure d'un analyte. Ces variables pré-analytiques peuvent donc conduire à des erreurs de mesures difficiles à mettre en évidence et à contrôler.

L'erreur totale analytique se définit comme la différence entre la valeur mesurée d'une grandeur et sa valeur vraie. C'est la somme de l'erreur systématique (erreur de justesse) et de l'erreur aléatoire (défaut de fidélité). En biologie médicale, la valeur vraie n'étant généralement pas connue on préfère exprimer la variabilité totale des résultats d'une méthode à l'aide de l'incertitude de mesure.

L'erreur totale quant à elle correspond à l'erreur totale analytique complétée par tous les éléments de l'analyse de risque portant sur l'ensemble du processus depuis la prescription jusqu'à l'utilisation du résultat. Tous ces éléments qui peuvent ne pas être quantifiables, s'ajoutent à l'erreur totale analytique.

Outre la sensibilité et la spécificité des méthodes d'analyse, les fabricants de trousse diagnostics et de kits réactifs fournissent des informations concernant la sensibilité de leurs produits aux principales interférences. Ces informations peuvent être plus ou moins détaillées et dans le meilleur des cas elles prennent la forme d'un index ou seuil à partir duquel le résultat est potentiellement faussé.

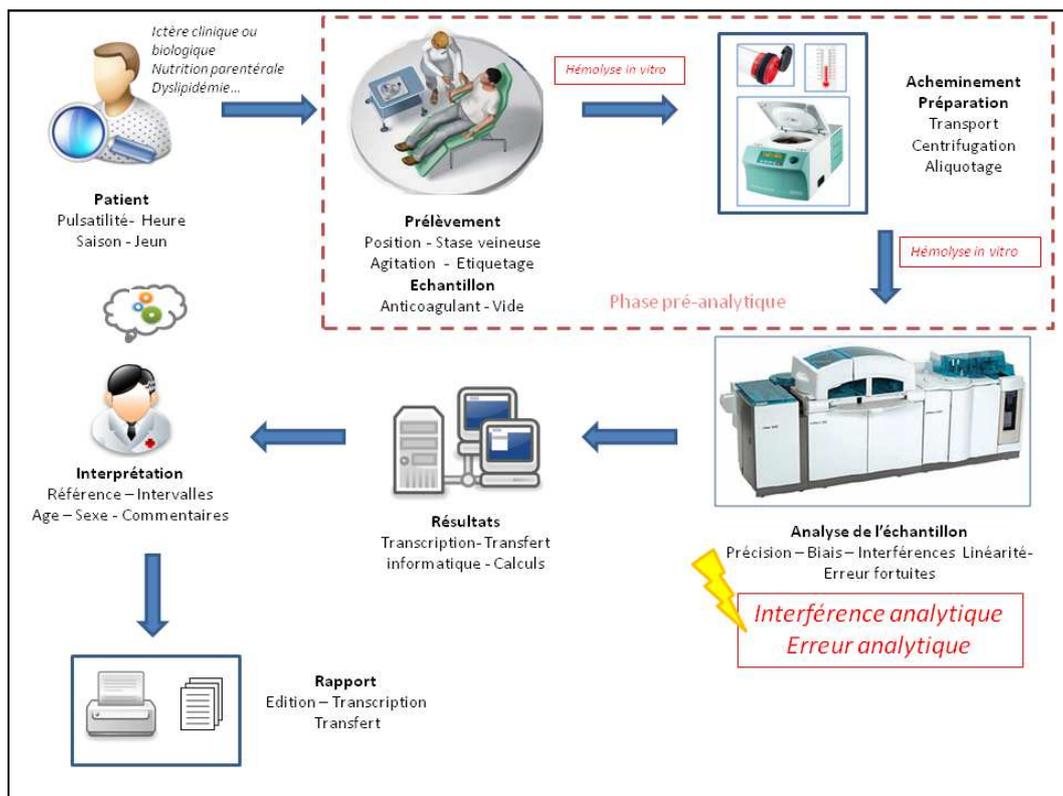


Figure 1 : Circuit du prélèvement et interférences

II. Substances interférentes

L'interférence est définie comme étant une cause de biais dans la mesure de concentration d'un analyte dû à un autre composant ou à une propriété de l'échantillon. (2) Il s'agit donc de l'effet que présente une substance présente dans l'échantillon, de modifier la juste valeur du résultat du dosage d'un analyte exprimé en concentration ou en activité. (3)

Les substances interférentes sont nombreuses et peuvent être d'origine endogène ou exogène. On y recense :

- Des métabolites produits au cours de processus pathologiques comme les immunoglobulines monoclonales dans le myélome.
- Des xénobiotiques utilisés pour le diagnostic ou le traitement : produits de contraste, anticoagulants, nutrition parentérale, etc.
- Des substances ajoutées lors du recueil de l'échantillon : anticoagulants.
- Des contaminants introduits involontairement dans l'échantillon : crème pour les mains, poudre de gants.

Lors de ce travail nous nous sommes intéressés aux principales interférences endogènes visibles. Parmi celles-ci nous avons étudié celles qui découlent de l'hémolyse et celle liées à l'aspect ictérique ou lactescent des échantillons.

1. Hémolyse

L'hémolyse consiste en la rupture de la membrane plasmique de l'érythrocyte avec pour conséquence la libération de son contenu intracellulaire dont une quantité importante d'hémoglobine. Après centrifugation de l'échantillon de sang total, l'hémolyse se caractérise par une coloration rosée à rouge du plasma ou du sérum. L'intensité de cette coloration varie selon la concentration d'hémoglobine libre.

Physiologiquement, on peut retrouver de l'hémoglobine libre dans le plasma à des concentrations inférieures à 0.02 g/L (1.2 $\mu\text{mol/L}$) ou dans le sérum à des concentrations inférieures à 0.05 mg/L (3.1 $\mu\text{mol/L}$). L'hémolyse, visuellement détectable pour des concentrations d'hémoglobine libre d'environ 0.1 à 0.3 g/L (6.2 à 18.6 $\mu\text{mol/L}$), est clairement visible pour une lyse de 0.5% des globules rouges correspondant à 0.5 g/L (31 $\mu\text{mol/L}$) d'hémoglobine libre. (4,5) La détection visuelle de l'hémolyse peut toutefois être entravée par un aspect ictérique ou lactescent de l'échantillon.

On distingue l'hémolyse *in vivo* de l'hémolyse *in vitro* liée au traitement pré-analytique de l'échantillon.

L'hémolyse *in vivo* correspond à une hémolyse intravasculaire, aiguë ou chronique. Il s'agit d'une destruction exagérée des hématies normalement produites, dont la durée de vie se trouve ainsi raccourcie. Elle se traduit le plus souvent par une anémie. Les causes des situations d'hémolyse peuvent être corpusculaires (liées à une anomalie du globule rouge : membrane, hémoglobine ou enzyme) ou extra-corpusculaires d'origine immunologiques (auto-anticorps, allo-anticorps) ou non immunologiques (mécanique, infectieuse ou toxique).

Parmi les situations et sujets à risque d'hémolyse mécanique, on peut citer certaines conditions chirurgicales comme la chirurgie cardiaque réalisée sous circulation extra-corporelle (CEC), les sujets

ayant bénéficié d'un remplacement valvulaire ou les patients sous assistance circulatoire. Dans un établissement de soin, la prévalence des hémolyses intra-vasculaires d'origine mécanique est proportionnelle à l'activité de chirurgie cardiaque. Cette situation est assez fréquemment observée au sein de l'hôpital Guillaume et René Laennec qui comptabilise plus de 1500 chirurgies sous CEC par an.

Dans l'ensemble de ces situations d'hémolyse *in vivo*, il est bien entendu indispensable de pouvoir rendre aux cliniciens des résultats biochimiques dans un délai permettant un suivi et une prise en charge optimale du patient.

Outre ces situations d'hémolyses intra-vasculaires, l'hémolyse des échantillons est principalement due à des problèmes pré-analytiques (98% des cas). L'ensemble des étapes pré-analytiques et différents facteurs peuvent être mis en cause. Certains relèvent du patient : veines fragiles, ponction difficile, prélèvement capillaire ; d'autres du système de prélèvement : calibre des aiguilles, pression négative élevée dans le tube ; du prélèvement : agitation trop vigoureuse des tubes prélevés ; des conditions de transport : pneumatique, température excessive; et des conditions de centrifugation : vitesse trop importante, re-centrifugation des tubes avec gel séparateur (6,7). En termes de prévalence relative, l'hémolyse est de loin la première cause de « non-conformité » de l'échantillon pouvant conduire à de potentielles interférences. (8,9)

Certains laboratoires adoptent des procédures d'exclusion des échantillons hémolysés. Bien que la prévalence des hémolyses intra-vasculaires reste faible, ces méthodes apparaissent risquées notamment si elles sont appliquées de façon systématique, sans distinction et sans connaissance du contexte clinique.

Au CHU de Nantes, sur une période de 2 mois (février et mars 2015), la proportion d'échantillons hémolysés était de 2,6% (1427 cas recensés sur 54 910 prélèvements reçus au laboratoire).

2. Ictère

L'ictère est défini par la coloration jaune-orangée des téguments et des muqueuses due à une accumulation de bilirubine. Ce phénomène qui s'observe également sur le plasma peut résulter de plusieurs mécanismes. L'ictère à bilirubine libre (ou non conjuguée) est principalement dû à l'hémolyse *in vivo* au cours de laquelle la production importante de bilirubine dépasse les capacités de métabolisation hépatique de la bilirubine. Une augmentation de bilirubine libre peut également résulter d'une immaturité enzymatique ou de toute autre atteinte portant sur le mécanisme de conjugaison de la bilirubine. L'augmentation de la bilirubine conjuguée est le plus souvent le résultat d'un ictère cholestatique. Du fait du recrutement de l'hôpital Guillaume et René Laennec, cette situation, fréquente, est celle que nous avons choisi d'étudier au cours de ce travail.

Au CHU de Nantes, nous avons évalué que les prélèvements ictériques représentaient 2,4% de l'ensemble des prélèvements de Biochimie Générale. (1045 cas recensés sur 549 915 prélèvements reçus au laboratoire).

Visuellement l'aspect ictérique d'un plasma est détectable pour une concentration de bilirubine libre d'environ 25 $\mu\text{mol/L}$.(10)

3. Lipémie

La lipémie est un trouble de l'échantillon provoqué par l'accumulation de lipoprotéines.

L'aspect lactescent d'un plasma est l'un des signes pouvant évoquer une hypertriglycéridémie. Cette situation est la conséquence d'une augmentation de la production et/ou d'une diminution du catabolisme de lipoprotéines riches en triglycérides : Very Low-Density Lipoproteins (VLDL) et chylomicrons.

Les principales causes des hypertriglycéridémies sont entre autres, le diabète, l'abus d'alcool, un syndrome métabolique, un syndrome néphrotique, une hypothyroïdie, l'utilisation de la nutrition parentérale ou de certains médicaments parmi lesquels les inhibiteurs de protéases, les estrogènes et les stéroïdes. (11,12) En pratique courante, notamment en biologie de ville, un échantillon lipémique est dans la plupart des cas la conséquence d'un repas réalisé avant la prise de sang.

La fréquence des échantillons lipémiques varie de 0.5 à 2.5% selon les hôpitaux et la proportion de patients hospitalisés ou non.(13) Certaines études évaluent que ces échantillons lipémiques sont à l'origine de 0.5% des erreurs pré-analytiques au laboratoire.(14)

Au CHU de Nantes, les prélèvements lactescents représentent 3,1% de l'ensemble des prélèvements de Biochimie Générale. (1729 cas recensés sur 549 912 prélèvements reçus au laboratoire).

La lipémie peut être détectée visuellement pour une concentration de triglycérides dépassant 3.4 mmol/L.(13)

III. Mécanismes d'interférence

Le processus analytique peut être perturbé par des substances interférentes de différentes manières.

1. Effet pré-analytique

Au sein de l'échantillon, une modification de la concentration d'un analyte préalablement à la phase analytique est communément appelée effet pré-analytique.(2) Bien que cet effet entraîne un résultat biologique discordant de la réalité clinique, il ne s'agit aucunement d'une interférence analytique. Ce phénomène se rencontre dans différentes situations : hydrolyse, oxydation, dénaturation enzymatique *in vitro* ainsi qu'en cas de concentration (évaporation) de l'échantillon et d'hémolyse.

1. Interférences d'apport

L'hémolyse *in vitro* est une anomalie pré-analytique et elle peut engendrer des interférences d'apport. Par un mécanisme de surcharge, la libération du contenu érythrocytaire induit une surestimation de certains paramètres. Cette augmentation est directement proportionnelle à la concentration intra-érythrocytaire de l'analyte en question et à l'importance de l'hémolyse.

2. Interférences chimiques

Une des conséquences de l'effet pré-analytique peut également être l'apparition d'une interférence chimique par exemple lors d'un dosage d'ACTH sur un échantillon ayant subi une hémolyse *in vitro*. Dans cette situation, la libération de protéases érythrocytaires entraîne une dégradation de l'hormone et donc une diminution de sa concentration.

2. Interférences physiques

1. Interférences liées à la modification de la matrice

La substance interférente peut altérer une des propriétés physiques de la matrice telle que la viscosité, la tension de surface, la force ionique ou la turbidité entraînant une modification de la concentration mesurée de l'analyte. Ces phénomènes se rencontrent pour les échantillons lipémiques.

Les interférences dues à la lipémie sont susceptibles d'intervenir dans tous les dosages utilisant des méthodes optiques de détection. Les méthodes spectrophotométriques sont basées sur la mesure de l'absorbance selon la loi de Beer-Lambert. La mesure de l'intensité lumineuse se fait au niveau du détecteur placé sur le trajet optique de la lumière. La diminution d'intensité de la lumière mesurée par le détecteur est directement attribuable à la lumière absorbée par l'échantillon. La présence d'une quantité importante de lipides entraîne un phénomène de diffusion de la lumière dans toutes les directions responsable d'une diminution d'intensité du faisceau détecté.(15)

Les méthodes turbidimétriques et néphélométriques sont également impactées par le phénomène de dispersion de la lumière. L'intensité de la diffusion de la lumière est alors fonction du nombre de particules, de la taille des celles-ci mais aussi de la longueur d'onde de mesure utilisée.(15)

L'hyperlipidémie entraîne également une diminution du volume d'eau plasmatique qui affecte également le dosage de certains électrolytes par méthode potentiométrique indirecte.(16,17)

L'obtention de sérum ou de plasma nécessite une étape de centrifugation. Après la centrifugation, les particules sont distribuées selon leur densité, les chylomicrons et les VLDL, de faible densité, se retrouvent à la surface de l'échantillon. Les autres constituants du plasma se distribuent selon leur polarité : les constituants hydrophobes se distribuent dans la phase lipidique d'où sont absents les analytes solubles dans la phase aqueuse. On constate alors une certaine hétérogénéité de l'échantillon. La prise d'essai qu'elle soit réalisée en surface ou en profondeur peut ainsi potentiellement entraîner une surestimation ou une sous-estimation dans le dosage d'un analyte.(13)

2. Interférences de détection et interférences spectrales

La substance interférente peut également avoir des propriétés similaires à celles de l'analyte en ce qui concerne la fluorescence, la dispersion lumineuse ou la position d'éluion. Dans notre travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux interférences spectrales qui sont liées à l'additivité de la loi de Beer-Lambert, et vont s'observer pour les paramètres dont la mesure finale est spectrophotométrique et réalisée à une longueur d'onde proche des principales longueurs d'onde d'absorption de la substance interférente. Il peut s'agir d'une surestimation ou sous-estimation du paramètre dosé (selon que l'on mesure en cinétique descendante ou ascendante) et dans tous les cas l'interférence spectrale fournit un résultat « erroné ».

(1) Cas de l'hémoglobine

Les principales bandes d'absorption de l'hémoglobine sont situées à 415 nm, 540 nm et 578 nm. L'hémolyse est donc susceptible d'influencer la mesure des paramètres dont la détection se fait par spectrophotométrie autour de ces longueurs d'ondes. De plus la structure de l'hémoglobine peut être modifiée en fonction du milieu réactionnel : pH, présence d'agents oxydants ou réducteurs,

aboutissant à des formes d'hémoglobine dont le spectre d'absorption est différent donc à d'autres potentielles interférences spectrophotométriques.(18)

(2) Cas des échantillons lipémiques

Les lipoprotéines des échantillons lipémiques présentent également la capacité d'absorber la lumière. La quantité de lumière absorbée est alors inversement proportionnelle à la longueur d'onde utilisée et décroît ainsi entre 300 à 700 nm sans aucun pic d'absorption spécifique.(13)

(3) Cas de la bilirubine

La bilirubine absorbe la lumière entre 400 et 520 nm, elle peut donc potentiellement interférer avec tout dosage utilisant ces longueurs d'onde de détection. Les formes conjuguées ou non conjuguées de bilirubine présentent des spectres d'absorption légèrement différents. Aussi certains auteurs témoignent du fait que l'on ne peut prétendre étudier l'interférence de ces 2 formes de bilirubines simplement en réalisant des surcharges avec l'une ou l'autre de ces espèces.(19) Dans cette étude nous concluons donc seulement sur l'interférence de la bilirubine conjuguée.

En milieu réactionnel, la bilirubine peut subir une oxydation modifiant son spectre d'absorption. Le pH du milieu réactionnel influe également sur l'interférence de la bilirubine, en effet à un pH=1 la bilirubine présente un maximum d'absorption à 380 nm alors qu'à pH=7, celui-ci se situe à 440 nm. (20)

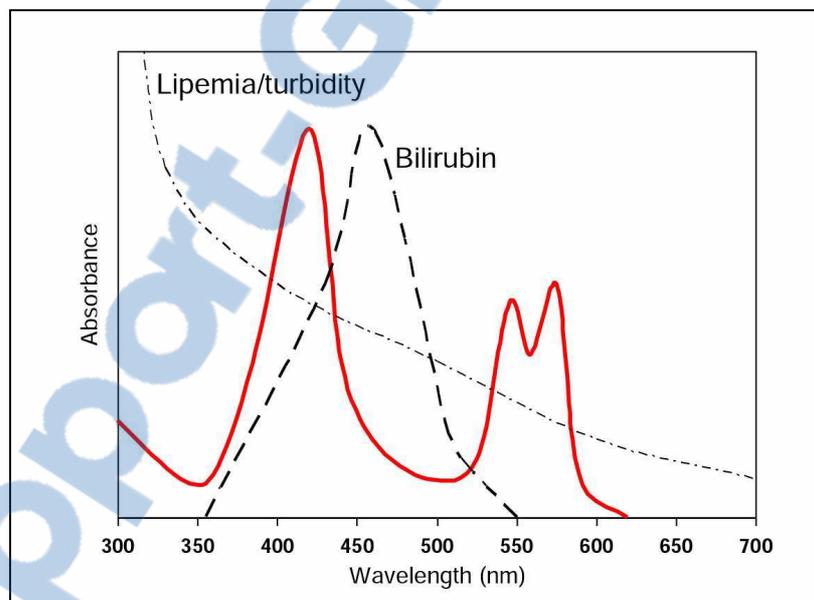


Figure 2 : Spectre d'absorption de l'hémoglobine (en rouge), de la lipémie et la bilirubine

Dolci, A et Al, Clinical Chimica Acta, 2014(21)

3. Interférences chimiques

Les interférences chimiques sont liées aux perturbations induites par la substance interférente lors de la réaction chimique ou enzymatique utilisée pour le dosage du paramètre. Là encore il peut donc s'agir de surestimation ou de sous-estimation et le résultat fourni est erroné dans le sens où il ne correspond pas à la réalité.

Les interférences chimiques sont nombreuses, la substance interférente peut ainsi inhiber une réaction par compétition, complexation ou précipitation d'un réactif ou d'un produit de réaction. La substance interférente peut également altérer l'activité d'une enzyme (analyte ou réactif) ou du fait de la non spécificité d'une réaction, agir de la même manière que l'analyte en établissant une réaction croisée.

(1) Cas de l'hémolyse

Les perturbations induites par l'hémoglobine ou tout autre composant érythrocytaire (protéines structurales, lipides, enzymes, carbohydrates) lors de la réaction chimique ou enzymatique utilisée pour le dosage du paramètre répondent à cette définition. À titre d'exemple on peut citer l'interférence lors du dosage de la créatine kinase par libération d'adénylate kinase.(4)

L'interférence de l'hémolyse sur les dosages immunochimiques est beaucoup moins fréquente que pour les dosages spectrophotométriques. Il peut toutefois exister des interférences liées à une éventuelle surcharge ou liées à la réactivité croisée des anticorps utilisés vis-à-vis de protéines érythrocytaires.(22,23)

(2) Cas de la bilirubine

La bilirubine peut réagir chimiquement avec les composants du milieu réactionnel notamment du fait de son caractère facilement oxydable. Ce phénomène se retrouve notamment dans tous les dosages mettant en jeu la réaction de Trinder.(20,24) Par contre, l'interférence de l'ictère sur les dosages immuno-chimiques est négligeable.(25)

IV. Détermination des indices sériques

Désormais la majorité des automates sont dotés d'outils permettant d'évaluer les indices sériques d'hémolyse, d'ictère et de lipémie des échantillons. La détermination systématique et automatisée des indices sériques consiste en une évaluation objective de la qualité des échantillons. La détection en temps réel des échantillons « critiques » en parallèle au dosage des analytes permet une optimisation de la phase analytique avec un délai court de rendu des résultats.(21)



Figure 3 : Exemples d'échantillons hémolysés

Parallèlement à la détermination de ces indices, les fournisseurs dispensent les informations issues de leurs études d'interférences. Les indices limites d'hémolyse, de lipémie et d'ictère sont définis pour un paramètre, comme les plus hautes concentrations en hémoglobine, en Intralipid® ou en bilirubine pouvant être ajoutées à un échantillon plasmatique limpide sans en modifier le résultat du paramètre mesuré. Ces indices sont définis pour une seule valeur (le plus souvent normale) du paramètre considéré.

Les indices sériques déterminés sur l'échantillon sont analysés par le middleware dans lequel sont enregistrés les indices limites pour chaque test ainsi que les règles et actions à mettre en œuvre en cas de franchissement d'un seuil. Lorsque l'indice sérique est supérieur à l'indice limite pour la mesure d'un paramètre, l'interférence est définie comme significative, et selon les critères du laboratoire le résultat est assorti d'une alerte, d'un commentaire voire non rendu.(26) La transmission de ces résultats au Système Informatique du Laboratoire permet un double archivage et l'analyse a posteriori de ces données.

V. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude est de définir les paramètres impactés par l'hémolyse, par la lipémie ou par l'ictère pour des concentrations de substances interférentes égales ou supérieures à celles utilisées par le fournisseur et sur différents niveaux de concentration du paramètre.

A l'issu de ce travail, nous pourrons fournir le sens de l'interférence potentielle, son importance et à partir de quel indice elle apparaît, ceci sur plusieurs niveaux de concentrations du paramètre.

Matériels et Méthodes

I. Constitution des pools de plasma

Les pools plasmatiques sont constitués à partir des reliquats d'échantillons de patients reçus au laboratoire. Le plasma est recueilli après la réalisation des analyses ; les échantillons visiblement hémolysés, ictériques ou lactescents ou ayant présentés des indices sériques élevés sont exclus.

Les pools pathologiques sont des mélanges de plasmas dont un ou plusieurs résultats biochimiques sont en dehors des valeurs usuelles.

La constitution des pools plasmatiques a été réalisée sur la période du 8 mars au 5 avril 2014 pour l'étude de l'interférence de l'hémolyse et sur la période du 10 décembre 2014 au 31 janvier 2015 pour l'étude de l'interférence de la lipémie et de l'ictère.

II. Surcharge des échantillons plasmatiques

1. Préparation de l'hémolysat

L'hémolysat est réalisé à partir d'échantillons de sang total prélevés sur héparinate de sodium. Ces échantillons sanguins effectués sur des volontaires sains sont centrifugés à 2500 g pendant 10 minutes. Les globules rouges obtenus après élimination du plasma et du Buffy coat des différents prélèvements sont poolés. Trois lavages volume à volume sont réalisés avec du sérum physiologique. Les globules rouges sont ensuite lysés par addition d'eau distillée volume à volume, une centrifugation à 4 000g pendant 10 minutes permet d'éliminer les débris cellulaires. L'hémoglobine est mesurée sur l'hémolysat en utilisant l'appareil Sysmex® XE-2100D, (Sysmex corporation Villepinte, France) ; l'hémolysat est ensuite conservé à -20°C jusqu'à utilisation. Après décongélation, l'hémolysat est centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes.

On réalise sur des dilutions de cet hémolysat, une étude de corrélation et de linéarité entre la concentration de l'hémoglobine et l'indice d'hémolyse rendu par le Cobas 6000®. Sur ces mêmes dilutions, on mesure également les activités Aspartate amino transférase (ASAT) et Lactate déshydrogénase (LDH) permettant d'objectiver l'évolution de ces 2 activités en fonction de la concentration en hémolysat (Figure 4).

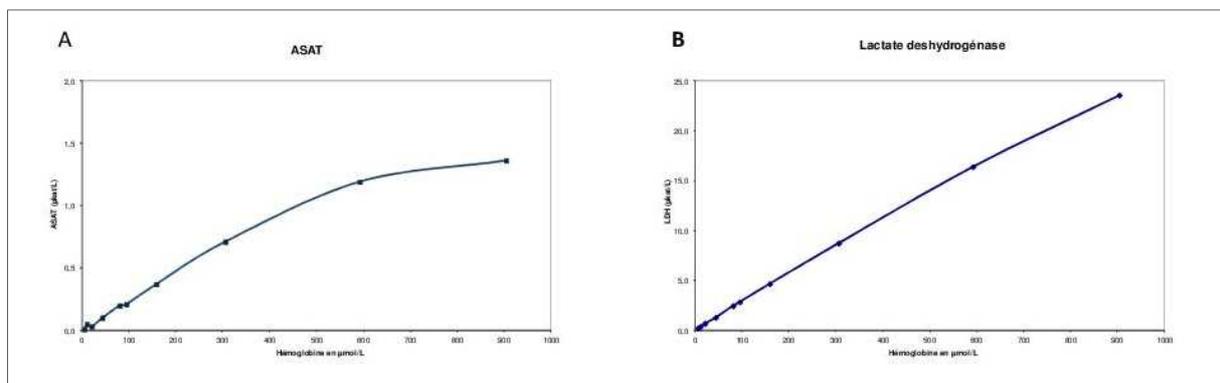


Figure 4 : Évolution des activités ASAT et LDH en fonction de la concentration en hémolysat.

2. Surcharge en hémoglobine des échantillons plasmatiques

La méthode de surcharge en hémoglobine consiste à réaliser à partir de l'hémolysat décongelé une gamme de concentration en hémoglobine variant de 0 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$ soit de 0 à 32.2 g/L. Chaque point de cette gamme de concentration en hémoglobine est additionné volume à volume à des plasmas de concentration variable pour chacun des paramètres étudiés. Un témoin servant de valeur de référence est réalisé en additionnant de la même façon volume à volume du sérum physiologique à chacun des plasmas analysés. Sur chacun des échantillons ainsi préparés (avec sérum physiologique et concentrations variables d'hémoglobine), la mesure des paramètres biochimiques est réalisée.

3. Surcharge en Intralipid® des échantillons plasmatiques

La méthode de surcharge en Intralipid® consiste à réaliser à partir d'une solution d'Intralipid® 20% une gamme de concentration variant de 0 à 2500 mg/dL d'Intralipid®. L'indice de lipémie est déterminé sur les échantillons de la gamme d'Intralipid®. L'indice de lipémie L exprimé sans unité correspond à une concentration d'Intralipid en mg/dL. Chaque concentration de cette gamme est ajoutée volume à volume à des plasmas de concentration variable pour chacun des paramètres étudiés. Un témoin servant de valeur de référence est réalisé en additionnant de la même façon volume à volume du sérum physiologique à chacun des plasmas analysés. Sur chacun des différents échantillons ainsi préparés (avec sérum physiologique et concentrations variables d'Intralipid®) la mesure des paramètres biochimiques est réalisée.

4. Surcharge en bilirubine des échantillons plasmatiques

La méthode de surcharge en bilirubine consiste à réaliser à partir d'une solution de ditaurate de bilirubine (0.01M, Sigma Aldrich) une gamme de concentration de 50 à 1600 $\mu\text{mol/L}$ de ditaurate de bilirubine. Les indices d'ictère sont mesurés sur la gamme. L'indice d'ictère I exprimé sans unité correspond à une concentration de bilirubine conjuguée en $\mu\text{mol/L}$. Chaque concentration de cette gamme est ajoutée volume à volume à des plasmas de concentration variable pour chacun des paramètres étudiés. Un témoin servant de valeur de référence est réalisé en additionnant de la même façon volume à volume du sérum physiologique à chacun des plasmas analysés. Sur chacun des différents échantillons ainsi préparés (avec sérum physiologique et concentrations variables de ditaurate de bilirubine) la mesure des paramètres biochimiques est réalisée.

III. Instrumentation

L'appareil utilisé est le Cobas 6000 analyseur : module C501 et E 601 (Roche Diagnostics®, Meylan, France).

1. Techniques de dosage

Les paramètres ont été mesurés selon les techniques et réactifs dédiés dans les mêmes conditions que des échantillons de patients. Les coefficients de variation de chaque paramètre déterminés à partir des contrôles interne de qualité (CIQ) et l'incertitude de mesure déterminée à partir de l'externalisation des CIQ sont indiqués dans les tableaux 1 et 2.

2. Paramètres étudiés

1. Interférence de l'hémolyse

L'interférence de l'hémolyse a été étudiée sur les paramètres suivants: Alanine amino transférase (ALAT), albumine (ALB), Aspartate amino transférase (ASAT), acide urique (AUR), Calcium (CA), Créatine Kinase (CK), créatinine (CRE), protéine C réactive (CRP), cholestérol total (CT), Gamma glutamyl transférase (GGT), Glucose (GLU), Lactico déshydrogénase (LDH), lipase (LIP), myoglobine (Mb), magnésium (Mg), Fragment N terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B (NT-Pro BNP), Phosphore (P), Phosphatases alcalines (PAL), protéines totales (PT), protéine S100 beta (S100), triglycérides (TG), troponine T cardiaque hypersensible (TNT) urée (UR). Cette interférence a été étudiée soit sur une seule valeur (CK, LDH, Mb, Mg, P) soit sur deux valeurs (ALAT, ALB, AUR, CA, CRE, CRP, CT, GGT, NT-Pro BNP, PT, TG, TNT, UR, ou sur 3 valeurs ou plus (ASAT, LIP, PAL, S100). (Tableau 1)

2. Interférence de la lipémie

L'interférence de la lipémie a été étudiée sur les paramètres suivants: Alanine amino transférase (ALAT), albumine (ALB), Aspartate amino transférase (ASAT), acide urique (AUR), Calcium (CA), Créatine Kinase (CK), créatinine (CRE), protéine C réactive (CRP), Cholestérol Total (CT), Gamma glutamyl transférase (GGT), Glucose (GLU), HDL-Cholestérol (HDL-C), Lactico déshydrogénase (LDH), lipase (LIP), myoglobine (Mb), magnésium (Mg), Fragment N terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B (NT-ProBNP), Phosphore (P), Phosphatases alcalines (PAL), protéines totales (PT), protéine S100 beta (S100), troponine T cardiaque hypersensible (TNT), urée (UR). Cette interférence a été étudiée sur deux valeurs différentes sauf pour le magnésium (1 seule valeur), le phosphore (1 seule valeur) et le NT-ProBNP (3 valeurs). (Tableau 2)

3. Interférence de l'ictère

L'interférence de la bilirubine conjuguée a été étudiée sur les paramètres suivants: Alanine amino transférase (ALAT), albumine (ALB), Aspartate amino transférase (ASAT), acide urique (AUR), Calcium (CA), Créatine Kinase (CK), créatinine (CRE), protéine C réactive (CRP), Cholestérol Total (CT), Gamma glutamyl transférase (GGT), Glucose (GLU), HDL-Cholestérol (HDL-C), Lactico déshydrogénase (LDH), lipase (LIP), myoglobine (Mb), Fragment N terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B (NT-ProBNP), Phosphatases alcalines (PAL), protéines totales (PT), triglycérides (TG), troponine T cardiaque hypersensible (TNT), urée (UR). Cette interférence a été étudiée sur deux valeurs différentes pour chaque paramètre. (Tableau 2)

Paramètre	Principe de dosage	Méthode	Longueur d'onde de mesure	Domaine de linéarité	CV reproductibilité (%)	Incertitude de mesure (%)	
ALAT	Alanine aminotransférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0.08-11.7 μ kat/L	4.4	8.9
ALB	Albumine	Méthode Colorimétrique	Vert de bromocrésol	570 nm	2-60 g/L	3.1	ND
ASAT	Aspartate aminotransférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0.08-11.7 μ kat/L	2.2	6.2
AUR	Acide urique	Méthode enzymatique	Uricase -POD- Chromogène	546 nm	11.9-1487 μ mol/L	1.8	6.1
CA	Calcium	Méthode Colorimétrique	NM-BAPTA	340 nm	0.20-5 mmol/L	1.8	3.7
CK	Créatine Kinase	Méthode enzymatique	IFCC - NAC activé	340 nm	0.12-33.4 μ kat/L	1.7	5.1
CRE	Creatinine	Méthode Colorimétrique	Jaffé cinétique compensée	505 nm	15-2200 μ mol/L	4.0	9.3
CRP	Protéine C réactive	Immunoturbidimétrie	Particules de latex recouverts d'Ac murin anti-CRP	570 nm	0.3-350 mg/L	3.8	8.1
CT	Cholestérol total	Méthode enzymatique	Cholestérol estérase, cholestérol oxydase - POD-chromogène	505 nm	0.1-20.7 mmol/L	3.2	8.8
GGT	Gamma glutamyl transférase	Méthode enzymatique	SZASS	415 nm	0.05-20.0 μ kat/L	1.8	6.0
GLU	Glucose	Méthode enzymatique	Hexokinase ; Glucose-6-phosphate déshydrogénase	340 nm	0.11-41.6 mmol/L	1.7	4.9
LDH	Lactico déshydrogénase	Méthode enzymatique	IFCC (lactate \rightarrow pyruvate)	340 nm	0.17-16.7 μ kat/L	2.8	6.9
LIP	Lipase	Méthode enzymatique	Ester de 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-acide glutarique	570 nm	0.05-5.01 μ kat/L	2.7	8.2
Mb	Myoglobine	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	21-3000 μ g/L	5.3	10.2
Mg	Magnésium	Méthode Colorimétrique	Bleu de xylydyle	600 nm	0.10-2.0 mmol/L	2.7	4.4
NT-pro BNP	Fragment N-Terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	5-35000 pg/mL	8.3	9.0
P	Phosphore	Méthode Colorimétrique	Molybdate d'ammonium	340 nm	0.10-6.46 mmol/L	2.8	6.3
PAL	Phosphatases alcalines	Méthode enzymatique	IFCC avec tampon aminométhyl propanol	450 nm	0.084-20.0 μ kat/L	3.7	7.3
PT	Protéines totales	Méthode Colorimétrique	Biuret avec iodure de potassium	546 nm	2.0-120 g/L	1.7	4.3
S100	Protéine S100 bêta	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	0.05-39 μ g/L	5.9	ND
TG	Triglycérides	Méthode enzymatique	LPL, glycérokinase, GPO-POD-chromogène	505 nm	0.1-10.0 mmol/L	2.9	6.5
TNT hs	TNT hs	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	3-10000 ng/L	4.8	13.0
UR	Urée	Méthode enzymatique	Uréase	340 nm	0.5-40 mmol/L	2.2	5.4

Tableau 1 : Paramètres et caractéristiques des méthodes de dosage étudiées pour l'influence de l'hémolyse

Paramètre	Principe de dosage	Méthode	Longueur d'onde de mesure	Domaine de linéarité	CV reproductibilité (%)	Incertitude de mesure (%)	
ALAT	Alanine aminotransférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0.08-11.7 μ kat/L	4.0	8.8
ALB	Albumine	Méthode Colorimétrique	Vert de bromocrésol	570 nm	2-60 g/L	3.0	ND
ASAT	Aspartate aminotransférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0.08-11.7 μ kat/L	2.0	6.2
AUR	Acide urique	Méthode enzymatique	Uricase -POD- Chromogène	546 nm	11.9-1487 μ mol/L	2.1	6.1
CA	Calcium	Méthode Colorimétrique	NM-BAPTA	340 nm	0.20-5 mmol/L	2.3	3.7
CK	Créatine Kinase	Méthode enzymatique	IFCC - NAC activé	340 nm	0.12-33.4 μ kat/L	1.9	5.1
CRE	Creatinine	Méthode Colorimétrique	Jaffé cinétique compensée	505 nm	15-2200 μ mol/L	4.7	9.3
CRP	Protéine C réactive	Immunoturbidimétrie	Particules de latex recouverts d'Ac murin anti-CRP	570 nm	0.3-350 mg/L	5.1	8.1
CT	Cholestérol total	Méthode enzymatique	Cholestérol estérase, cholestérol oxydase - POD-chromogène	505 nm	0.1-20.7 mmol/L	3.6	8.8
GGT	Gamma glutamyl transférase	Méthode enzymatique	SZASS	415 nm	0.05-20.0 μ kat/L	6.3	6.0
GLU	Glucose	Méthode enzymatique	Hexokinase ; Glucose-6-phosphate déshydrogénase	340 nm	0.11-41.6 mmol/L	1.7	4.9
HDL-C	HDL-Cholestérol	Méthode enzymatique	PEG Cholestérol estérase, PEG cholestérol oxydase - POD-chromogène	600 nm	0.08-3.12 mmol/L	5.9	6.5
LDH	Lactico déshydrogénase	Méthode enzymatique	IFCC (lactate \rightarrow pyruvate)	340 nm	0.17-16.7 μ kat/L	2.3	6.9
LIP	Lipase	Méthode enzymatique	Ester de 1,2-O-dilauryl-rac-glycéro-3-acide glutarique	570 nm	0.05-5.01 μ kat/L	4.5	8.2
Mb	Myoglobine	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	21-3000 μ g/L	6.5	10.3
Mg	Magnésium	Méthode Colorimétrique	Bleu de xylidyle	600 nm	0.10-2.0 mmol/L	2.7	4.4
NT-pro BNP	Fragment N-Terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	5-35000 pg/mL	4.1	9.0
P	Phosphore	Méthode Colorimétrique	Molybdate d'ammonium	340 nm	0.10-6.46 mmol/L	3.3	6.3
PAL	Phosphatases alcalines	Méthode enzymatique	IFCC avec tampon aminométhyl propanol	450 nm	0.084-20.0 μ kat/L	5.1	7.3
PT	Protéines totales	Méthode Colorimétrique	Biuret avec iodure de potassium	546 nm	2.0-120 g/L	1.6	4.3
S100	Protéine S100 bêta	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	0.05-39 μ g/L	ND	ND
TG	Triglycérides	Méthode enzymatique	LPL, glycérokinase, GPO-POD-chromogène	505 nm	0.1-10.0 mmol/L	3.7	6.5
TNT hs	TNT hs	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	3-10000 ng/L	12.3	13.0
UR	Urée	Méthode enzymatique	Uréase	340 nm	0.5-40 mmol/L	2.5	5.3

Tableau 2 : Paramètres et caractéristiques des méthodes de dosage étudiées pour l'influence de la lipémie et de l'ictère

3. Mesure des indices sériques

Sur chaque échantillon la mesure de l'indice sérique d'hémolyse, de lipémie et d'ictère est réalisée par l'automate selon la technique décrite par le fabricant. L'analyseur prélève un aliquot de l'échantillon patient (6 μ L), le plasma est dilué dans 150 μ L de NaCl 0.9% puis l'analyseur effectue des mesures d'absorbance à 3 paires de longueurs d'onde.

Pour l'indice d'hémolyse (H), l'absorbance est mesurée à 570 nm (longueur d'onde principale) et 700 nm (longueur d'onde secondaire) et une correction est effectuée pour l'absorption en raison de la lipémie qui impacte la mesure à ces longueurs d'onde.

Pour l'indice de lipémie (L), l'absorbance est mesurée à 660 nm (longueur d'onde principale) et 700 nm (longueur d'onde secondaire). Aucune correction n'est effectuée puisque que sur cette plage de longueur d'onde, ni l'hémolyse ni l'ictère ne perturbent la mesure.

Pour l'indice d'ictère, l'absorbance est mesurée à 480 nm (longueur d'onde principale) et 505 nm (longueur d'onde secondaire). Une correction est effectuée pour limiter l'impact que peuvent engendrer l'hémolyse et la lipémie à ces longueurs

Les formules de calcul utilisées mettent en jeu des facteurs de conversion (ou facteurs d'échelles : A, C et D) ainsi que des facteurs de correction (B, E et F). On obtient au final un résultat d'indice d'hémolyse (H), de lipémie (L) ou un indice d'ictère (I) affiché sur l'automate correspondant approximativement et respectivement à une concentration d'hémoglobine en $\mu\text{mol/L}$, à une concentration d'Intralipid® en mg/dL ou à une concentration de bilirubine en $\mu\text{mol/L}$. A noter que selon les programmations, les indices peuvent être également rendus dans des unités conventionnelles correspondant à des concentrations en mg/dL d'hémoglobine pour l'indice d'hémolyse, des mg/dL de solution d'Intralipid® pour l'indice de lipémie et des mg/dL de bilirubine conjuguée pour l'indice d'ictère.

<i>Calcul des indices sériques</i>	Afin d'obtenir les indices sériques L, H et I des absorbances de l'échantillon, le système utilise les formules suivantes :
Équation B-20	$L = \frac{1}{C} \cdot (Abs_1)$
Équation B-21	$H = \frac{1}{A} \cdot (Abs_2 - B \cdot Abs_1)$
Équation B-22	$I = \frac{1}{D} \cdot (Abs_3 - E \cdot Abs_2 - F \cdot Abs_1)$
<i>L, H, I</i>	Indices sériques pour lipémie, hémolyse et ictère
<i>C, A, D</i>	Facteurs de conversion des valeurs d'absorbance ($\times 10^4$) en indices sériques
<i>Abs₁</i>	Lectures d'absorbance bichromatique à des longueurs d'ondes de 700 et 660 nm pour la lipémie
<i>Abs₂</i>	Lectures d'absorbance bichromatique à des longueurs d'ondes de 600 et 570 nm pour l'hémolyse
<i>Abs₃</i>	Lectures d'absorbance bichromatique à des longueurs d'ondes de 505 et 480 nm pour l'ictère
<i>B</i>	Corrige la mesure d'hémoglobine <i>Abs₂</i> pour la lipémie
<i>E, F</i>	Corrigent la mesure de bilirubine <i>Abs₃</i> pour l'hémoglobine et pour la lipémie

Figure 5 : Formules de calcul utilisées pour la détermination des indices sériques

Les limites de linéarité pour ces indices sériques H, I et L sont respectivement de 745 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobine, de 1026 $\mu\text{mol/L}$ de bilirubine et de 2000 mg/dL d'Intralipid®. (A noter que ces valeurs ont été confirmées voire étendues lors de nos études de corrélation.)

4. Principe de dilution automatique

Lorsque la concentration d'un analyte est trop importante ou lorsqu'un échantillon est très lipémique, la valeur d'absorbance maximale utilisée par le Cobas® pour le calcul de concentration est parfois dépassée. Un nouveau dosage sur une dilution de l'échantillon conforme aux recommandations des fournisseurs est alors déclenché automatiquement.

IV. Présentation des résultats - Statistiques

Nous avons calculé pour chacun des paramètres le rapport de concentration Y/X . Il est défini comme étant le rapport de la concentration mesurée [plasma + gamme d'hémolysat] ou [plasma + gamme d'Intralipid®] ou [plasma + gamme de bilirubine] (Y) / concentration mesurée [plasma + NaCl] (X). Ce rapport figure en ordonnée sur les graphiques présentés. Le seuil de 10% de variation par rapport à la valeur vraie définissant une interférence sur la mesure, a été choisi. Notre critère d'acceptabilité est représenté sur le graphique par les barres horizontales (plus ou moins 10% soit Y/X compris entre 0.9 et 1.1).

Rapport-Gratuit.com

Résultats

I. Corrélation

Pour chaque interférence explorée, nous avons étudié la corrélation entre les indices mesurés sur le Cobas[®] et les concentrations en substance de surcharge : hémoglobine, Intralipid[®] ou ditaurate de bilirubine.

1. Hémolyse

La corrélation entre l'indice d'hémolyse et la concentration en hémoglobine exprimée en $\mu\text{mol/L}$ fournit une droite de pente (a) = 0.8952 et d'ordonnée à l'origine (b) = 21.06 avec un coefficient de corrélation (r) = 0.999 (Figure 6). On justifie ainsi l'utilisation de l'indice d'hémolyse H exprimé sans unité pour le rendu de nos résultats. Il correspond à une concentration d'hémoglobine en $\mu\text{mol/L}$.

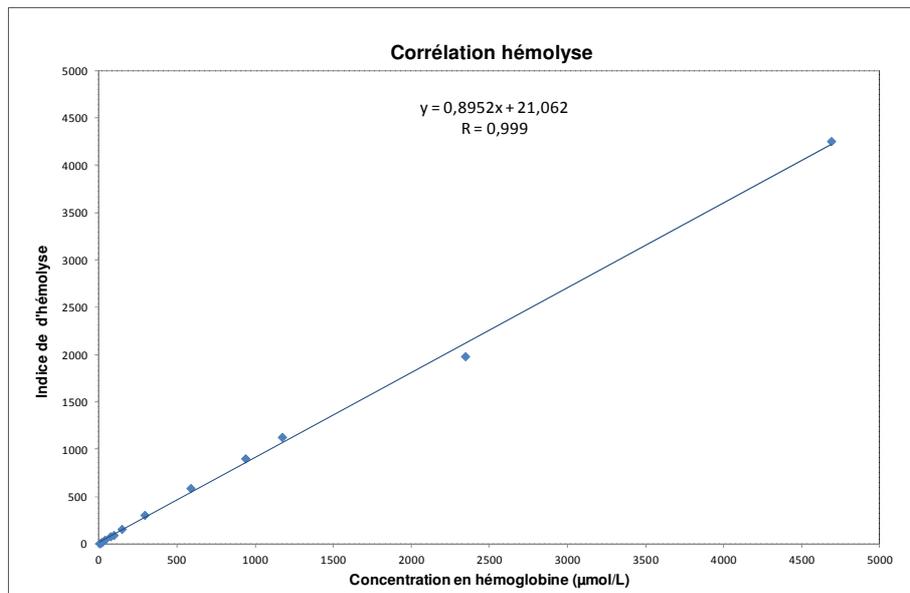


Figure 6 : Corrélation entre la concentration en hémoglobine et l'indice d'hémolyse
En abscisse la concentration en hémoglobine en $\mu\text{mol/L}$, en ordonnée l'indice d'hémolyse

2. Lipémie

La corrélation entre l'indice de lipémie et la concentration en Intralipid[®] exprimée en mg/dL fournit une droite de pente (a) = 0.966 et d'ordonnée à l'origine (b) = -41.00 avec un coefficient de corrélation (r) = 0.998 (Figure 7). On justifie ainsi l'utilisation de l'indice de lipémie L exprimé sans unité pour le rendu de nos résultats. Il correspond à une concentration d'Intralipid[®] en mg/dL.



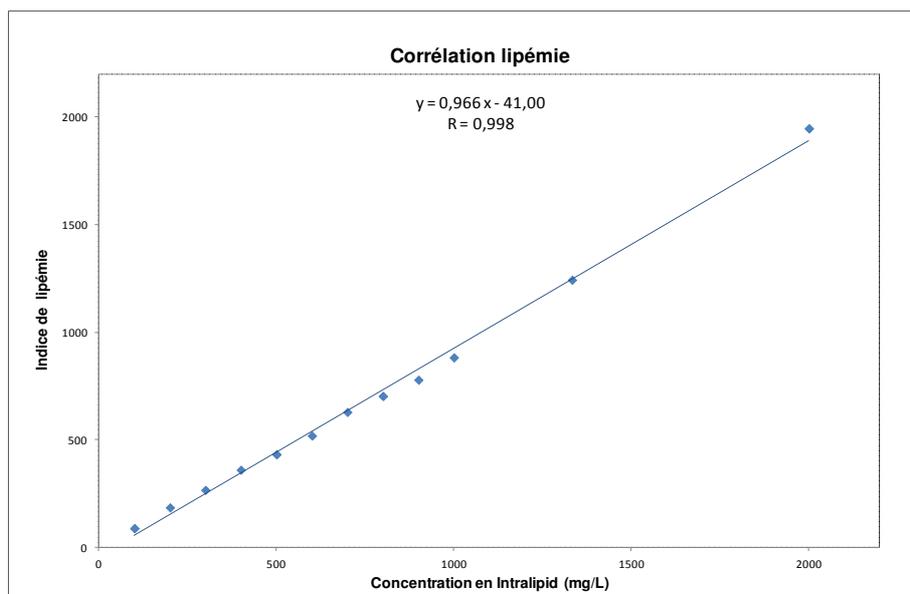


Figure 7 : Corrélation entre la concentration en Intralipid® et l'indice de lipémie
 En abscisse la concentration d'Intralipid® en mg/dL, en ordonnée l'indice de lipémie

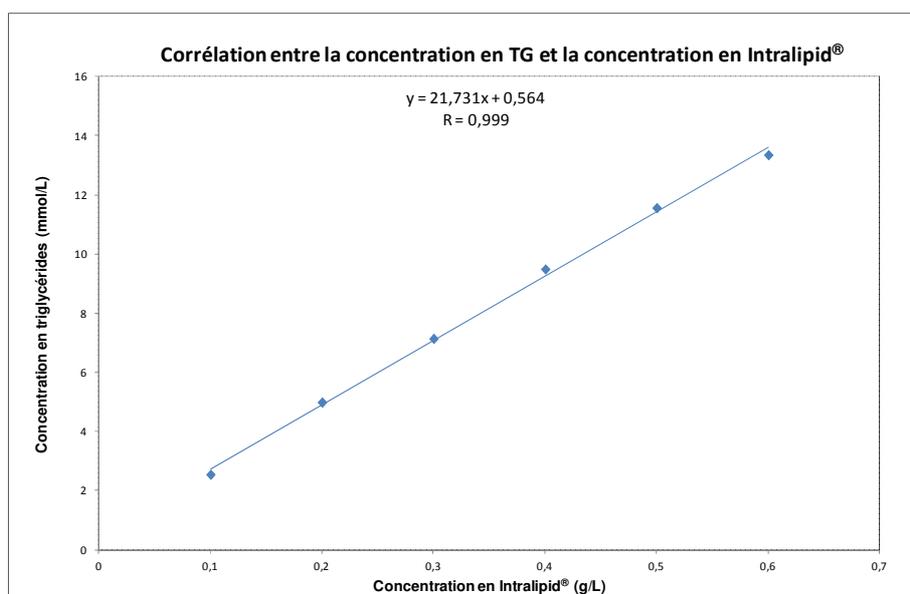


Figure 8 : Corrélation entre la concentration en Intralipid® et la concentration en triglycérides
 En abscisse la concentration d'Intralipid® en mg/dL, en ordonnée la concentration mesurée de triglycérides en mmol/L

3. Ictère

Nous avons étudié la corrélation entre l'indice d'ictère et la concentration en ditaurate de bilirubine exprimée en $\mu\text{mol/L}$. La corrélation fournit une droite de pente (a) = 0,989 et d'ordonnée à l'origine (b) = 37,58 avec pour coefficient de corrélation (r) = 0.996 (Figure 9). On justifie ainsi l'utilisation de l'indice d'ictère I exprimé sans unité pour le rendu de nos résultats. Il correspond à une concentration de bilirubine conjuguée en $\mu\text{mol/L}$.

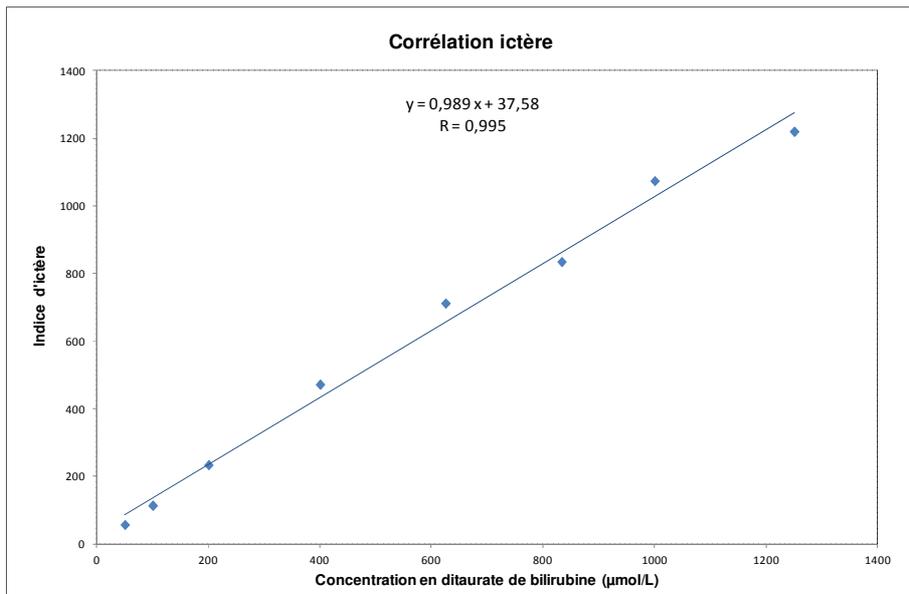


Figure 9 : Corrélation entre la concentration de ditaurate de bilirubine et l'indice d'ictère
En abscisse, la concentration de bilirubine conjuguée, en ordonnée l'indice d'ictère

II. Alanine Amino-Transférase

1) Hémolyse

La mesure de l'activité ALAT est impactée par l'hémolyse. Pour une valeur normale d'ALAT (0.34 μkat) l'hémolyse interfère de façon positive pour une concentration en hémoglobine comprise entre 50 $\mu\text{mol/L}$ (0.8 g/L) et 750 $\mu\text{mol/L}$ (12.1 g/L). Au-delà de 750 $\mu\text{mol/L}$ (12.1 g/L), l'interférence devient négative. Pour une activité ALAT élevée (3 $\mu\text{kat/L}$), on observe uniquement une interférence négative qui apparaît pour des concentrations en hémoglobine élevées de l'ordre de 500 $\mu\text{mol/L}$ (8.1 g/L), cette interférence est proportionnelle à l'importance de l'hémolyse. (Figure 10-A)

Lorsque l'hémolyse de l'échantillon est importante, la valeur de densité optique mesurée et utilisée pour le calcul de l'activité ASAT est dépassée. Une alarme concernant l'absorbance se déclenche entraînant une dilution automatique de l'échantillon au $1/10^{\text{ème}}$ par le Cobas®. Cette dilution n'apporte aucune solution vis-à-vis des résultats pour une valeur d'activité ALAT normale. Par contre, pour une valeur élevée, le résultat après dilution est correct et ce jusqu'à une concentration d'hémoglobine de 1450 $\mu\text{mol/L}$. (Figure 10-B)

2) Lipémie

La mesure de l'activité ALAT est impactée par la lipémie. Pour une valeur normale d'ALAT (0.26 $\mu\text{kat/L}$) la lipémie interfère de façon négative dès un indice de lipémie de 139. Pour une valeur ALAT élevée (3.37 $\mu\text{kat/L}$), l'interférence négative apparaît pour un indice de lipémie de 261. (Figure 10-C)

Comme pour l'interférence de l'hémoglobine, une dilution automatique au $1/10^{\text{ème}}$ est effectuée sur les échantillons présentant une absorbance trop importante. Celle-ci ne permet pas d'obtenir un rendu satisfaisant pour une faible valeur d'activité ALAT. Elle est par contre efficace pour s'affranchir de l'interférence de la lipémie pour une valeur d'ALAT élevée. (Figure 10-D)

3) Ictère

La mesure de l'activité ALAT n'est pas impactée par la bilirubine conjuguée. Pour une valeur normale d'ALAT (0.23 $\mu\text{kat/L}$) la bilirubine conjuguée n'interfère de façon négative qu'à partir d'un indice d'ictère proche de 800. (Figure 10-E)

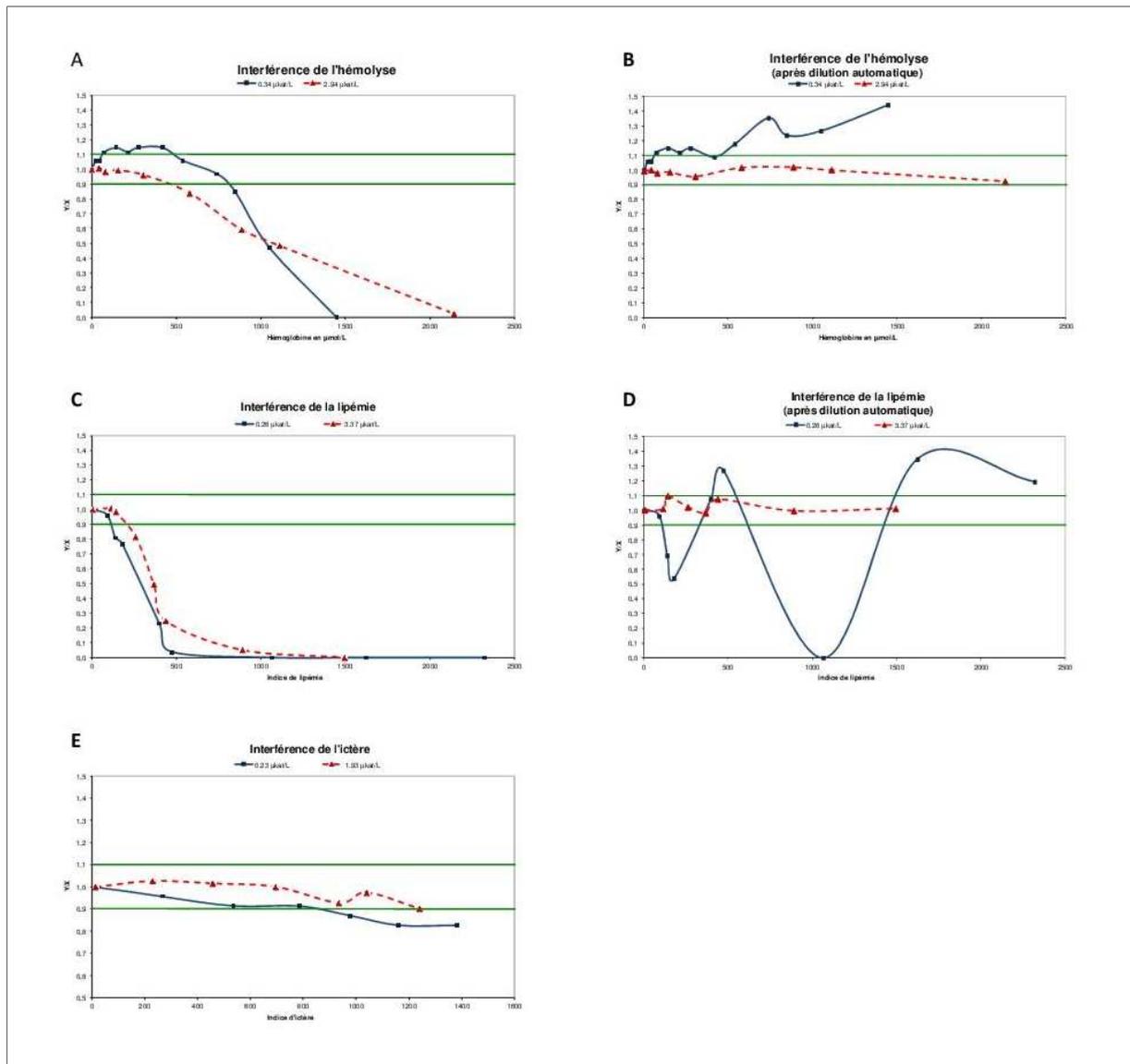


Figure 10 : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'alanine amino-transférase (ALAT)
 Surcharge en hémoglobine sans dilution (A) puis après dilution automatique(B). Surcharge en Intralipid® sans dilution (C) puis après dilution automatique (D). Surcharge en ditaurate de bilirubine (E).

ALAT	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (<0.34 µkat/L)	Surestimation puis sous estimation non corrigée par la dilution au 1/10 ^{ème}	Sous estimation non corrigée par la dilution au 1/10 ^{ème}	Absence d'interférence
Valeurs élevées (>1.93 µkat/L)	Sous estimation corrigée par la dilution au 1/10 ^{ème}	Sous estimation corrigée par la dilution au 1/10 ^{ème}	Absence d'interférence

Tableau 3 : Interférences observées sur le dosage de l'ALAT

4) *Hémolyse*

L'interférence positive de l'hémolyse observée sur le dosage de l'activité ALAT est principalement due à un effet pré-analytique. Cette enzyme de concentration intra-érythrocytaire 7 fois supérieure à la concentration sérique est relarguée lors de la lyse des globules rouges. Il s'agit donc d'une interférence d'apport. L'interférence est ainsi positive pour des concentrations d'hémoglobine inférieures à 400 µmol/L. C'est cette interférence positive qui est signalée dans la documentation fournisseur.

Pour des concentrations d'hémoglobine supérieures à 400 µmol/L, l'interférence négative semble relever principalement de l'interférence physique. Elle serait due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'addition d'hémolysat. Cette interférence n'est pas corrigée par la dilution automatique pour une valeur normale d'activité ALAT alors qu'elle l'est pour une valeur élevée d'activité ALAT.

Les indices limites obtenus dans notre étude sont globalement plus faibles que les indices limites indiqués dans les fiches techniques fournisseurs.

5) *Lipémie*

L'interférence observée avec la surcharge en Intralipid® semble relever principalement de l'interférence physique. Elle est négative et semble être due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'ajout d'Intralipid®. Etrangement, cette interférence n'est pas corrigée par la dilution automatique pour une valeur normale d'activité ALAT alors qu'elle l'est pour une valeur élevée d'activité ALAT.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont légèrement inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur.

III. Albumine

1) Hémolyse

Aucune interférence de l'hémolyse (étudiée de 0 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$ soit de 0 à 32,2 g/L) n'est observée sur la mesure de l'albumine tant pour une valeur normale que pour une valeur basse (40 et 21 g/L). (Figure 11-A)

2) Lipémie

La lipémie interfère de façon négative sur la mesure de l'albumine. Pour une valeur d'albumine faible à 16 g/L, une interférence négative apparaît pour un indice de lipémie de 375. Pour une albuminémie normale à 37 g/L, l'interférence négative est également constatée cependant elle n'apparaît que pour un indice de lipémie de 600. (Figure 11-B)

3) Ictère

Aucune interférence de la bilirubine conjuguée n'est observée sur la mesure de l'albumine pour les valeurs d'albumine de 25 et 38 g/L. (Figure 11-C)

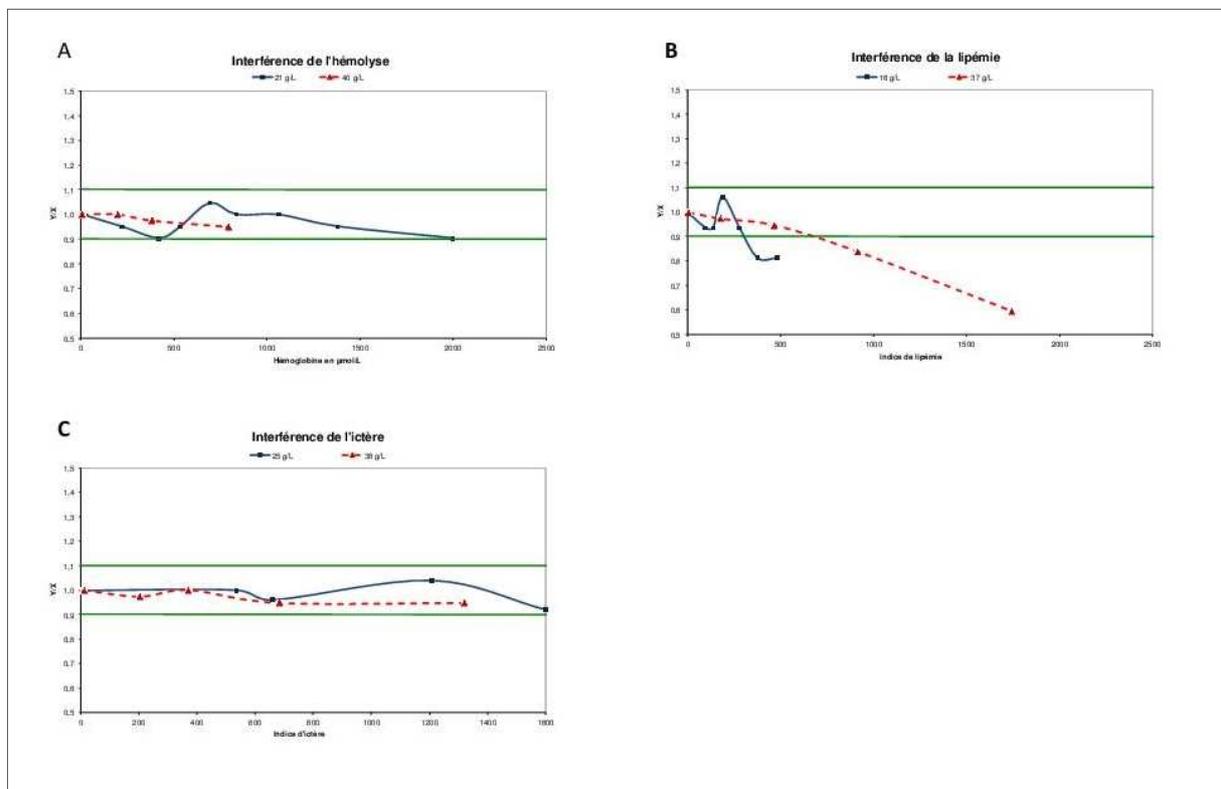


Figure 11 : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'albumine
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

Albumine	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (<25 g/L)	Absence d'interférence	Sous estimation	Absence d'interférence
Valeurs normales (>37 g/L)	Absence d'interférence	Sous estimation	Absence d'interférence

Tableau 4 : Interférences observées sur le dosage de l'albumine

4) *Hémolyse*

Le dosage de l'albumine n'est pas impacté par l'hémolyse de l'échantillon. En fonction du contexte, ce dosage pourra s'avérer une alternative au dosage des protéines totales, ce dernier étant largement impacté par l'hémolyse.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

5) *Lipémie*

Le dosage de l'albumine est impacté négativement par la lipémie. Cette interférence ne peut être expliquée à elle seule par la longueur d'onde de détection à 570 nm, utilisée également pour le dosage de la CRP et de la lipase.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

IV. Aspartate amino transférase

1) Hémolyse

L'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité ASAT. Pour une valeur d'ASAT normale à 0,34 $\mu\text{kat/L}$, une augmentation de plus de 10% de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 7 $\mu\text{mol/L}$ soit 0,1 g/L, donc bien avant le seuil visuel de détection. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse jusqu'à une concentration en hémoglobine de 300 $\mu\text{mol/L}$ (4,8 g/L), au-delà de cette concentration en hémoglobine un plateau est atteint. Cependant pour des activités ASAT élevées, on ne retrouve pas cette interférence de l'hémolyse à des seuils aussi bas.

En effet, nous avons testé l'interférence de l'hémolyse pour deux activités ASAT à 3,3 et 7,4 $\mu\text{kat/L}$; dans ces conditions, l'augmentation de l'activité mesurée n'est observée qu'à partir de concentration en hémoglobine supérieure à 200 $\mu\text{mol/L}$ (3,2 g/L). De plus, elle reste modérée et ne semble pas proportionnelle à l'importance de l'hémolyse. (Figure 12-A)

Comme pour la mesure de l'activité ALAT, une dilution automatique de l'échantillon au 1/10^{ème} est alors effectuée par le Cobas®. Elle n'améliore cependant pas les résultats.(Figure 12-B)

2) Lipémie

La lipémie interfère de façon négative sur la mesure de l'activité ASAT. Pour une valeur d'ASAT normale (0.37 $\mu\text{kat/L}$), une diminution de plus de 10% de l'activité mesurée est notée au-delà d'un indice de lipémie de 188. Cette diminution est également constatée pour une activité ASAT élevée (2.63 $\mu\text{kat/L}$) avec un indice de lipémie de 217. (Figure 12-C)

Comme pour l'interférence de l'hémoglobine, une dilution automatique au 1/10^{ème} est effectuée sur les échantillons présentant une absorbance trop importante due à une lipémie élevée. Cette dilution ne permet pas d'obtenir un rendu satisfaisant pour une faible valeur d'activité ALAT. Elle est par contre efficace pour s'affranchir de l'interférence de la lipémie pour une valeur d'ALAT élevée. (Figure 12-D)

3) Ictère

Aucune interférence de la bilirubine conjuguée n'est observée sur la mesure de l'activité ASAT pour une valeur normale (0.39 $\mu\text{kat/L}$) et pathologique (3.85 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 12-E)

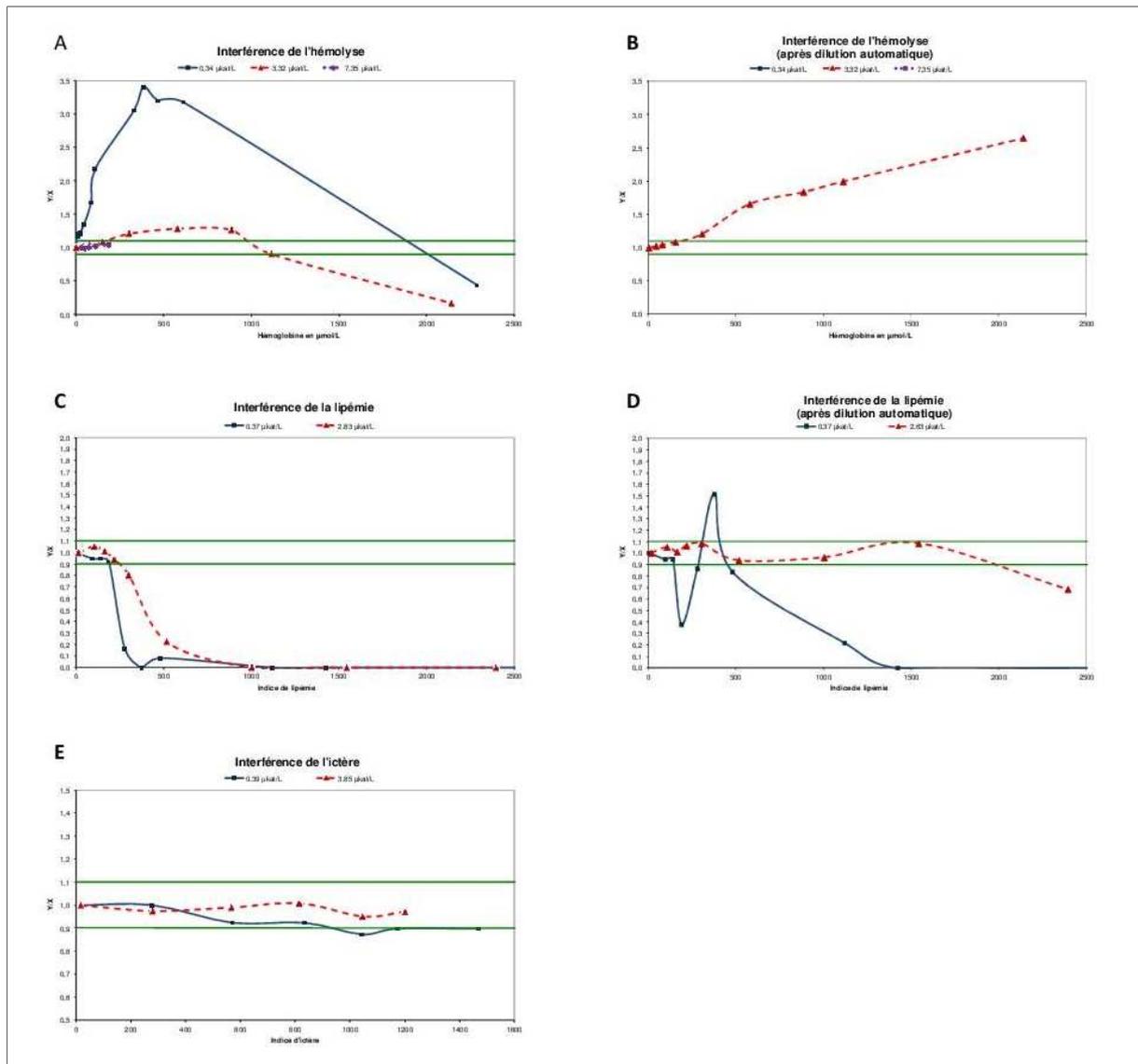


Figure 12 : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'aspartate amino-transférase (ASAT)
 Surcharge en hémoglobine sans dilution (A) puis après dilution automatique (B). Surcharge en Intralipid[®] sans dilution automatique (C) puis après dilution (D). Surcharge en ditaurate de bilirubine (E).

ASAT	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (<0,39 µkat/L)	Surestimation	Sous estimation non corrigée par la dilution	Absence d'interférence
Valeurs élevées (>2,63 µkat/L)	Discrète surestimation non corrigée par la dilution	Sous estimation corrigée par la dilution	Absence d'interférence

Tableau 5 : Interférences observées sur le dosage de l'ASAT

4) Hémolyse

L'interférence de l'hémolyse observée sur le dosage de l'activité ASAT est principalement due à un effet pré-analytique. Cette enzyme de concentration intra-érythrocytaire 15 fois supérieure à la concentration sérique est relarguée lors de la lyse des globules rouges. Il s'agit donc d'une

interférence d'apport. L'interférence est ainsi positive et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse. La surestimation de l'activité ASAT apparaît d'autant plus précocement et de manière d'autant plus importante que la valeur d'activité ASAT chez le patient est faible.

Pour des concentrations d'hémoglobines supérieures à 1000 μmol , l'interférence négative de l'hémolyse peut être qualifiée d'interférence physique ou chimique. Elle serait due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'addition d'hémolysat. Cette interférence n'est pas corrigée par la dilution automatique au $1/10^{\text{ème}}$ pour une valeur élevée d'activité ASAT.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont variables : inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur pour une valeur faible d'activité ASAT et supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur pour des valeurs pathologiques.

5) *Lipémie*

L'interférence observée avec la surcharge en Intralipid® semble relever principalement de l'interférence physique. Elle est négative et due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'ajout d'Intralipid®. Etrangement, cette interférence n'est pas corrigée par la dilution automatique pour une valeur normale d'activité ASAT alors qu'elle l'est pour une valeur élevée d'activité ASAT.

Les dosages de l'ALAT et de l'ASAT reposent sur le même principe. Ils sont les seuls à mettre en œuvre une détection par variation de la longueur d'onde à 340 nm sur une cinétique décroissante. La lipémie impacte donc leur dosage de façon similaire sans que la longueur d'onde de mesure ne puisse en être l'unique cause puisque cette longueur d'onde de détection est également utilisée pour le dosage du calcium, de la CK, du glucose, du LDH, du phosphore et de l'urée sans conséquence notable.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables voire supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

V. Acide urique

1) Hémolyse

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure de l'acide urique n'est observée pour les valeurs normales d'uricémie : 211 et 372 $\mu\text{mol/L}$. (Figure 13-A)

2) Lipémie

Aucune interférence de la lipémie sur la mesure de l'acide urique n'est observée pour les valeurs d'uricémie de 163 et 362 $\mu\text{mol/L}$. (Figure 13-B)

3) Ictère

La mesure de l'acide urique n'est pas impactée par la bilirubine conjuguée. Pour une valeur normale à 225 $\mu\text{mol/L}$, la bilirubine conjuguée n'interfère de façon négative qu'à partir d'un indice d'ictère de 838. (Figure 13-C)

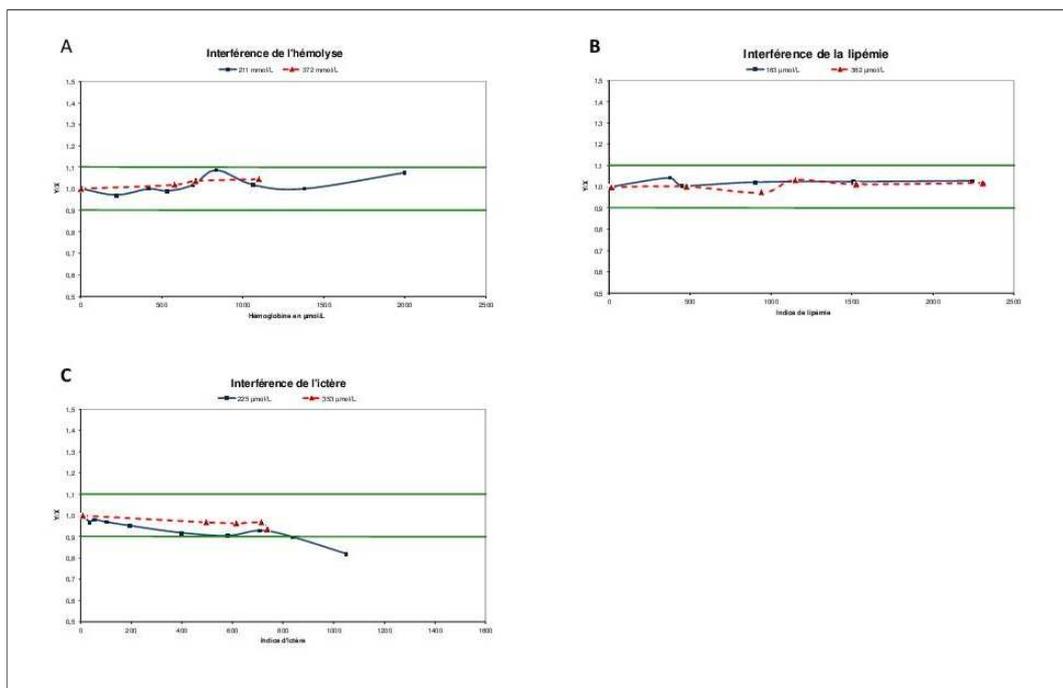


Figure 13 : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'acide urique
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

Acide urique	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales ($<372 \mu\text{mol/L}$)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 6 : Interférences observées sur le dosage de l'acide urique

Le dosage de l'acide urique n'est pas impacté quelle que soit la surcharge. A noter que du fait de notre recrutement de patient, les valeurs d'acide urique testées sont toutes des valeurs non pathologiques chez l'homme.

Que ce soit pour l'hémolyse, la lipémie ou l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

VI. Calcium

1) Hémolyse

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure du calcium n'est observée pour une valeur normale et une valeur basse de calcémie : 2,44 et 1,13 mmol/L. (Figure 14-A)

2) Lipémie

La mesure de la calcémie ne subit pas d'interférence sur les 2 niveaux de concentrations testés (2.14 et 2.76 mmol/L) pour des indices de lipémie allant respectivement jusqu'à 1983 et 1346. (Figure 14-B)

3) Ictère

La mesure de la calcémie n'est pas impactée quelle que soit sa concentration (1.74 mmol/L ou 2.16 mmol/L). (Figure 14-C)

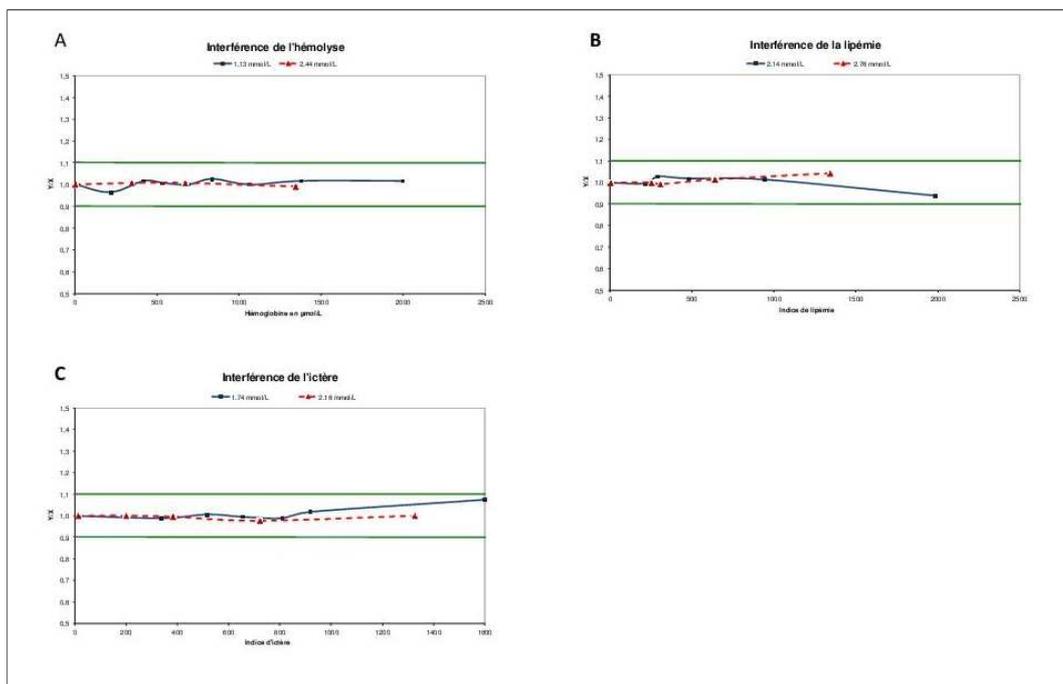


Figure 14 : Résultats expérimentaux pour le dosage du calcium
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

Calcium	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (<2.14 mmol/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs normales (>2.16 mmol/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 7 : Interférences observées sur le dosage du calcium

Aucune interférence n'a été reportée pour le dosage du calcium.

Que ce soit pour l'hémolyse, la lipémie ou l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

VII. Créatine kinase

1) *Hémolyse*

Sur une valeur de CK normale (1,64 $\mu\text{kat/L}$), l'hémolyse interfère évidemment de façon positive. Une augmentation de plus de 10% de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 75 $\mu\text{mol/L}$, soit 1,2 g/L. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse. (Figure 15-A)

2) *Lipémie*

Pour une valeur de CK normale (0,97 $\mu\text{kat/L}$), une interférence négative apparaît pour un indice de lipémie supérieur à 1120. Cette même diminution de l'activité créatine kinase est observable pour une valeur élevée de CK (4,13 $\mu\text{kat/L}$) au-delà d'un indice de lipémie comparable de 984. A noter que cette diminution semble ensuite proportionnelle à l'importance de la lipémie. (Figure 15-B)

Lorsque l'absorbance est trop importante pour le rendu du résultat de l'activité créatine kinase, une dilution automatique de l'échantillon au $1/10^{\text{ème}}$ est effectuée par le Cobas®. La dilution corrige en partie l'interférence. Pour la valeur élevée de CK, les résultats après dilution pour l'échantillon sont identiques à ceux de l'échantillon témoin contrairement à ce que l'on observe pour une valeur normale de CK. (Figure 15-C)

3) *Ictère*

Aucune interférence n'est observée sur la mesure de la créatine kinase pour des valeurs normales (1,02 $\mu\text{kat/L}$) ou élevées (14,95 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 15-D)

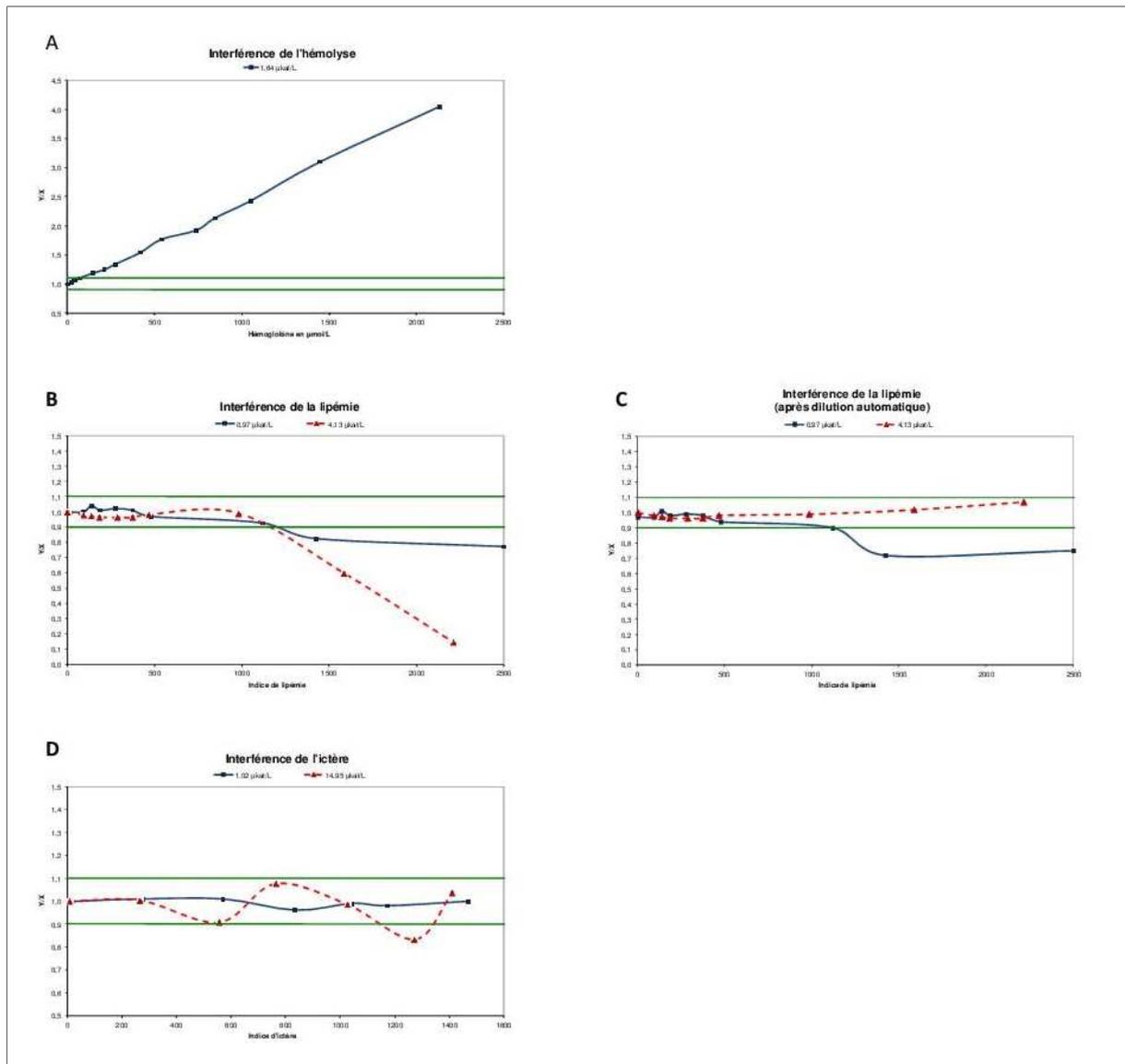


Figure 15 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la créatine kinase
 Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® sans dilution (B) puis après dilution automatique (C). Surcharge en ditaurate de bilirubine (D).

Créatine kinase	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (<1.64 µkat/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées (>4.13 µkat/L)	Non déterminée	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 8 : Interférences observées sur le dosage de la créatine kinase

4) Hémolyse

L'interférence de l'hémolyse observée sur le dosage de l'activité créatine kinase est principalement due à un effet pré-analytique. Cette enzyme dont la concentration intra-érythrocytaire est nulle n'est

pas relarguée lors de la lyse des globules rouges. L'interférence positive, proportionnelle à l'importance de l'hémolyse est due au relarguage d'adénylate kinase par l'érythrocyte. Cette enzyme catalyse la transformation de 2 ADP en 1 ATP et 1 AMP. L'ATP étant lui-même un produit d'une des réactions de dosage utilisé dans cette méthode enzymatique, la mesure de l'activité CK est majorée. (20)

Les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur d'autant plus que la valeur testée lors de notre étude était relativement faible.

5) *Lipémie*

Une interférence négative est constatée avec une surcharge importante en Intralipid®. Celle-ci semble relever principalement de l'interférence physique et est due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'ajout d'Intralipid®. Comme pour le dosage de l'activité ALAT, l'interférence n'est pas corrigée par la dilution automatique pour une valeur normale d'activité CK alors qu'elle l'est pour une valeur élevée d'activité CK.

Suite à la dilution automatique, le résultat du dosage est corrigé uniquement pour l'échantillon dont l'activité CK est élevée.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur.

VIII. Créatinine

1) *Hémolyse*

Selon la valeur de créatinine, l'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure. En effet, pour une valeur de créatinine normale (62 $\mu\text{mol/L}$), l'interférence apparaît pour une valeur d'hémoglobémie de 700 $\mu\text{mol/L}$ (11,3 g/L), tandis qu'aucune interférence n'est observée jusqu'à plus de 1 000 $\mu\text{mol/L}$ (16,1 g/L) d'hémoglobine pour une valeur de créatinine de 270 $\mu\text{mol/L}$. (Figure 16-A)

2) *Lipémie*

Quelle que soit la valeur de créatinine (43 ou 236 $\mu\text{mol/L}$), la lipémie interfère de la même façon sur la mesure. Une variation de la mesure apparaît dès un indice de lipémie de 984 puis l'interférence devient négative au-delà d'un indice de lipémie de 1700. (Figure 16-B)

Lorsque l'absorbance est trop importante pour le rendu du résultat de la créatinine, une dilution automatique de l'échantillon au 1/5^{ème} est effectuée par le Cobas®. La dilution corrige l'interférence puisque les résultats après dilution sont identiques à ceux des échantillons témoins. (Figure 16-C)

3) *Ictère*

Pour une valeur normale de créatinine (62 $\mu\text{mol/L}$), une interférence négative proportionnelle à l'indice d'ictère apparaît au-delà d'un indice d'ictère de 101. En revanche, pour une valeur pathologique de créatinine (359 $\mu\text{mol/L}$), aucune interférence n'est constatée sur la mesure de la créatinine pour des indices d'ictère allant jusqu'à 505. (Figure 16-D)

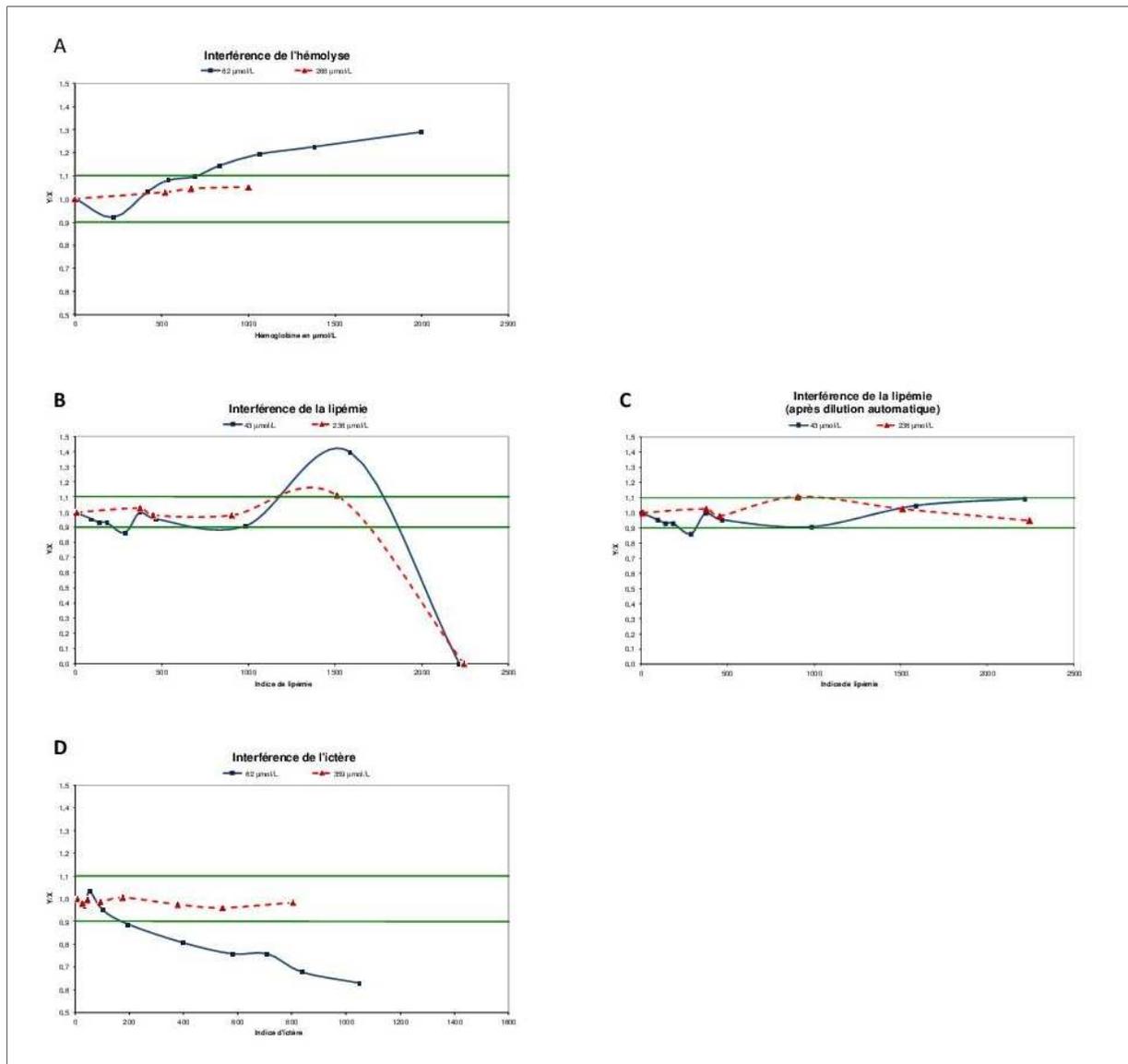


Figure 16 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la créatinine
 Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® sans dilution (B) puis après dilution automatique (C). Surcharge en ditaurate de bilirubine (D).

Créatinine	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales ($<62 \mu\text{mol/L}$)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Sous estimation
Valeurs normales ($>236 \mu\text{mol/L}$)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 9 : Interférences observées sur le dosage de la créatinine

4) Hémolyse

L'interférence tardive de l'hémolyse observée uniquement pour de faibles concentrations de créatinine est principalement due à un effet pré-analytique. La créatinine intra-érythrocytaire, 1,6 fois plus concentrée que dans le sérum, est relarguée lors de la lyse des globules rouges. Il s'agit donc

d'une interférence d'apport se manifestant uniquement pour une importante surcharge en hémoglobine donc négligeable en pratique courante.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur voire supérieurs pour des valeurs de créatinine élevées.

5) *Lipémie*

Une interférence négative est constatée avec une surcharge importante en Intralipid®. Celle-ci semble relever principalement de l'interférence physique et est due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'ajout d'Intralipid®. L'interférence est corrigée par la dilution automatique quelle que soit la valeur testée.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Parmi les paramètres impactés par l'ictère à bilirubine conjuguée, on retrouve la créatinine mesurée au sein de notre laboratoire par méthode colorimétrique via la réaction de Jaffé compensée (utilisation d'acide picrique en milieu alcalin). L'interférence observée apparaît dès un indice d'ictère égal à 196 pour une valeur de créatinine étudiée normale à 62 $\mu\text{mol/L}$. Cette interférence induit une sous-estimation de la valeur de créatinine de 25% pour un indice d'ictère de 580. Cependant l'interférence n'est pas retrouvée pour une valeur importante de créatinine à 359 $\mu\text{mol/L}$. L'oxydation de la bilirubine en biliverdine en milieu alcalin, notamment en début de réaction serait la cause de cette interférence. (20) Il faut toutefois souligner que l'interférence négative de l'ictère sur le dosage de la créatinine est également décrite avec des méthodes de dosages enzymatiques.(27)

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables voire supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

IX. CRP

1) Hémolyse

Aucune interférence de l'hémolyse sur le dosage de la CRP n'est observée pour les valeurs de 35 et 182 mg/L. (Figure 17-A)

2) Lipémie

Aucune interférence de la lipémie n'est observée sur le dosage de la CRP pour les valeurs de 18 et 73 mg/L. (Figure 17-B)

3) Ictère

Aucune interférence de la bilirubine conjuguée n'est observée sur le dosage de la CRP pour des valeurs de 15 et 148 mg/L. (Figure 17-C)

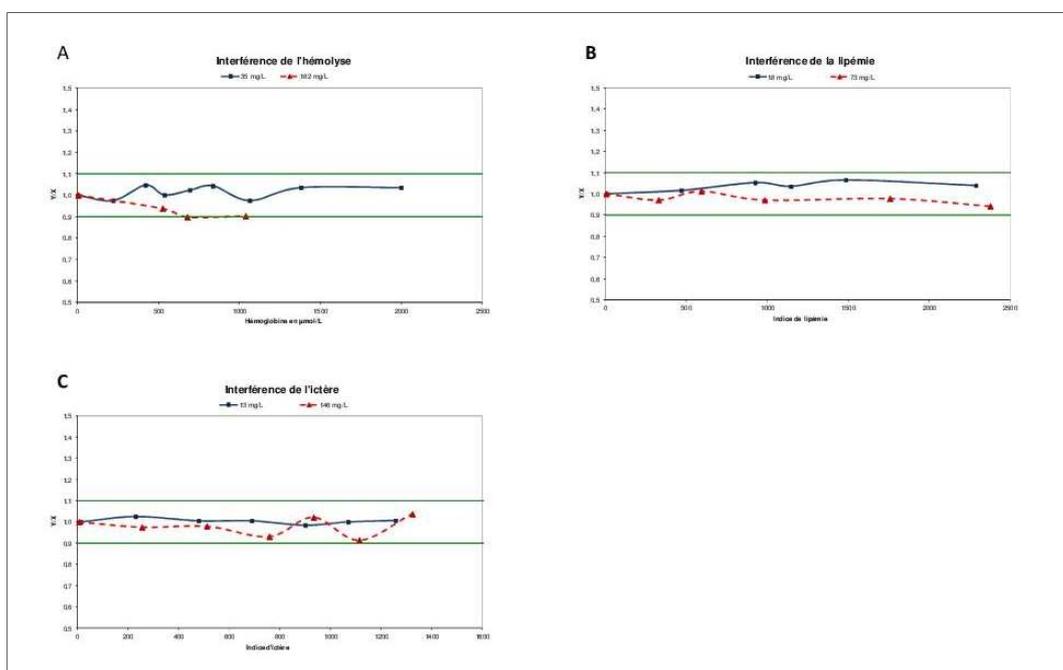


Figure 17 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la CRP

Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

CRP	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (<35 mg/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs normales (>73 mg/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 10 : Interférences observées sur le dosage de la CRP

Aucune interférence n'a été reportée pour le dosage de la CRP.

Que ce soit pour l'hémolyse, la lipémie ou l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

X. Cholestérol total

1) Hémolyse

L'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure du cholestérol. La valeur d'hémoglobémie à partir de laquelle on observe une augmentation de mesure de plus de 10 % dépend de la valeur du cholestérol de l'échantillon. Plus la valeur de cholestérol est basse, plus l'interférence apparaît pour des hémoglobinémies faibles. Dans notre exemple, pour une valeur de cholestérol de 3,7 mmol/L, l'interférence apparaît pour une valeur d'hémoglobine de 500 $\mu\text{mol/L}$ (8,1 g/L), tandis qu'elle apparaît dès 200 $\mu\text{mol/L}$ (3,2 g/L) lorsque la valeur de cholestérol est plus faible : 2,19 mmol/L. (Figure 18-A)

2) Lipémie

Aucune interférence de la lipémie n'est observée sur le dosage du cholestérol total pour des valeurs de 2.87 et 3.79 mmol/L. (Figure 18-B)

3) Ictère

Une interférence négative proportionnelle à l'indice d'ictère est constatée pour le dosage du cholestérol total pour les 2 valeurs testées (2.78 et 4.62 mmol/L). Cette interférence est significative au-delà d'un indice d'ictère évalué à 200. (Figure 18-C)

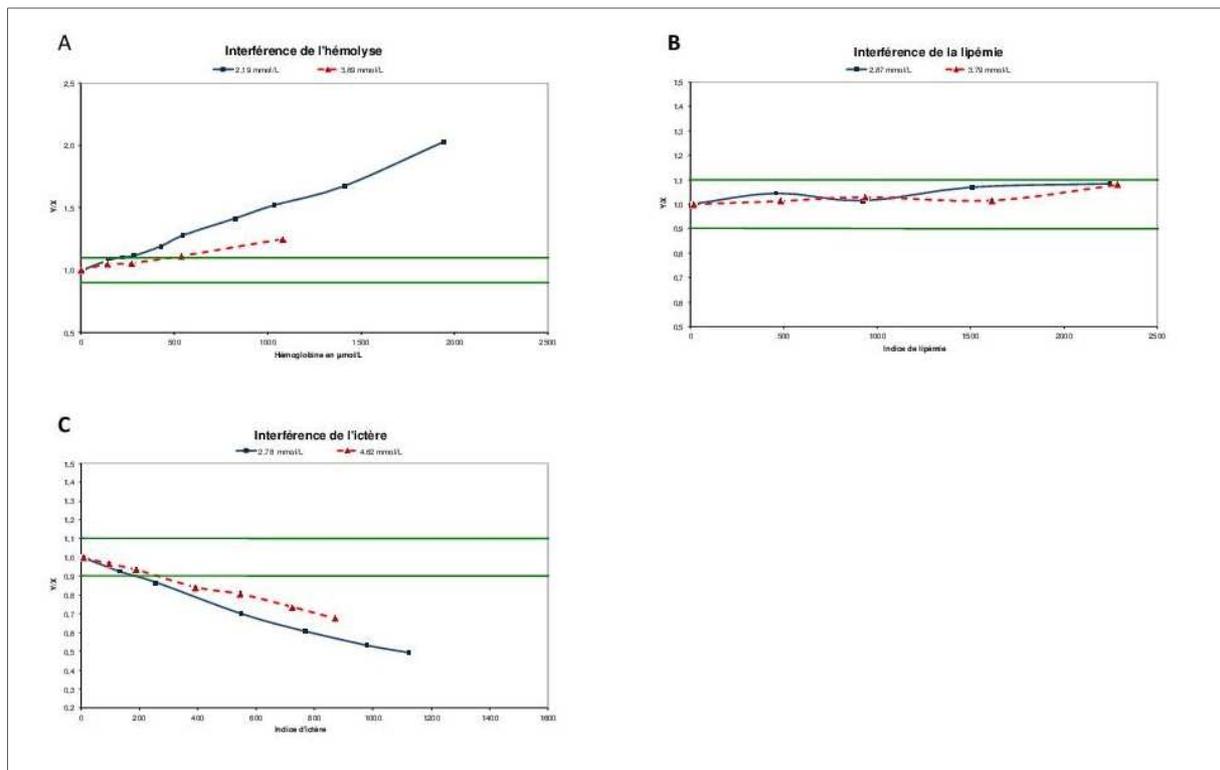


Figure 18 : Résultats expérimentaux pour le dosage du cholestérol total
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).



Cholestérol total	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (2.12- 4.97 $\mu\text{mol/L}$)	Surestimation	Absence d'interférence	Sous estimation

Tableau 11 : Interférences observées sur le dosage du cholestérol total

4) *Hémolyse*

Le dosage du cholestérol total subit une interférence positive proportionnelle à l'hémolyse due à un effet pré-analytique. La lyse de l'érythrocyte provoque la libération de cholestérol, un constituant important des membranes. Il s'agit donc d'une interférence d'apport qui impacte d'autant plus le dosage du paramètre si celui-ci est en faible concentration.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur pour des valeurs normales de cholestérol testées.

5) *Lipémie*

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur

6) *Ictère*

Tout comme le sont les dosages du HDL-cholestérol et des triglycérides, le dosage du cholestérol total est impacté par la surcharge en bilirubine conjuguée. On constate une interférence négative proportionnelle à l'indice d'ictère pour les 2 valeurs testées (2.78 et 4.62 mmol/L).

Le dosage du cholestérol total emploie pour l'une de ses étapes la réaction de Trinder ; la lecture spectrophotométrique se fait à 505 nm avec une longueur d'onde secondaire à 700 nm. La plage de longueurs d'onde utilisée ainsi que la réaction de Trinder, éléments en commun avec les dosages des autres paramètres du bilan lipidique sont des pistes à investiguer pour expliquer cette interférence.

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

A propos des limites d'interférences retrouvées expérimentalement pour l'hémolyse et l'ictère, il faut toutefois prendre en compte le fait que les concentrations en cholestérol testées sont toutes normales et inférieures à celle utilisée pour établir les limites fournisseur.

XI. Gamma-Glutamyl Transferase

1) *Hémolyse*

La mesure de l'activité GGT est impactée de façon négative par l'hémolyse uniquement pour des hémolyses importantes correspondant à une hémoglobininémie supérieure à 500 $\mu\text{mol/L}$ (8,1 g/L). L'interférence est observée de façon quasi identique pour des valeurs normales ou élevées : 0,8 et 7 $\mu\text{kat/L}$ et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse. (Figure 19-A)

Lorsque l'absorbance est trop importante pour le rendu du résultat de l'activité GGT, une dilution automatique de l'échantillon au 1/11^{ème} est effectuée par le Cobas. La dilution sur les deux niveaux testés corrige l'interférence de l'hémolyse, les résultats sont alors identiques à ceux des échantillons témoins. (Figure 19-B)

2) *Lipémie*

Aucune interférence n'est observée sur le dosage de l'activité GGT pour une valeur normale (1.05 $\mu\text{kat/L}$) comme pour une valeur élevée (3.93 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 19-C)

Du fait d'une valeur d'absorbance importante, une dilution automatique de l'échantillon au 1/11^{ème} est tout de même effectuée sans que cette dilution n'entraîne de différence significative de résultats. (Figure 19-D)

3) *Ictère*

La mesure de l'activité GGT sur les 2 valeurs testées (0.97 et 2.64 $\mu\text{kat/L}$) n'est pas impactée par la bilirubine conjuguée. (Figure 19-E)

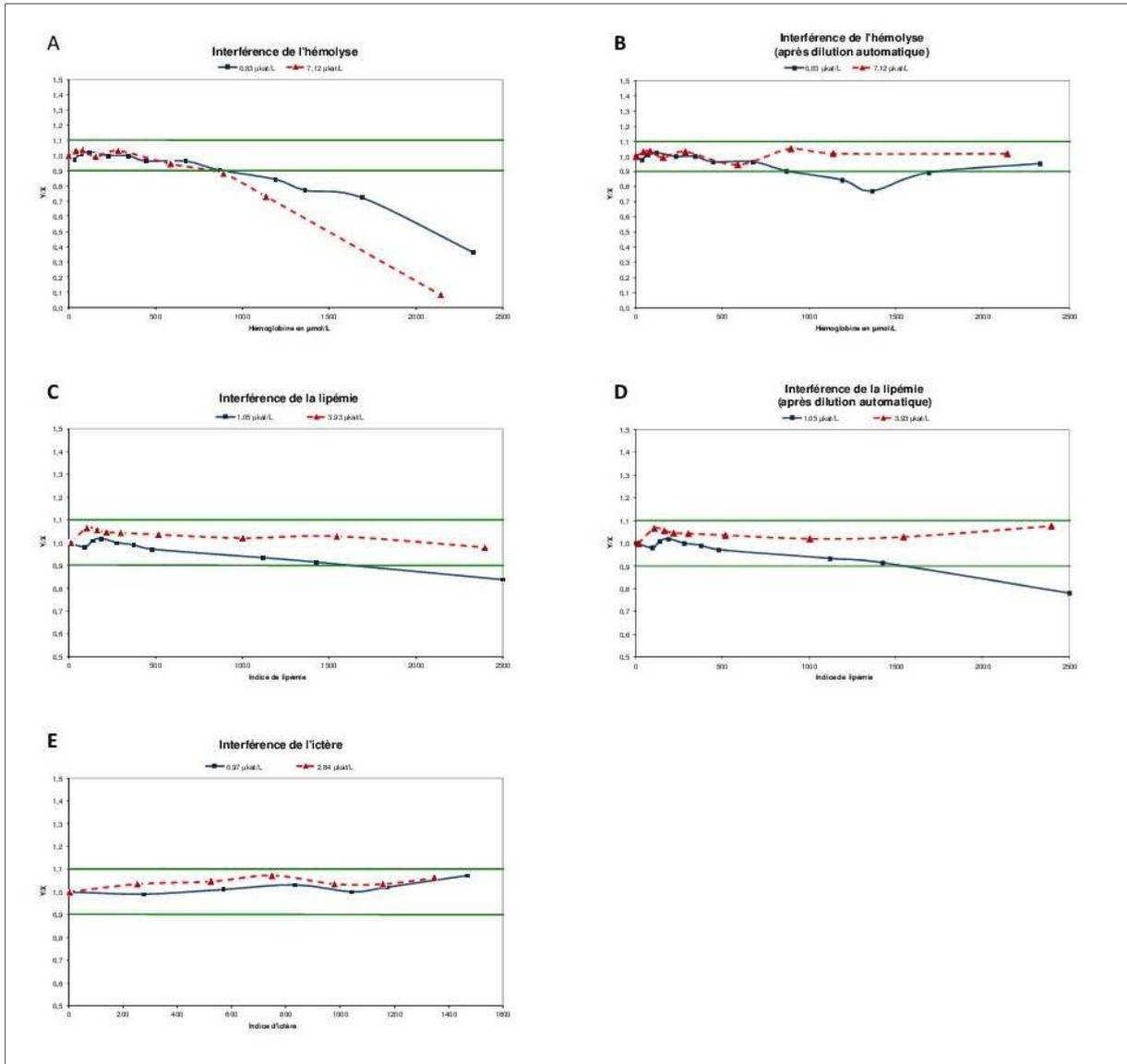


Figure 19 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la gamma-glutamyl-transferase (GGT)
 Surcharge en hémoglobine sans dilution (A) puis après dilution automatique (B). Surcharge en Intralipid[®] sans dilution (C)
 puis après dilution automatique (D). Surcharge en ditaurate de bilirubine (E).

GGT	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales ($<1.05 \mu\text{kat/L}$)	Sous estimation corrigée par la dilution au 1/11ème	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées ($>2.64 \mu\text{kat/L}$)	Sous estimation corrigée par la dilution au 1/11ème	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 12 : Interférences observées sur le dosage de la GGT

4) *Hémolyse*

Le dosage de GGT subit une inférence négative, proportionnelle à la surcharge en hémoglobine et identique sur les 2 concentrations testées lorsque l'on observe les résultats bruts du dosage. Cette interférence qui semble relever principalement de l'interférence physique, est relativement bien corrigée après dilution automatique de l'échantillon.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

5) *Lipémie*

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XII. Glucose

1) Hémolyse

Pour une valeur de glycémie faible (3.2 mmol/L), une interférence positive apparaît pour une hémoglobininémie supérieure à 500 μ mol/L. Aucune interférence n'est observée pour des valeurs élevées de 7.0 et 15.9 mmol/L. (Figure 20-A)

2) Lipémie

Pour une valeur de glycémie faible (3.2 mmol/L), une interférence positive apparaît pour un indice de lipémie supérieur à 1120. Aucune interférence n'est observée pour une valeur élevée de glycémie (14.9 mmol/L). (Figure 20-B)

3) Ictère

Aucune interférence sur la mesure du glucose n'est observée tant pour des valeurs normales (3.3 mmol/L) que pour des valeurs élevées de ce paramètre (12.0 mmol/L). (Figure 20-C)

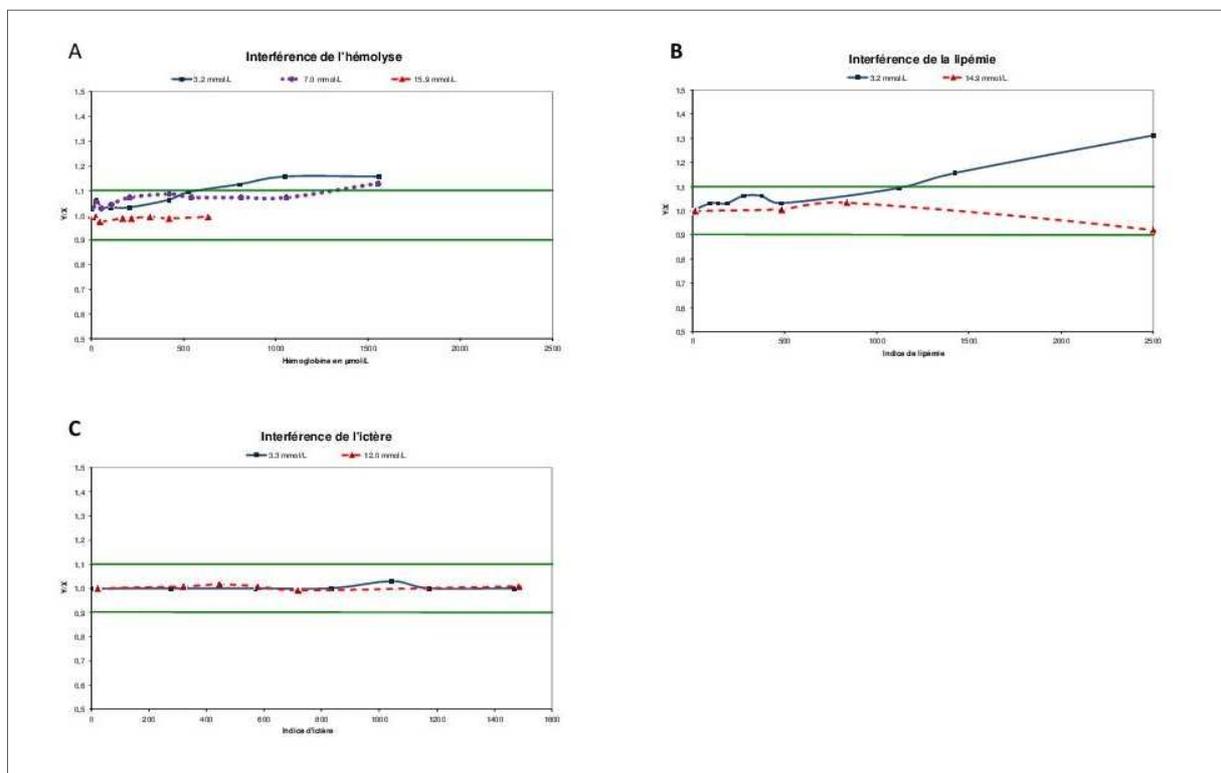


Figure 20 : Résultats expérimentaux pour le dosage du glucose
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

Glucose	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (<3.3 mmol/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées (>7 mmol/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 13 : Interférences observées sur le dosage du glucose

4) *Hémolyse*

Une légère interférence positive est constatée pour une concentration d'hémoglobine élevée supérieure à 621 $\mu\text{mol/L}$. Cette surestimation relève principalement de l'interférence spectrale voire chimique.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

5) *Lipémie*

Pour une valeur de glucose faible (3.2 mmol/L), une interférence positive apparaît pour un indice de lipémie supérieur à 1120.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XIII. HDL-Cholestérol

1) Hémolyse

L'interférence de l'hémolyse n'a pas été explorée pour le dosage du HDL-Cholestérol.

2) Lipémie

Aucune interférence de la lipémie n'est observée sur le dosage du HDL-cholestérol pour des valeurs de 0.68 et 0.79 mmol/L. (Figure 21-A)

3) Ictère

La mesure du HDL-Cholestérol est impactée de façon négative par la bilirubine conjuguée sur les deux niveaux de concentrations testés (0.73 et 0.85 mmol/L). L'interférence apparaît pour un indice d'ictère proche supérieur à 400 et semble proportionnelle à la concentration en bilirubine. (Figure 21-B)

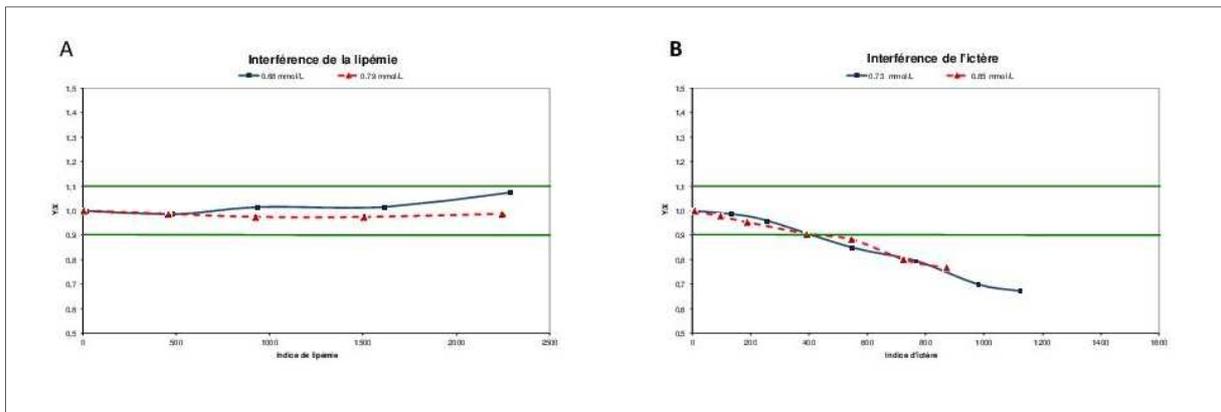


Figure 21 : Résultats expérimentaux pour le dosage du HDL-Cholestérol
Surcharge en Intralipid® (A). Surcharge en ditaurate de bilirubine (B).

HDL-Cholestérol	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (0.68-0.85 mmol/L)	Non déterminée	Absence d'interférence	Sous estimation

Tableau 14 : Interférences observées sur le dosage du HDL-Cholestérol

4) Lipémie

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

5) Ictère

Tout comme le sont les dosages du cholestérol total et des triglycérides, le dosage du HDL-cholestérol total est impacté par la surcharge en bilirubine conjuguée. On constate une interférence négative proportionnelle à l'indice d'ictère.

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur. Il faut toutefois prendre en compte le fait que les concentrations en HDL-cholestérol testées sont inférieures à celle utilisée pour établir les limites fournisseur.

XIV. Lactate deshydrogénase

1) *Hémolyse*

Sur une valeur de LDH à 3 $\mu\text{kat/L}$, l'hémolyse interfère évidemment de façon positive sur la mesure de l'activité LDH de façon très importante, et ceci même en absence visible d'hémolyse. Une augmentation de plus de 10% de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 7 $\mu\text{mol/L}$ soit 0,1 g/L, donc bien avant le seuil visuel de détection. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse. (Figure 22-A)

2) *Lipémie*

La lipémie interfère de façon négative sur la mesure de l'activité LDH à partir d'un indice de lipémie de 1624 pour une valeur normale de LDH (2.45 $\mu\text{kat/L}$). Une diminution de plus de 10% de l'activité mesurée est également observée au-delà d'un indice de lipémie de 1205 pour une valeur élevée de LDH (7.10 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 22-B)

Lorsque l'absorbance est trop importante pour le rendu du résultat de LDH, l'automate relance le dosage avec une prise d'essai diminuée passant de 2.8 à 1.1 μL , méthode équivalant à une dilution automatique. Ce redosage corrige l'interférence puisque les résultats après dilution sont corrects. (Figure 22-C)

3) *Ictère*

Aucune interférence de la bilirubine conjuguée n'est observée sur le dosage de l'activité LDH, pour des valeurs normales (2.6 $\mu\text{kat/L}$) comme pour des valeurs élevées (8.0 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 22-D)

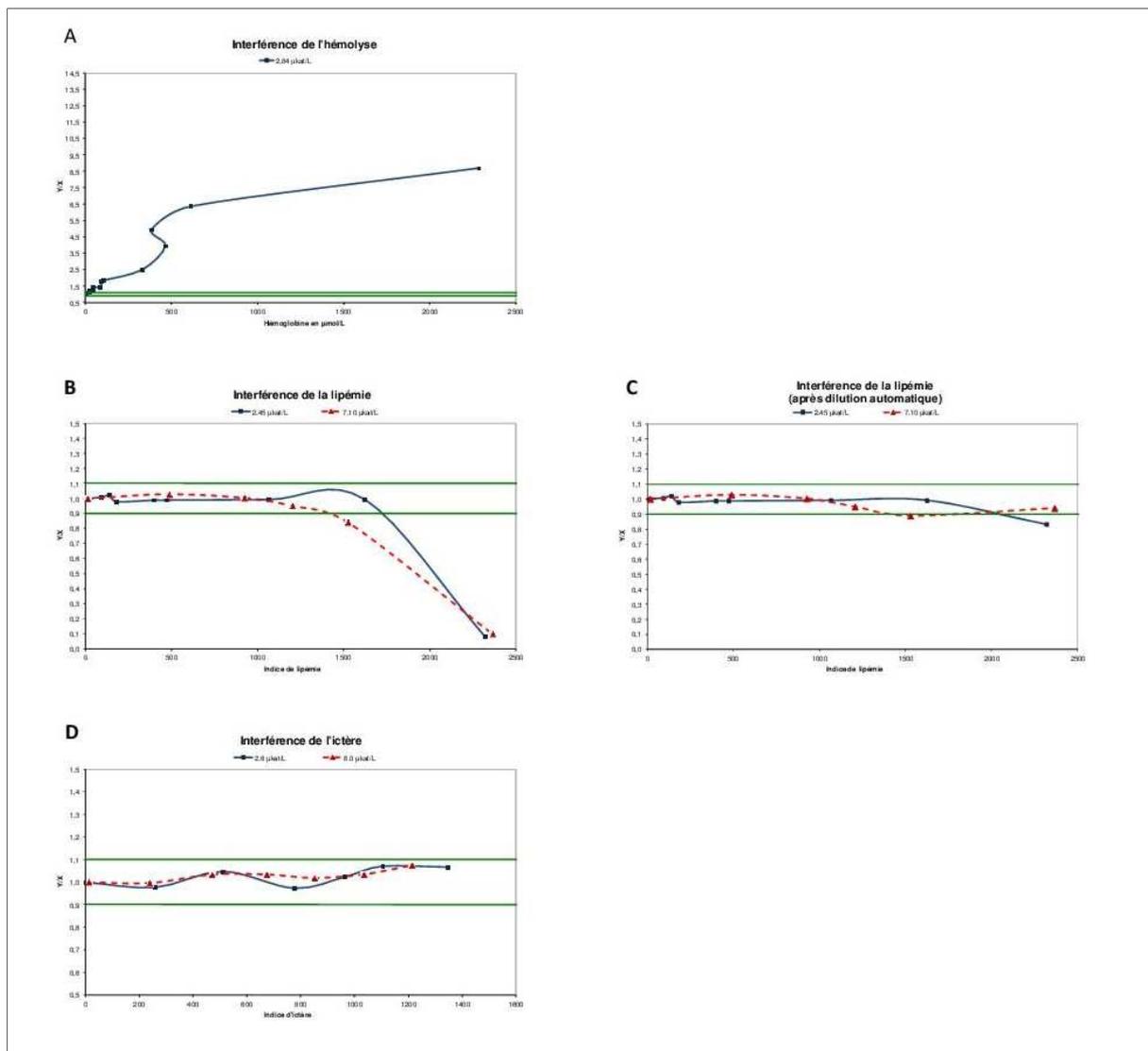


Figure 22 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la lactate deshydrogénase
 Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid[®] sans dilution (B) puis après dilution automatique (C). Surcharge en ditaurate de bilirubine (D).

LDH	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (<2.84 µkat/L)	Surestimation	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées (>7.10 µkat/L)	Non déterminée	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 15 : Interférences observées sur le dosage de la LDH

4) Hémolyse

L'interférence de l'hémolyse observée sur le dosage de l'activité LDH est principalement due à un effet pré-analytique. Cette enzyme dont la concentration intra-érythrocytaire est importante est relarguée lors de la lyse des globules rouges, il s'agit donc d'une interférence d'apport. L'interférence est ainsi positive et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse. C'est pour ce paramètre, dont le

rapport intra érythrocytaire/plasma est égal à 150, que l'indice limite d'hémolyse est le plus faible ($< 7 \mu\text{mol/L}$ soit $< 0,1 \text{ g/L}$).

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur. Il faut toutefois prendre en compte le fait que l'activité LDH testée est inférieure à celle utilisée pour établir les limites fournisseur et que comme toute interférence d'apport, la surestimation de l'activité apparaît d'autant plus précocement et de manière d'autant plus importante que la valeur d'activité initiale est faible.

5) *Lipémie*

Une interférence négative est constatée avec une surcharge importante en Intralipid®. Celle-ci relève principalement de l'interférence physique et est due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'ajout d'Intralipid®. L'interférence est corrigée par la dilution automatique quelle que soit la valeur testée.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur voire supérieurs après correction par la dilution automatique.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XV. Lipase

1) Hémolyse

La mesure de l'activité lipasique est impactée de façon négative par l'hémolyse. Cette interférence est plus importante pour une activité lipase élevée que pour une activité lipase normale. Pour une valeur normale (0,6 $\mu\text{kat/L}$) l'interférence s'observe à partir d'une valeur d'hémoglobinémie > 850 $\mu\text{mol/L}$ (13,7 g/L), tandis que pour des activités lipase supérieures à 1 $\mu\text{kat/L}$ (1,5 et 3,5 $\mu\text{kat/L}$), une valeur d'hémoglobinémie supérieure à 500 $\mu\text{mol/L}$ (8,1 g/L) entraîne une diminution de plus de 10 % de l'activité mesurée. (Figure 23-A)

2) Lipémie

Aucune interférence n'est observée sur la mesure de l'activité lipasique pour des valeurs normale et élevée de ce paramètre (0.59 $\mu\text{kat/L}$ et 3.46 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 23-B)

3) Ictère

Aucune interférence n'est observée sur la mesure de l'activité lipasique pour des valeurs normales (0.58 $\mu\text{kat/L}$) et élevées (3.11 $\mu\text{kat/L}$) de ce paramètre. (Figure 23-C)

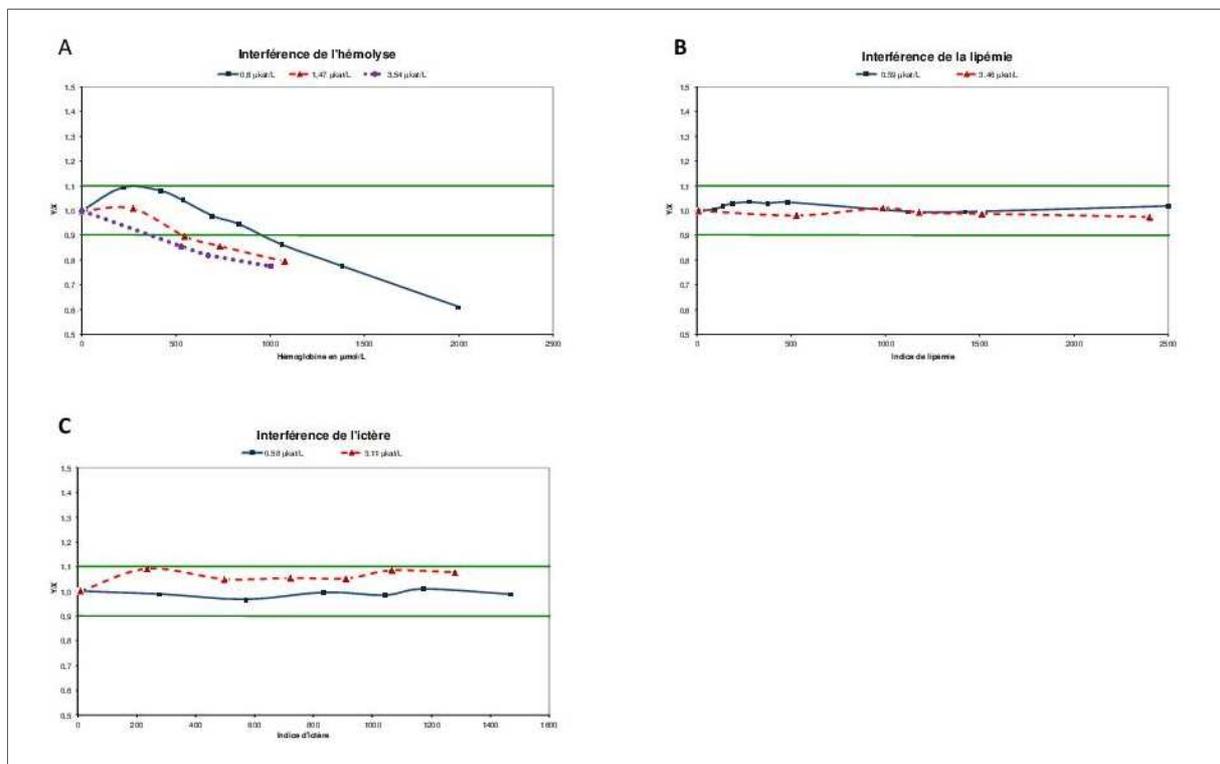


Figure 23 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la lipase
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

Lipase	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales ($<0.60 \mu\text{kat/L}$)	Sous estimation	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées ($>1.47 \mu\text{kat/L}$)	Sous estimation	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 16 : Interférences observées sur le dosage de la lipase

4) *Hémolyse*

Contrairement à ce que l'on observe pour l'ensemble des autres paramètres, pour le dosage de la lipase, l'interférence est plus importante pour les valeurs élevées du paramètre que pour les valeurs normales ou faibles.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs pour des valeurs normales d'activité lipasique mais inférieurs pour des valeurs pathologiques à ceux annoncés par le fournisseur.

5) *Lipémie*

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XVI. Myoglobine

1) Hémolyse

L'hémolyse n'interfère quasiment pas sur le dosage de la myoglobine. Aucune interférence n'est observée sur une valeur de myoglobine de 43 µg/L jusqu'à une valeur d'hémoglobine de 1 000 µmol/L (16,1 g/L). Au-delà, on observe une diminution très légère (maximum 12 %) pour des valeurs d'hémoglobine comprises entre 1 000 et 2 000 µmol/L (16,1 et 32,2 g/L). (Figure 24-A)

2) Lipémie

Aucune interférence n'est observée sur des valeurs de myoglobine de 54 et 1293 µg/L. (Figure 24-B)

3) Ictère

Aucune interférence n'est observée sur la mesure de la myoglobine pour des valeurs normales (48 µg/L) et élevées (1253 mg/L). (Figure 24-C)

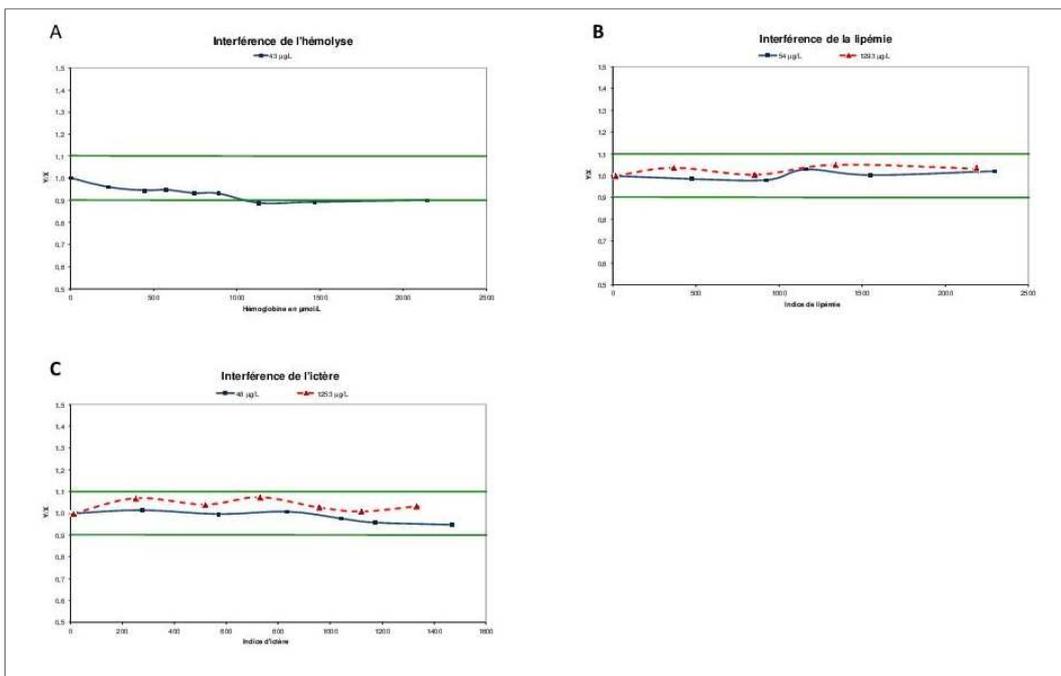


Figure 24 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la myoglobine
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

Myoglobine	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (<54 µmol/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées (>1253 µmol/L)	Non déterminée	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 17 : Interférences observées sur le dosage de la myoglobine

Aucune interférence n'a été reportée pour le dosage de la myoglobine.

Que ce soit pour l'hémolyse, la lipémie ou l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XVII. Magnésium

1) Hémolyse

L'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure du magnésium. La valeur d'hémoglobininémie à partir de laquelle on observe une augmentation de mesure de plus de 10 % est de 500 $\mu\text{mol/L}$ (8,1 g/L). Cette augmentation est ensuite proportionnelle à l'importance de l'hémolyse. (Figure 25-A)

2) Lipémie

Aucune interférence n'est observée sur la mesure du magnésium pour une valeur de 0.47 mmol/L. (Figure 25-B)

3) Ictère

L'interférence de la bilirubine conjuguée n'a pas été explorée pour le dosage du magnésium.

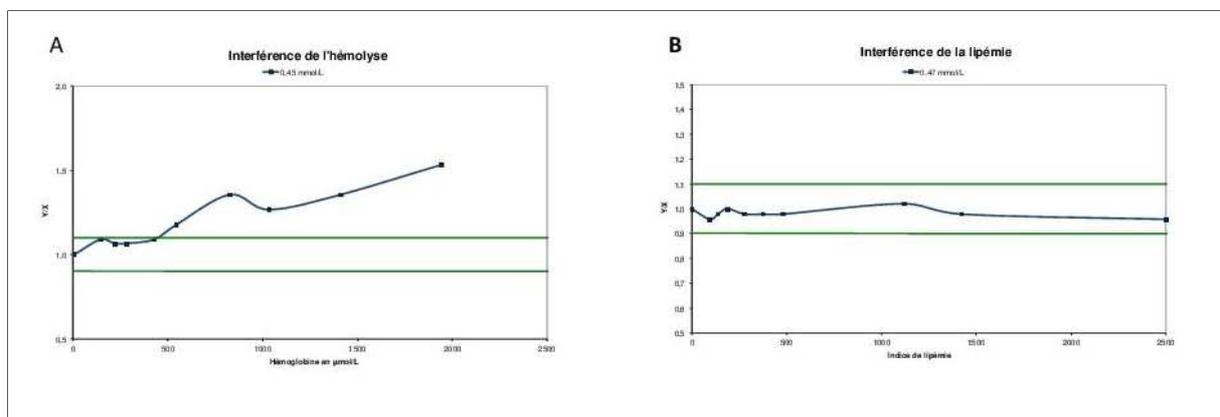


Figure 25 : Résultats expérimentaux pour le dosage du magnésium
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B).

Magnésium	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles ($< 0,50 \text{ mmol/L}$)	Surestimation	Surestimation	Non déterminée

Tableau 18 : Interférences observées sur le dosage du magnésium

4) Hémolyse

L'interférence de l'hémolyse observée sur le dosage du magnésium est principalement due à une interférence d'apport. Le magnésium dont la concentration intra-érythrocytaire est 3 fois supérieure à celle du plasma, est relargué lors de la lyse des globules rouges.(20) L'interférence est ainsi positive et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse.

Concernant l'hémolyse, l'indice limite obtenu dans notre étude est comparable à celui annoncé par le fournisseur.

5) Lipémie

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XVIII. NT ProBNP

1) Hémolyse

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure du NT-ProBNP n'est observée pour les valeurs normales et élevées (196 et 1 830 ng/L). (Figure 26-A)

2) Lipémie

Aucune interférence de la lipémie n'est observée sur la mesure du NT-ProBNP pour les valeurs normales et élevées (31 et 2555 ng/L). (Figure 26-B)

3) Ictère

Aucune interférence de la bilirubine conjuguée n'est observée sur la mesure du NT-ProBNP pour les valeurs normales (28 ng/L) et élevées (1847 ng/L). (Figure 26-C)

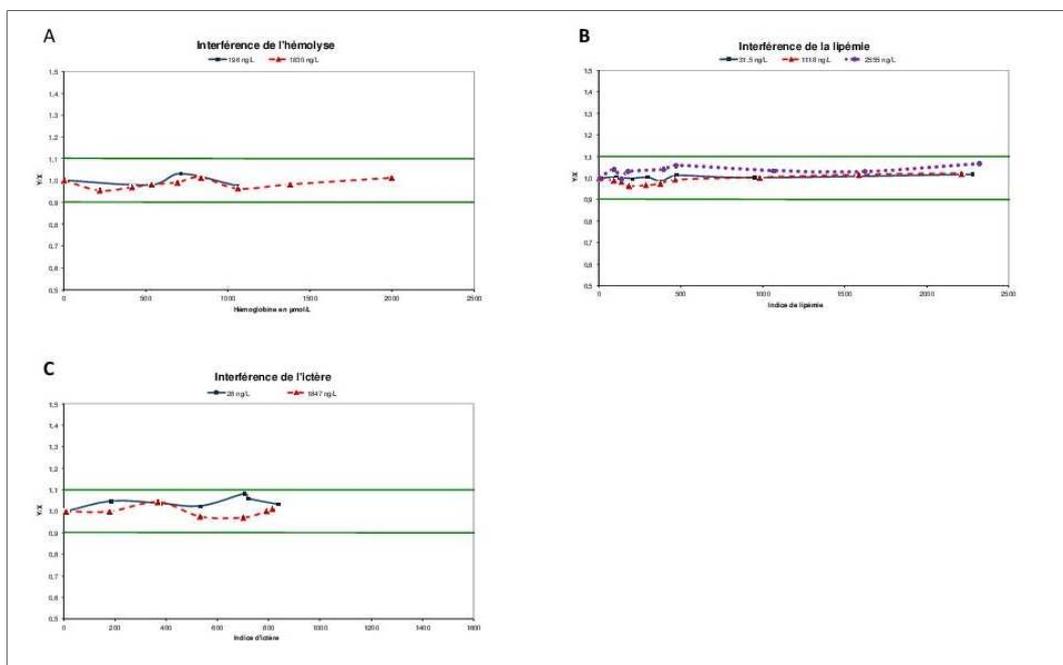


Figure 26 : Résultats expérimentaux pour le dosage du NT-ProBNP
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

NT ProBNP	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (<196 ng/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées (>1830 ng/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 19 : Interférences observées sur le dosage de la NT-ProBNP

Aucune interférence n'a été reportée pour le dosage du NT-ProBNP.

Que ce soit pour l'hémolyse, la lipémie ou l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XIX. Phosphore

1) Hémolyse

Pour une phosphorémie normale (0,65 mmol/L), l'hémolyse interfère évidemment de façon positive et de manière assez importante. Une augmentation de plus de 10 % de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 100 µmol/L soit 1,6 g/L. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse. (Figure 24-A)

2) Lipémie

Une interférence positive apparaît au-delà d'un indice de lipémie de 1146 pour une valeur de phosphore basse (0,43 mmol/L). (Figure 27-B)

Une dilution automatique de l'échantillon au 1/10^{ème} corrige cette surestimation. (Figure 27-C)

3) Ictère

L'interférence de la bilirubine conjuguée n'a pas été explorée pour le dosage du phosphore.

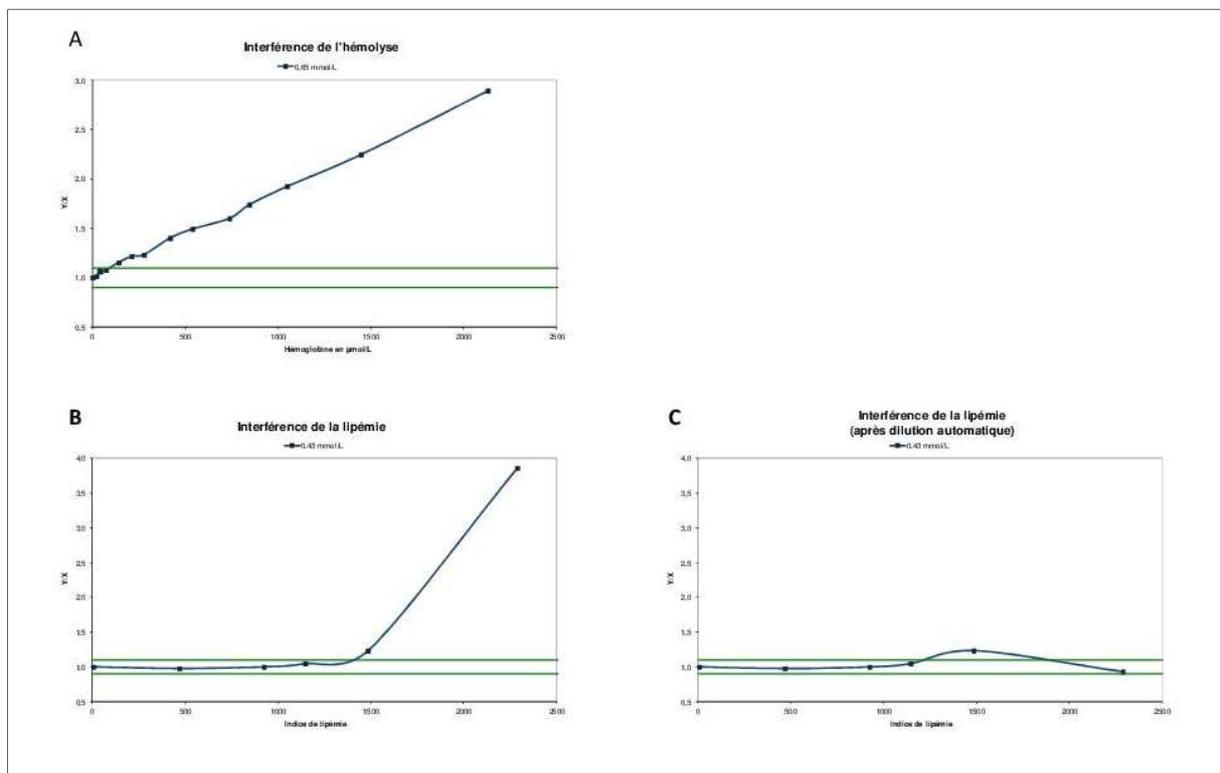


Figure 27 : Résultats expérimentaux pour le dosage du phosphore

Surcharge en hémoglobine(A). Surcharge en Intralipid[®] sans dilution (B) puis après dilution automatique (C).

Phosphore	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (<0,65 mmol/L)	Surestimation	Absence d'interférence	Non déterminée

Tableau 20 : Interférences observées sur le dosage du phosphore

4) *Hémolyse*

L'interférence de l'hémolyse observée sur le dosage du phosphore est principalement due à un effet pré-analytique. Après hydrolyse, des groupements phosphates intra-érythrocytaire sont relargués lors de l'hémolyse. Il s'agit donc d'une interférence d'apport. L'interférence est ainsi positive et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse.

Concernant l'hémolyse, l'indice limite obtenu dans notre étude d'interférence est inférieur à celui annoncé par le fournisseur. Il faut toutefois prendre en compte le fait que la concentration de phosphore testée est inférieure à celle utilisée pour établir les limites fournisseur et que comme toute interférence d'apport, la surestimation de l'activité apparaît d'autant plus précocement et de manière d'autant plus importante que la concentration initiale est faible.

5) *Lipémie*

Contrairement à ce que l'on observe pour l'ensemble des autres paramètres, l'interférence due à la surcharge en Intralipid® sur le dosage du phosphore est positive. Pour autant, cette interférence n'apparaît que pour des concentrations importantes en Intralipid® et est donc négligeable en pratique courante. Cette surestimation pourrait relever d'une interférence chimique. Elle est corrigée par la dilution automatique.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables à ceux annoncés par le fournisseur.

XX. Phosphatase Alcaline

1) Hémolyse

La mesure de l'activité PAL est impactée de façon négative par l'hémolyse, mais uniquement pour une activité PAL normale. En effet pour une activité PAL à 1 $\mu\text{kat/L}$, il y a diminution de l'activité mesurée à partir d'une concentration en hémoglobine de 140 $\mu\text{mol/L}$ (2,3 g/L). Cette diminution augmente proportionnellement jusqu'à une hémoglobinémie de 750 $\mu\text{mol/L}$ (12,1 g/L), puis devient moins importante au-delà mais reste significative. Par contre, pour une activité PAL élevée (3,8 et 15 $\mu\text{kat/L}$), aucun impact de l'hémolyse n'est retrouvé quelle que soit la valeur d'hémoglobine testée sur une gamme de 0 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$ (0 à 32,2 g/L). (Figure 28-A)

2) Lipémie

Aucune interférence n'est observée sur la mesure de l'activité PAL quelle que soit la valeur testée (0.84 $\mu\text{kat/L}$ et 4.53 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 28-B)

3) Ictère

Sur la mesure de l'activité PAL une interférence négative apparaît au-delà d'un indice d'ictère de 835 pour une valeur normale d'activité PAL (0.8 $\mu\text{kat/L}$). Aucune interférence n'est observée pour une activité PAL élevée (4.3 $\mu\text{kat/L}$). (Figure 28-C)

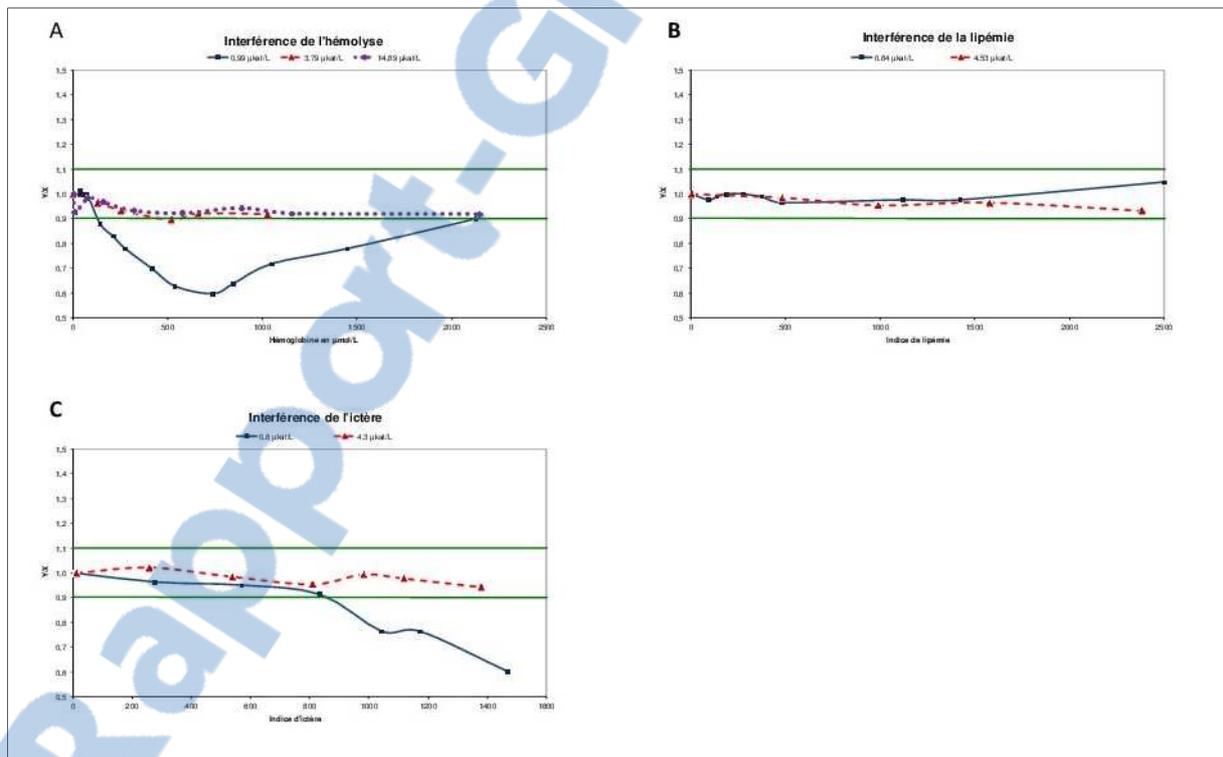


Figure 28 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la phosphatase alcaline
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine(C).

Phosphatase alcaline	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales ($<1.0 \mu\text{kat/L}$)	Sous estimation	Absence d'interférence	Sous estimation
Valeurs normales ($>3.7 \mu\text{kat/L}$)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 21 : Interférences observées sur le dosage de la phosphatase alcaline

4) *Hémolyse*

Une interférence négative que l'on peut qualifier de physique et/ ou chimique s'observe uniquement pour une faible activité PAL. Contrairement aux autres interférences négatives rencontrées pour l'hémolyse, cette interférence semble se corriger pour de fortes concentrations en hémoglobine.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont variables : inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur pour une valeur normale d'activité PAL et supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur pour des valeurs pathologiques.

5) *Lipémie*

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Une interférence négative que l'on peut qualifier de physique et/ou chimique s'observe uniquement pour une faible activité PAL pour des très fortes concentrations en ditaurate de bilirubine.

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs ou comparables à ceux annoncés par le fournisseur.

XXI. Protéines totales

1) Hémolyse

L'hémolyse interfère de façon positive sur le dosage des protéines totales. La valeur d'hémoglobininémie à partir de laquelle on observe une augmentation de mesure de plus de 10 % est de 400 $\mu\text{mol/L}$ (6,4 g/L) pour une valeur de protéines totales normale. L'interférence est présente dès 250 $\mu\text{mol/L}$ (4,0 g/L) pour des valeurs de protéines totales inférieures aux valeurs usuelles. Cette augmentation est ensuite proportionnelle à l'importance de l'hémolyse tant pour une valeur normale (69 g/L) que basse (36 g/L). (Figure 29-A)

Cette interférence est directement liée à la surcharge protéique induite par l'hémoglobine car si l'on déduit de la valeur de PT mesurée la valeur d'hémoglobine, on trouve des résultats compris entre $\pm 10\%$. (Figure 29-B)

2) Lipémie

La lipémie n'interfère pas sur la mesure des protéines totales pour une valeur faible de protéines (29 g/L) comme pour une valeur élevée (99 g/L). (Figure 29-C)

3) Ictère

Une interférence négative impacte la mesure des protéines totales quel que soit le niveau de concentration testé (29.9 et 73.8 g/L). Cette interférence apparaît précocement pour les faibles concentrations de protéines totales (avant un indice d'ictère de 277) et plus tardivement pour de forte concentration (indice d'ictère à 492). (Figure 29-D)

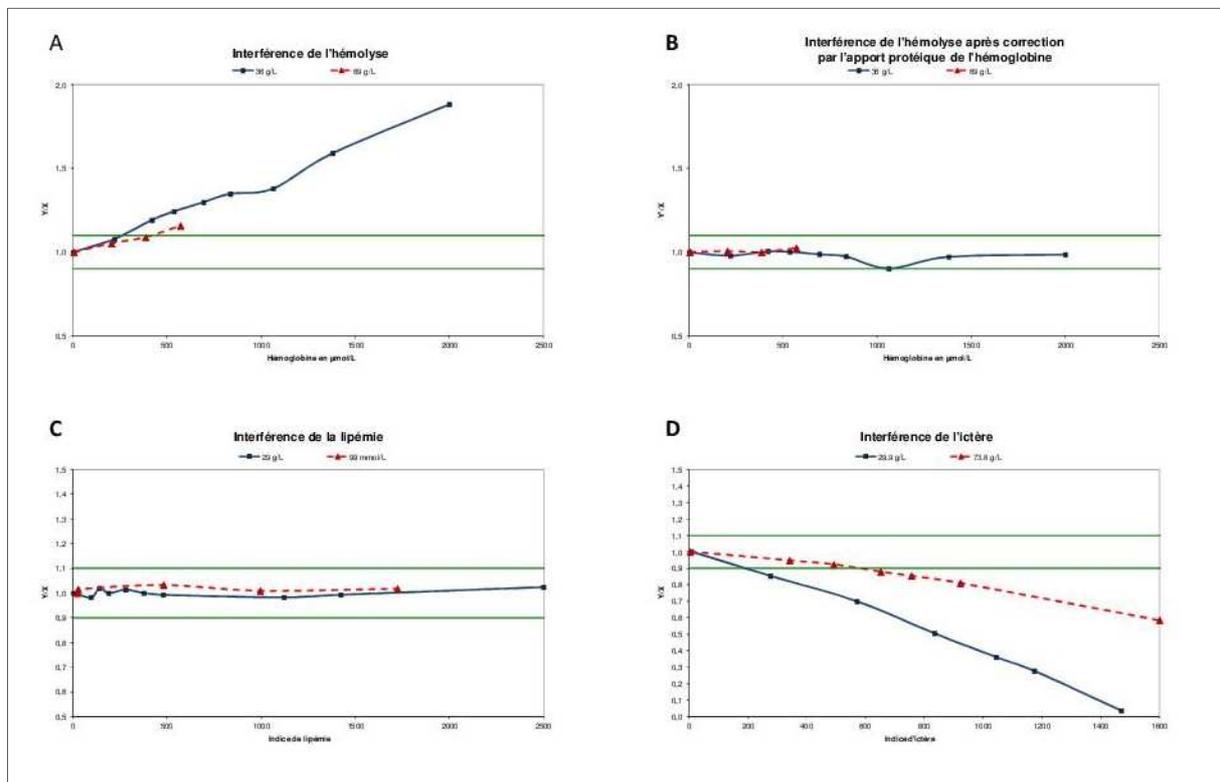


Figure 29 : Résultats expérimentaux pour le dosage des protéines totales
Surcharge en hémoglobine avant (A) et après correction par l'apport protéique de l'hémoglobine (B). Surcharge en Intralipid® (C). Surcharge en ditaurate de bilirubine (D).

Protéines totales	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (<36 g/L)	Surestimation	Absence d'interférence	Sous estimation
Valeurs normales à élevées (>68 g/L)	Surestimation	Absence d'interférence	Sous estimation

Tableau 22 : Interférences observées sur le dosage des protéines totales

4) *Hémolyse*

L'interférence de l'hémolyse observée sur le dosage des protéines totales est principalement due à un effet pré-analytique. L'hémoglobine libérée lors de la lyse érythrocytaire est dosée comme toutes les autres protéines par la méthode de Biuret. Il s'agit donc d'une interférence d'apport. L'interférence est ainsi positive et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

5) *Lipémie*

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

L'interférence négative et proportionnelle à la concentration de ditaurate de bilirubine qui impacte le dosage des protéines totales peut être qualifiée d'interférence chimique ou physique.

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs ou comparables à ceux annoncés par le fournisseur.

XXII. Protéine S100 β

1) Hémolyse

Aucune interférence de l'hémolyse (hémoglobininémie testée de 0 à 1 150 $\mu\text{mol/L}$ soit 18,5 g/L) n'est observée sur le dosage de la protéine S100 β , pour des valeurs normales : 0,06 $\mu\text{g/L}$ comme pour des valeurs élevées jusqu'à 1,96 $\mu\text{g/L}$. (Figure 30-A)

2) Lipémie

Aucune interférence de la lipémie n'est observée sur le dosage de la protéine S100 β , pour des valeurs normales (0,09 $\mu\text{g/L}$) comme pour des valeurs élevées (1.1 $\mu\text{g/L}$). (Figure 30-B)

3) Ictère

L'interférence de la bilirubine conjuguée n'a pas été explorée pour le dosage de la protéine S100 β .

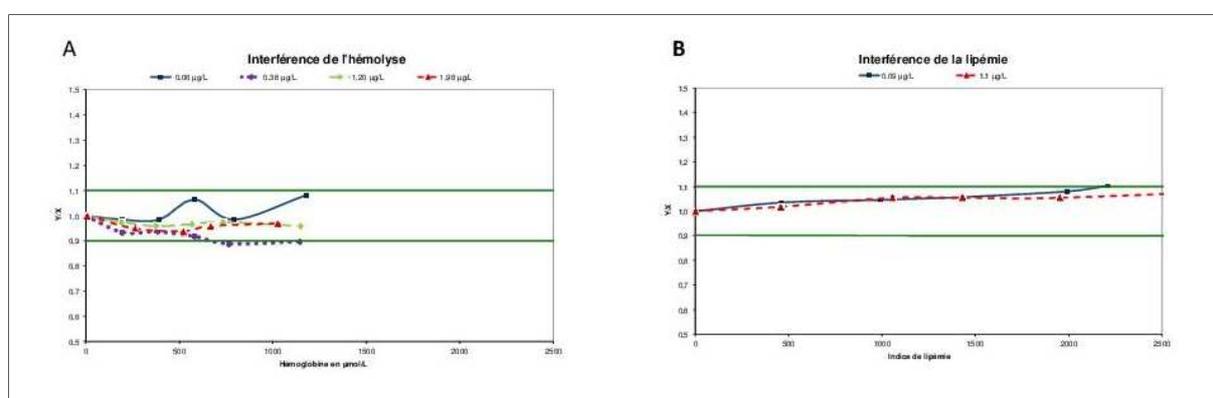


Figure 30 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la protéine S100 β
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B).

S100 β	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales ($<0.38 \mu\text{g/L}$)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Non déterminée
Valeurs élevées ($>1.0 \mu\text{g/L}$)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Non déterminée

Tableau 23 : Interférences observées sur le dosage de la protéine S100 β

Aucune interférence n'a été reportée pour le dosage de la protéine S100 β .

Que ce soit pour l'hémolyse ou la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XXIII. Triglycérides

1) Hémolyse

Selon la valeur de triglycérides, l'hémolyse interfère de façon positive ou non sur la mesure. En effet, pour une valeur de triglycérides normale, l'interférence apparaît pour une valeur d'hémoglobine de 400 $\mu\text{mol/L}$ (6,4 g/L), tandis qu'aucune interférence n'est observée jusqu'à plus de 1 100 $\mu\text{mol/L}$ (17,7 g/L) d'hémoglobine pour une valeur de triglycérides de 3 mmol/L. (Figure 31-A)

2) Lipémie

L'interférence de l'hémolyse n'a pas été explorée pour le dosage des triglycérides.

3) Ictère

Une interférence négative apparaît sur la mesure des triglycérides sur une valeur normale (0.65 mmol/L) comme sur une valeur élevée (2.53 mmol/L). Cette interférence impacte la mesure précocement avec des indices limites d'ictère respectivement de 88 et 112 pour des valeurs normales et pathologiques de triglycérides. (Figure 31-B)

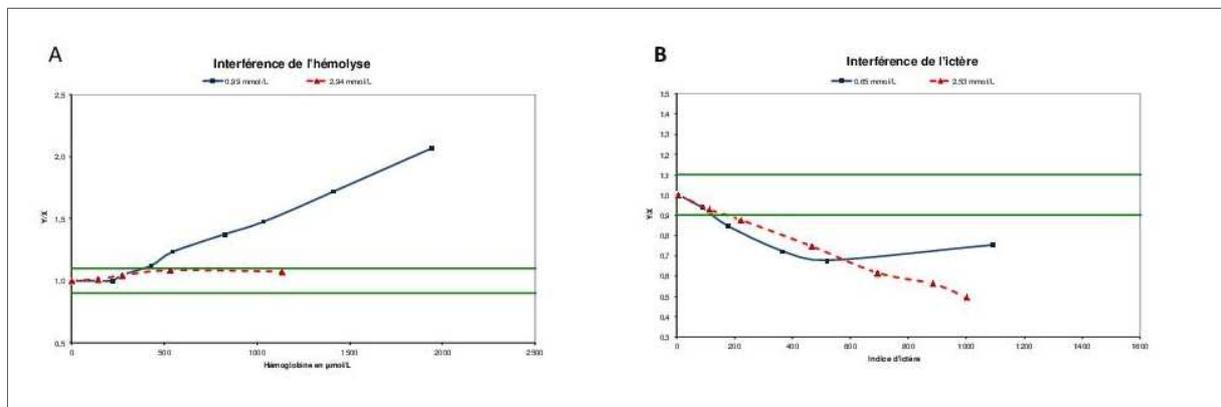


Figure 31 : Résultats expérimentaux pour le dosage des triglycérides
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en ditaurate de bilirubine (B).

Triglycérides	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (<1 mmol/L)	Surestimation	Non déterminée	Sous estimation
Valeurs élevées (>2.53 mmol/L)	Absence d'interférence	Non déterminée	Sous estimation

Tableau 24 : Interférences observées sur le dosage des triglycérides

4) Hémolyse

L'interférence de l'hémolyse observée uniquement pour le dosage d'une faible valeur de triglycérides est principalement due à un effet pré-analytique. La lyse de l'érythrocyte provoque la libération de triglycérides, un constituant important des membranes. Il s'agit donc d'une interférence d'apport. L'interférence est ainsi positive et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse, elle impacte d'autant plus le dosage que le paramètre est en faible concentration.

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont variables : inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur pour une valeur faible de triglycérides et supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur pour des valeurs élevées.

5) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XXIV. Troponine T hs

1) Hémolyse

L'hémolyse interfère de façon négative sur la mesure de la troponine T hypersensible (méthode rapide STAT), dès 80 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobininémie (1,6 g/L) pour des valeurs de troponine de 38 ng/L (zone grise) et à partir de 110 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobininémie (1,8 g/L) pour une valeur de troponine à 270 ng/L. Cette interférence ne semble pas être de plus de - 40 % par rapport à la valeur réelle, quelle que soit l'importance de l'hémolyse. (Figure 32-A)

2) Lipémie

Aucune interférence de la lipémie n'est observée sur la mesure de la troponine T hypersensible pour des valeurs limites (45.9 ng/L) comme pour des valeurs élevées (380.7 ng/L). (Figure 32-B)

3) Ictère

Aucune interférence de la bilirubine conjuguée n'est observée sur la mesure de la troponine T hypersensible pour des valeurs limites (56 ng/L) comme pour des valeurs élevées (501 ng/L). (Figure 32-C)

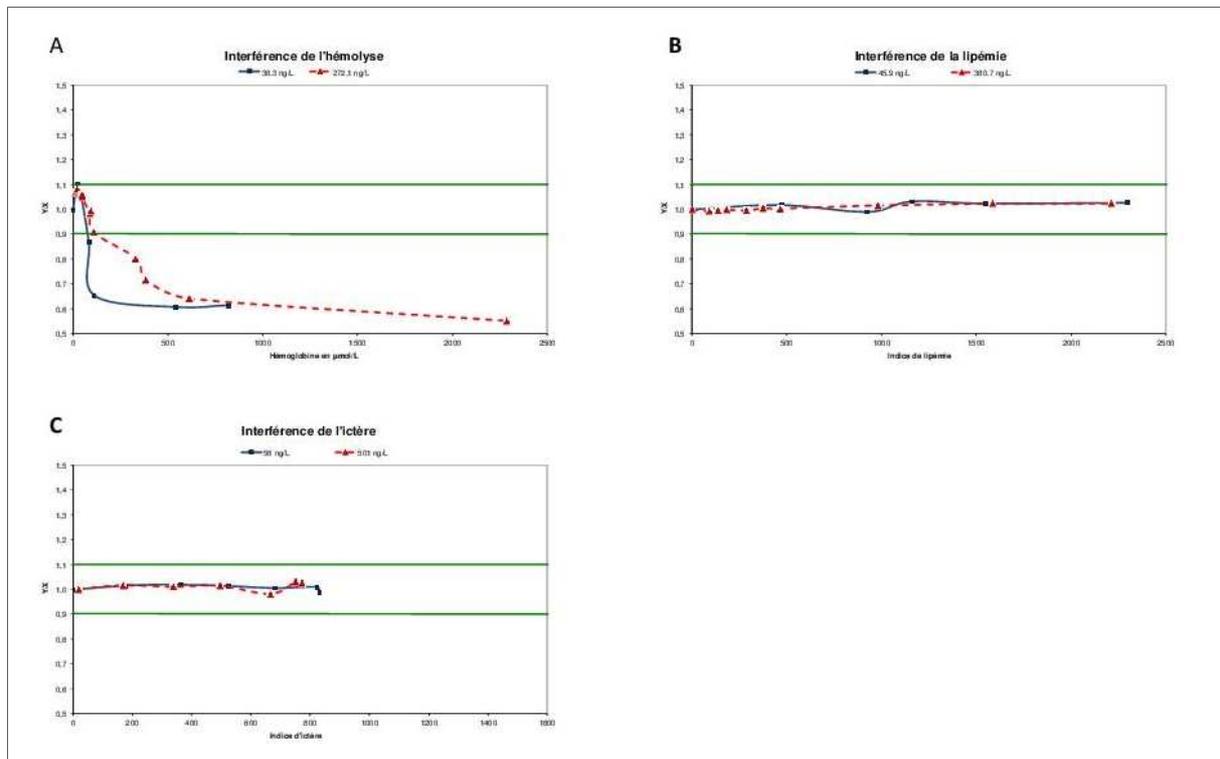


Figure 32 : Résultats expérimentaux pour le dosage de la troponine T hypersensible (méthode Stat)
Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® (B). Surcharge en ditaurate de bilirubine (C).

TNT hs	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs faibles (< 56 ng/L)	Sous estimation	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées (> 270 ng/L)	Sous estimation	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 25 : Interférences observées sur le dosage de la troponine T hs

4) *Hémolyse*

L'interférence négative observée pour le dosage de la troponine T hypersensible est une donnée majeure et bien documentée.(22,23,28) L'interférence est importante, apparaît précocement et peut entraîner des conséquences graves si elle est négligée. La libération de protéases intra-érythrocytaires suite à l'hémolyse serait la cause de ce phénomène. Il s'agirait donc d'une interférence chimique due à un effet pré-analytique.(29)

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont comparables voire supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

5) *Lipémie*

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

XXV. Urée

1) Hémolyse

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure de l'urée n'est observée pour les valeurs normales et élevées : 5,6 et 16,5 mmol/L. (Figure 33-A)

2) Lipémie

Une interférence négative est observée au-delà d'un indice de lipémie de 1500. Cette interférence est identique pour des valeurs basses (3.9 mmol/L) comme pour des valeurs élevées (14 mmol/L) d'urée plasmatique. (Figure 33-B)

Une dilution automatique au 1/6^{ème} corrige cette interférence. (Figure 33-C)

3) Ictère

Aucune interférence de la bilirubine conjuguée n'est observée sur la mesure de l'urée pour des valeurs normales (4.5 mmol/L) comme pour des valeurs élevées (16.2 mmol/L). (Figure 33-D)

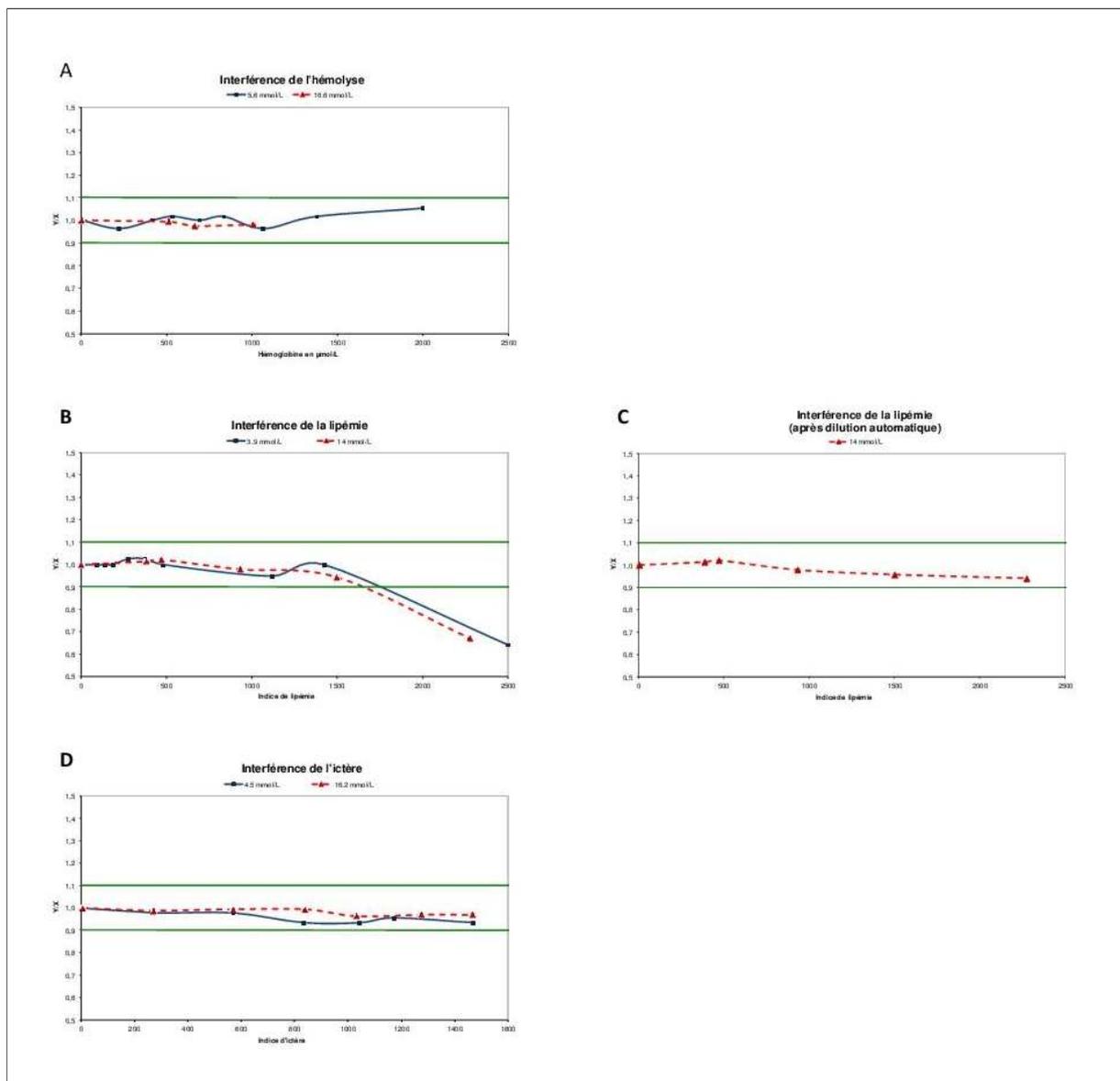


Figure 33 : Résultats expérimentaux pour le dosage de l'urée

Surcharge en hémoglobine (A). Surcharge en Intralipid® sans dilution (B) puis après dilution automatique (C). Surcharge en ditaurate de bilirubine (E).

Urée	Hémolyse	Lipémie	Ictère
Valeurs normales (< 5 mmol/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence
Valeurs élevées (> 14 mmol/L)	Absence d'interférence	Absence d'interférence	Absence d'interférence

Tableau 26 : Interférences observées sur le dosage de l'urée

4) *Hémolyse*

Concernant l'hémolyse, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur

5) *Lipémie*

Une interférence négative est constatée avec une surcharge importante en Intralipid®. Celle-ci relève principalement de l'interférence physique et semble être due en partie aux perturbations de la lecture spectrophotométrique par l'ajout d'Intralipid®. L'interférence est corrigée par la dilution automatique.

Concernant la lipémie, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

6) *Ictère*

Concernant l'ictère, les indices limites obtenus dans notre étude sont supérieurs à ceux annoncés par le fournisseur.

Paramètre	Données fournisseur			Données expérimentales					
	Valeur testée	Index d'hémolyse (exprimé en concentration d'hémoglobine)		Valeur étudiée	Index d'hémolyse déterminé	Valeur étudiée	Index d'hémolyse déterminé	Valeur étudiée	Index d'hémolyse déterminé
		µmol/L	g/L						
ALAT (µkat/L)	0,58	436	7	0,34	<u>44</u>	2,94	<u>305</u>		
ALB (g/L)	35	621	10	21	> 1999	40	> 795		
ASAT (µkat/L)	0,58	12	0,2	0,34	< 7	3,32	154	7,35	> 186
AUR (µmol/L)	417	621	10	211	> 1999	372	> 1101		
CA (mmol/L)	2,2*	621	10	1,13	> 1999	2,44	> 1346		
CK (µkat/L)	2,34	124	2	1,64	<u>44</u>				
CRE (µmol/L)	80	621	10	62	693	268	> 1000		
CRP (mg/L)	5	621	10	35	> 1999	182	> 1037		
CT (mmol/L)	5,2	436	7	2,19	<u>144</u>	3,69	<u>269</u>		
GLU (mmol/L)	3,9	621	1000	3,2	527	7,0	1059	15,9	> 633
GGT (µkat/L)	0,67	124	2	0,83	540	7,12	587		
LDH (µkat/L)	3,34	9	0,15	2,84	< 7				
LIP (µkat/L)	1	621	10	0,6	835	1,47	<u>272</u>	3,54	< 531
Mb (µg/L)	NC	869	14	43	890				
Mg (mmol/L)	0,7	496	8	0,45	429				
NT-pro BNP (µg/L)	NC	621	10	196	> 1056	1830	> 1999		
P (mmol/L)	0,87	186	3	0,65	<u>74</u>				
PAL (µkat/L)	1,67	124	2	0,99	<u>74</u>	3,79	> 1027	14,89	> 2147
PT (g/L)	66	621	10	36	<u>220</u>	69	<u>385</u>		
S100 (µg/L)	NC	621	10	0,06 0,09	> 1177	0,38	> 1145	1,20 1,96	> 1140 > 1028
TG (mmol/L)	2,3	436	7	0,99	<u>282</u>	2,94	> 1136		
TNThs (ng/L)	>100*	62	1	38,3	83	272,1	109		
UR (mmol/L)	8,3	621	10	5,6	> 1999	16,6	> 1006		

Tableau 27 : Concentrations étudiées et indices limites correspondant pour l'hémolyse

Pour chaque paramètre sont précisées: les données fabricants (valeur du paramètre pour laquelle a été déterminé l'indice de lipémie et indice de lipémie à partir de laquelle une interférence est signalée) les données expérimentales (valeurs testées au laboratoire et indice de lipémie déterminé expérimentalement pour cette valeur). L'indice de l'hémolyse correspond à la concentration en hémoglobine® la plus faible donnant un résultat supérieur à plus ou moins 10% par rapport à la valeur attendue. En italique les indices expérimentaux supérieurs à ceux fournis par le fabricant, en souligné les indices expérimentaux inférieurs à ceux fournis par le fabricant. NC = données non communiquées.

Paramètre	Données fournisseur		Données expérimentales					
	Valeur testée	Indice de lipémie	Valeur étudiée	Indice de lipémie	Valeur étudiée	Indice de lipémie	Valeur étudiée	Indice de lipémie
ALAT (μkat/L)	0,58	150	0.26	<u>92</u>	3.37	142		
ALB (g/L)	35	550	16	<u>278</u>	37	467		
ASAT (μkat/L)	0,58	150	0.37	188	2.63	217		
AUR (μmol/L)	417	1500	163	>2242	362	> 2308		
CA (mmol/L)	2,2*	1000	2.14	>1983	2.76	>1346		
CK (μkat/L)	2,34	1000	0.97	1120	4.13	984		
CRE (μmol/L)	80	800	43	984	236	904		
CRP (mg/L)	5	1000	18	>2289	73	>2377		
CT (mmol/L)	5,2	2000	2,87	>2248	3,79	>2287		
GGT (μkat/L)	0,67	1500	1.05	<u>1120</u>	3.93	>2395		
GLU (mmol/L)	3,8	1000	3.2	1422	14.9	2645		
HDL-C (mmol/L)	1	1800	0,68	>2287	0,79	>2248		
LDH (μkat/L)	3.34	1500	2.45	1624	7.10	<u>1205</u>		
LIP (μkat/L)	1	2000	0.59	>2515	3.46	>2399		
Mb (μg/L)	NC	2200	54	>2296	1293	>2187		
Mg (mmol/L)	0,7	2000	0.47	>2515				
NT-pro BNP (μg/L)	NC	1500	31.5	>2280	1118	>2215	2555	>2320
P (mmol/L)	0,87	1250	0.43	1146				
PAL (μkat/L)	1,67	2000	0.84	>2515	4.53	>2385		
PT (g/L)	66	2000	29	>2515	99	>1723		
S100 (μg/L)	NC	1500	0.09	2209	1.1	>3000		
TNT hs (ng/L)	>100*	1500	45.9	>2296	380.7	>2215		
UR (mmol/L)	8,3	1000	3.9	1422	14.0	1500		

Tableau 289 : Concentrations étudiées et indices limites correspondant pour la lipémie

Pour chaque paramètre sont précisées: les données fabricants (valeur du paramètre pour laquelle a été déterminé l'indice de lipémie et indice de lipémie à partir de laquelle une interférence est signalée) les données expérimentales (valeurs testées au laboratoire et indice de lipémie déterminé expérimentalement pour cette valeur). L'indice de lipémie correspond à la concentration en Intralipid® la plus faible donnant un résultat supérieur à plus ou moins 10% par rapport à la valeur attendue. En italique les indices expérimentaux supérieurs à ceux fournis par le fabricant, en souligné les indices expérimentaux inférieurs à ceux fournis par le fabricant. En gras les indices expérimentaux identiques à ceux fournis par le fabricant. NC = données non communiquées.

Paramètre	Données fournisseur		Données expérimentales			
	Valeur testée	Indice d'ictère	Valeur étudiée	Indice d'ictère	Valeur étudiée	Indice d'ictère
ALAT (μkat/L)	0,58	1026	0.23	<u>785</u>	1.93	>1240
ALB (g/L)	35	1026	25	>2059	38	>1322
ASAT (μkat/L)	0,58	1026	0.39	1470	3.85	1200
AUR (μmol/L)	417	684	226	838	353	>737
CA (mmol/L)	2,2*	1026	1.74	>1670	2,16	>1325
CK (μkat/L)	2,34	1026	1.02	1470	14.95	1027
CRE (μmol/L)	80	86	62	101	359	>805
CRP (mg/L)	5	1026	13	>1258	146	>1324
CT (mmol/L)	5,2	274	2.78	<u>133</u>	4.62	<u>189</u>
GGT (μkat/L)	0,67	855	0.97	>1470	2.64	>1348
GLU (mmol/L)	3,9	1026	3.3	>1470	12.0	>1281
HDL-C (mmol/L)	1	513	0,73	<u>257</u>	0,85	393
LDH (μkat/L)	3,34	1026	2.6	>1347	8	>1215
LIP (μkat/L)	1	855	0.58	>1470	3.11	>1470
Mb (μg/L)	NC	1112	48	>1470	1253	>1335
NT-pro BNP (μg/L)	NC	428	28	>838	1847	>815
PAL (μkat/L)	1,67	1026	0.8	835	4.3	>1380
PT (g/L)	66	342	29.9	<277	73.8	492
TG (mmol/L)	2,3	171	0,65	88	2,53	112
TNT hs (ng/L)	>100*	428	56	>832	501	>772
UR (mmol/L)	8,3	1026	4.5	>1470	16.2	>1470

Tableau 29 : Concentrations étudiées et indices limites correspondant pour l'ictère

Pour chaque paramètre sont précisées: les données fabricants (valeur du paramètre pour laquelle a été déterminé l'indice d'ictère et indice d'ictère à partir de laquelle une interférence est signalée) les données expérimentales (valeurs testées au laboratoire et indice d'ictère déterminé expérimentalement pour cette valeur). L'indice d'ictère correspond à la concentration en bilirubine conjuguée la plus faible donnant un résultat supérieur à plus ou moins 10% par rapport à la valeur attendue. En italique les indices expérimentaux supérieurs à ceux fournis par le fabricant, en souligné les indices expérimentaux inférieurs à ceux fournis par le fabricant. En gras les indices expérimentaux identiques à ceux fournis par le fabricant. NC = données non communiquées.

Discussion

I. Rappel des objectifs

L'objectif de cette étude est d'explorer les limites potentielles des principaux dosages de biochimie de routine et d'urgence vis-à-vis des interférences provoquées par l'hémolyse, la lipémie ou le caractère ictérique d'un échantillon plasmatique.

Ce type de travail est utilisé par les fournisseurs pour caractériser les interférences pouvant impacter un dosage et donc en définir les limites. Pour les laboratoires, cette procédure permet de valider les informations fournisseur voire de modifier ces données afin de satisfaire à ses propres critères de validation.

II. Méthodes utilisées

1. Hémolyse

1. Recommandations

Les recommandations du CLSI afin de tester les potentielles interférences de l'hémoglobine préconisent l'utilisation d'une concentration maximale de 2 g/L d'hémoglobine (soit 312 $\mu\text{mol/L}$). (2)

Ces recommandations préconisent également la préparation de l'hémolysat par choc osmotique.

2. Avantages et limites de la procédure utilisée

Parmi les principales études portant sur l'interférence de l'hémolyse, différentes procédures de préparation de l'hémolysat ont été utilisées. (2–8) Bien que la plupart utilisent le choc osmotique afin de lyser les érythrocytes, l'harmonisation de l'étape de préparation de l'hémolysat est un élément essentiel afin de pouvoir réaliser des comparaisons entre ces différentes études. (30)

Lors de notre étude, la préparation de l'hémolysat a été réalisée selon les recommandations du CLSI.

L'interférence de l'hémolyse a été testée pour des concentrations en hémoglobine supérieures à celles des recommandations du CLSI. Ce choix a été dicté d'une part par les données fournisseurs qui établissent des limites d'interférences au-delà de ces recommandations et d'autre part par la volonté d'observer le comportement de ces interférences au-delà de ces limites fournisseurs. Dans la pratique, on notera que même si l'hémolyse de l'échantillon est un phénomène courant, seuls les cas extrêmes nécessitent d'avoir des données sur une aussi grande plage de concentrations en hémoglobine libre. Dans nos conclusions, nous avons donc choisi de n'interpréter nos résultats que jusqu'à une concentration de 621 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobine.

2. Lipémie

1. Recommandations

Les recommandations du CLSI afin de tester les potentielles interférences de la lipémie préconisent de surcharger les échantillons avec une solution d'Intralipid® et de tester une concentration maximale de 1000 mg/dL d'Intralipid®. (31)

2. Avantages et limites de la procédure utilisée

Lors de notre étude, la méthode utilisée afin d'explorer l'interférence de la lipémie sur les dosages consiste à surcharger un échantillon avec une émulsion utilisée en nutrition parentérale. Cette méthode de surcharge ne reflète que partiellement les conséquences d'une lipémie pathologique.

D'une part, il est illusoire de penser reproduire l'ensemble des situations d'échantillons lipémiques avec une solution standardisée. L'interférence de la lipémie est due principalement à la turbidité elle-même fonction de la composition et de la taille des particules en suspension.(32) Dans notre étude, nous utilisons l'Intralipid® qui contient principalement des petits liposomes relativement denses et riches en phospholipides ainsi que des chylomicrons enrichis artificiellement en triglycérides.(33) En pratique, la lipémie pathologique est constituée d'un mélange complexe de lipides et de protéines propre à chaque situation clinique. (34) Concernant l'interférence de la lipémie, notre étude reflète donc surtout les situations d'échantillons lactescents ou opalescents qui font suite à l'administration ou l'utilisation de nutrition parentérale.

De plus, il faut noter que la linéarité de la relation entre la concentration en Intralipid® et la concentration en triglycérides mesurée sur la gamme n'est vérifiée que jusqu'à une concentration d'Intralipid® de 600 mg/dL.(Figure 8) Au-delà, le dosage des triglycérides est lui-même impacté par la lipémie des échantillons. Comme il est précisé par le fournisseur, en pratique, il n'y a donc pas de concordance satisfaisante entre l'indice de lipémie et la concentration en triglycérides.(35)

Cependant, bien qu'il existe des difficultés méthodologiques pour étudier l'interférence de la lipémie, et que certains auteurs expriment la volonté de supprimer l'utilisation de surcharge exogène d'Intralipid® (36), ce procédé le plus répandu reste celui recommandé par le CLSI.

Dans notre étude, l'interférence de la lipémie a été testée pour des concentrations en Intralipid® supérieures à celles des recommandations du CLSI. Ce choix a été dicté d'une part par les données fournisseurs qui établissent des limites d'interférences au-delà de ces recommandations et d'autre part, par la volonté d'observer le comportement de ces interférences au-delà de ces limites fournisseurs. Dans nos conclusions, nous avons suivi les recommandations du CLSI en ne considérant impactés que les paramètres dont le dosage était modifié pour des concentrations inférieures à 1000 mg/dL d'Intralipid®. Bien que très contributives lorsque l'on s'intéresse aux mécanismes d'interférences et à l'intérêt de la dilution, les interférences observées au-delà de cette limite ont été décrites mais non prises en compte. Elles sont d'ailleurs à nuancer puisque ce niveau de lipémie est rarement atteint en pratique clinique.

3. Ictère

1. Recommandations

Les recommandations du CLSI afin de tester les interférences de la bilirubine conjuguée préconisent l'utilisation de ditaurate de bilirubine à concentration maximale de 342 µmol/L (200mg/L).(2)

2. Avantages et limites de la procédure utilisée

Dans notre étude, la préparation de la solution de ditaurate de bilirubine a été réalisée selon les recommandations CLSI. Le ditaurate de bilirubine présente l'avantage d'être soluble en milieu aqueux contrairement à la bilirubine libre qui nécessite une solution alcaline. Les seules précautions à respecter lors de cette procédure sont celles concernant la conservation de la solution de

surcharge : à l'abri de la lumière, à 4°C et pendant au maximum 24 heures. Dans la littérature, ce réactif de synthèse est décrit et utilisé comme substitut chimique de la bilirubine conjuguée depuis de nombreuses années. (37) L'inconvénient de cette méthode de surcharge en ditaurate de bilirubine est de n'étudier que l'interférence de la bilirubine conjuguée. En effet, comme nous l'avons déjà exposé, les formes conjuguées ou non conjuguées de bilirubine présentent des spectres d'absorption ainsi que des propriétés chimiques légèrement différents.

Dans notre étude, l'interférence de la bilirubine conjuguée a été testée pour des concentrations supérieures à celles des recommandations du CLSI. Ce choix a été dicté d'une part par les données fournisseurs qui établissent des limites d'interférences au-delà de ces recommandations (jusqu'à 1112 µmol/L soit 650 mg/L) et d'autre part, par la volonté d'observer le comportement de ces interférences au-delà de ces limites fournisseurs. Dans nos conclusions, nous avons choisi de n'interpréter nos résultats que jusqu'à une concentration de 800 µmol/L de ditaurate de bilirubine. Ce seuil a été retenu en fonction des valeurs pathologiques maximales de bilirubine conjuguée rencontrées en cas d'ictère sévère. Les interférences observées au-delà de cette limite ont été décrites mais non prises en compte. Elles sont d'ailleurs purement informatives puisqu'elles ne correspondent pas à de réelles situations cliniques.

III. Définition de l'interférence significative

1. Recommandations

Les recommandations CLSI précisent l'obligation pour les fournisseurs de déclarer la plus faible concentration de la substance interférente entraînant un biais significatif. Pour autant, ces recommandations ne tranchent pas sur la définition du biais significatif. Dans son document le CLSI explique que chacun peut utiliser des critères différents pour estimer l'erreur acceptable tant que cette démarche est réalisée en amont de l'étude, condition garantissant l'objectivité des résultats. Ces critères dépendent de l'usage médical du test, ils peuvent être basés sur variations physiologiques du paramètre, sur l'expérience clinique que l'on a de son usage, sur les variabilités analytiques observées lors de son dosage ou sur la combinaison de plusieurs de ces critères.(2)

2. Limite utilisée et état de l'art

Lors de notre étude, le seuil de 10% de variation par rapport à la valeur vraie définissant une interférence sur la mesure, a été choisi en fonction des données fournisseur, de la littérature mais également compte tenu de l'incertitude de mesure déterminée dans notre laboratoire pour chacun des paramètres étudiés. (35–38)

Dans la littérature récente, la définition de l'interférence significative est réajustée. Certains auteurs dénoncent le fait que la plupart des fournisseurs utilisent arbitrairement le seuil de 10% de variation.(39) Selon les travaux de Fraser, une interférence significative apparaît lorsque que le résultat diffère de $\pm 1.96 \times (CVa^2 + CVb)^{1/2}$ du résultat attendu avec CVa : coefficient de variation analytique et CVb : coefficient de variation biologique.(40) Plusieurs études se basent sur les performances d'imprécision souhaitables ou DSI (desirable specification for imprecision) issues des travaux de Ricos et Al.(41) afin de définir leur limite interférence significative. (39,41–43) Cette démarche semble en effet plus appropriée, le critère d'acceptation est ajusté pour chaque analyte selon par exemple qu'il présente des variations biologiques faibles ou importantes. Plusieurs auteurs

réclament ainsi que les fournisseurs s’alignent sur cette définition de l’interférence significative mais en pratique cela n’est pas réalisé.(39,44)

Références	Critères d’interférence significative
Monneret et Al, 2015	10% $1.96((CVa^2+CVb^2)^{1/2})$ 1,96 X Cva
Nikolac et Al, 2013	DSI Ricos
Ji et Al, 2011	10%
Lippi et Al, 2006	DSI Ricos
Steen et Al, 2006	DSI Ricos
Grafmeyer et Al, 1995	CV Valtec
Ryder et Al, 1990	10%

Tableau 30 : Principales études et critères utilisés pour définir l’interférence significative

CLIA : Clinical Laboratory Improvement Amendments ; CVa : Coefficient de variation analytique ; CVb : Coefficient de variation biologique ; DSI : desirable specification for imprecision ; TAE : total allowable error

IV. Discussion selon le type de surcharge

1. Hémolyse

1. Classement des paramètres

1) *Absence d’interférence*

Pour certains paramètres, les dosages ne sont aucunement impactés par l’hémolyse quelle que soit la valeur du paramètre considérée (basse, normale ou élevée). Il s’agit des dosages d’albumine, d’acide urique, de calcium, de créatinine, de glucose, de myoglobine, de NT-ProBNP, de CRP, de protéine S100 β et d’urée. Pour tous ces paramètres, la présence dans l’échantillon d’hémoglobine jusqu’à une concentration de 621 $\mu\text{mol/L}$ (soit 10.0 g/L) voire 1000 $\mu\text{mol/L}$ (soit 16,1 g/L) ou 2 000 $\mu\text{mol/L}$ (32,2 g/L) n’entraîne aucune erreur sur la mesure.

L’ictère et la lipémie n’interfèrent pas non plus sur ces paramètres à l’exception des dosages d’albumine (impacté par la lipémie), de créatinine (impacté par l’ictère) et de protéine S100 β (paramètre pour lequel l’interférence de l’ictère n’a pas été étudiée).

2) *Interférences d’apport : Paramètres augmentés de façon proportionnelle au degré d’hémolyse*

Il s’agit des paramètres pour lesquels les valeurs intra-érythrocytaires sont très supérieures aux valeurs plasmatiques et donc où l’hémolyse impacte le résultat de façon positive et proportionnelle: ASAT, CK, LDH, Mg, P, PT. Bien que le mécanisme causant l’interférence soit le même, les limites d’indice sont variables car elles dépendent du rapport intra-érythrocytaire/plasma de l’analyte considéré. La LDH, le phosphore et l’ASAT sont les paramètres pour lesquels les rapports intra-érythrocytaire/plasma sont les plus élevés. C’est évidemment pour ces paramètres que l’on retrouve les indices limites expérimentaux ou fournisseurs les plus faibles.

L’interférence de l’hémolyse pour ces paramètres est d’autant plus précoce et plus importante que le paramètre est en faible concentration. Pour l’ASAT, bien que la quantité intra-érythrocytaire soit

élevée, des valeurs d'ASAT à plus de 10 fois ou 20 fois la normale ne sont pas impactées par l'hémolyse et peuvent être rendues jusqu'à une valeur d'hémoglobine de 200 $\mu\text{mol/L}$ (3.2 g/L).

Globalement, concernant le dosage de ces paramètres, les indices limites obtenus dans notre étude sont légèrement inférieurs à ceux indiqués dans les fiches techniques fournisseurs ainsi qu'à ceux publiés.(25,45) Cela est probablement dû au fait que ces limites sont dépendantes de la concentration du paramètre. Les concentrations non pathologiques que nous avons testées sont en effet inférieures à celles utilisées par notre fournisseur. (Tableau 28)

Lors de notre étude portant sur l'hémolyse, les interférences positives sont principalement dues à un effet pré-analytique. Toutes ces interférences positives peuvent être qualifiées d'interférences d'apport à l'exception de l'interférence sur le dosage de la créatine kinase.

3) Interférences physiques ou chimiques : paramètres pour lesquels l'interférence est variable en fonction de la valeur du paramètre

Les problèmes d'interférence spectrale ou d'interférence chimique ne se manifestent pas systématiquement de façon proportionnelle à l'importance de l'hémolyse ni sur l'ensemble de la gamme de mesure. Ceci est observé que l'interférence soit négative (sous estimation du paramètre) ou positive (surestimation du paramètre). En règle générale l'interférence est plus importante pour les valeurs normales du paramètre mais devient beaucoup plus faible voire négligeable pour des valeurs élevées, rendant alors tout à fait possible le rendu du résultat sans risque de sur ou sous estimation. Par exemple pour le dosage des PAL, la présence d'hémoglobine entraîne une sous estimation du résultat mais ceci n'est observé que pour des valeurs normales, des valeurs de PAL élevées ne sont pas sous estimées jusqu'à des concentrations en hémoglobine supérieures à 1000 $\mu\text{mol/L}$. (16.1 g/L). De la même façon la surestimation de la créatinine n'est observée que pour des valeurs normales ou basses, les valeurs élevées n'étant pas impactées.

A noter un effet inverse observé pour la lipase, à savoir une interférence de l'hémolyse plus importante sur les valeurs élevées que sur les valeurs basses.

2. Cas de la troponine T

Parmi les dosages impactés par l'hémolyse, on retrouve celui de la troponine T hs. Avec la technique utilisée, le cut-off d'exclusion (correspondant au 99^{ème} percentile d'une population de référence saine) est de 14 ng/L et le cut-off d'inclusion est de 50 ng/L. Un résultat compris entre 14 et 50 ng/L nécessite un suivi de la cinétique effectué sur un 2^{ème} prélèvement réalisé 3 heures après le premier. Une augmentation de plus de 30% de la valeur de troponine T étant en faveur d'un SCA.

On observe une interférence négative qui apparaît dès 80 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobinémie (1,6 g/L) pour des valeurs de troponine de 38 ng/L (zone grise) et à partir de 110 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobinémie (1,8 g/L) pour une valeur de troponine à 270 ng/L.

Pour la valeur de 38 ng/L, l'interférence induit une sous-estimation de plus 30% dès une concentration d'hémoglobine de 111 $\mu\text{mol/L}$ (1.8 g/L). Cette sous-estimation est problématique car d'une part elle impacte des concentrations critiques d'un point de vue décisionnel et d'autre part la fréquence des échantillons hémolysés est supérieure dans les services d'urgence.(46) Certains auteurs rapportent ainsi que 3% des demandes de dosages de troponine sont rejetées du fait d'une hémolyse.(22)

L'interférence de l'hémolyse sur le dosage de la troponine fait l'objet de nombreuses publications qui se surajoutent au fur et à mesure de l'amélioration des méthodes de dosages et de l'évolution des automates. Le dosage de la troponine T cardiaque n'est pas le seul à être impacté, en effet, on retrouve également une interférence de l'hémolyse sur le dosage de la troponine I cardiaque avec dans ce cas une surestimation de sa concentration. (22,47,48)

Le mécanisme de l'interférence de l'hémolyse sur ce dosage n'est pas totalement connu. Certains auteurs avancent l'hypothèse d'une interférence négative propre à l'hémoglobine associée à la libération de protéases intra-érythrocytaires.(29) Lors de notre étude, nous n'avons pas investigué l'origine de cette interférence mais nous avons constaté que la sous-estimation ne dépassait jamais les 40 %, quelle que soit l'importance de l'hémolyse.

L'interférence de l'hémolyse est donc une voie d'amélioration pour les fabricants, l'objectif étant de disposer de dosages non impactés. A ce titre 2 méthodes de dosages de troponine cardiaque (T et I) sur sang total ont été décrites comme non impactées par l'hémolyse, ces méthodes ne répondant toutefois pas aux exigences de CV <10% au 99^{ème} percentile.(49)

2. Lipémie

1. Classement des paramètres

1) *Paramètres non impactés par la lipémie*

Dans notre étude, un certain nombre de paramètres ne semblent aucunement impactés par la lipémie, il s'agit de l'acide urique, du calcium, de la créatine kinase, de la créatinine, de la CRP, du cholestérol total, de la gamma glutamyl-transférase, du glucose, du HDL-cholestérol, de la lactate déshydrogénase, de la lipase, de la myoglobine, du magnésium, du NT-ProBNP, du phosphore, des phosphatases alcalines, des protéines totales, de la protéine S100, de la troponine T hypersensible et de l'urée. Pour ces paramètres, aucune variation supérieure à plus ou moins 10% par rapport à la référence n'est observée sur la plage de lipémie s'étendant d'une concentration d'Intralipid® 92 à 1000 mg/dL ainsi que sur deux valeurs du paramètre à l'exception du magnésium (1 valeur) et du NT-ProBNP (3 valeurs).

Parmi ces 20 paramètres, nous en retiendrons même 17 (AUR, CA, CRE, CRP, CT, GGT, HDL-C, LDH, LIP, Mb, Mg, NT-ProBNP, P, PAL, PT, S100, TNT hs) pour lesquels la fiabilité du résultat est assurée au-delà l'indice fournisseur maximal (2200 mg/dL).

2) *Paramètres perturbés par la lipémie:*

Parmi les paramètres perturbés par la lipémie, on recense l'alanine amino-transférase, l'albumine et l'aspartate amino-transférase. Pour l'ALAT et l'ASAT, l'interférence observée est indépendante de l'activité mesurée. En revanche, l'interférence négative observée sur la mesure de l'albumine semble être d'autant plus importante pour des valeurs faibles d'albuminémie. (Figure11-B)

2. Potentiométrie directe/ indirecte

En dehors des paramètres dont les dosages sont précédemment décrits comme étant impactés par la lipémie, le biologiste devra également être attentif aux mesures électrolytiques effectuées en potentiométrie indirecte. Ce phénomène bien connu entraîne un risque de conclure à de fausses hyponatrémies et fausses hypokaliémies.(16,17)

3. Ictère

1. Classement des paramètres

1) *Paramètres non impactés par l'ictère*

Dans notre étude, un certain nombre de paramètres ne semblent pas impactés par le caractère ictérique de l'échantillon, il s'agit de l'alanine amino-transférase, de l'albumine, de l'aspartate amino-transférase, de l'acide urique, du calcium, de la créatine kinase, de la CRP, de la gamma-glutamyl-transférase, du glucose, de la lactate déshydrogénase, de la lipase, de la myoglobine, du NT-ProBNP, des phosphatases alcalines, de la troponine T hypersensible et de l'urée. Pour ces paramètres aucune variation supérieure à plus ou moins 10% par rapport à la référence n'est observée sur une plage d'indice d'ictère testé s'étendant de 0 à 800 (soit pour des concentrations de bilirubine conjuguée de 0 à 800 $\mu\text{mol/L}$) ainsi que sur deux valeurs du paramètre.

2) *Paramètres perturbés par l'ictère:*

Parmi les paramètres perturbés par la bilirubine conjuguée, on recense la créatinine, le cholestérol total, le HDL-cholestérol, les protéines totales et les triglycérides. L'interférence observée est dépendante de la valeur du paramètre pour la créatinine, le cholestérol total, le HDL-cholestérol et les protéines totales. En effet, l'interférence apparaît précocement pour des concentrations faibles du paramètre dosé, mais plus tardivement voire disparaît pour de fortes concentrations du paramètre. L'interférence constatée sur la mesure des triglycérides apparaît quant à elle pour un indice d'ictère équivalent à 100 quelle que soit la concentration en triglycérides testée.

2. Cas du dosage de la créatinine

Parmi les paramètres dont le dosage est impacté par l'ictère à bilirubine conjuguée, on retrouve la créatinine. Cette interférence est bien connue du biologiste. Pour autant les résultats de notre étude permettent de minimiser son impact pour des concentrations élevées de créatinine; une information certes connue mais non indiquée par le fournisseur.

L'interférence de la bilirubine conjuguée sur le dosage de la créatinine est du même type que celle observée pour l'hémoglobine sur les dosages d'ASAT. En effet, l'interférence n'impacte le dosage que pour des valeurs faibles ou normales des paramètres testés. Il est ainsi tout à fait justifié de rendre une valeur de créatinine élevée malgré un échantillon ictérique en précisant en commentaire le sens de l'interférence.

V. Quels dosages sont les moins impactés ?

Lors de notre étude, nous avons retrouvé différentes interférences sur de nombreux dosages colorimétriques et enzymatiques, mais une seule sur les dosages immunologiques (celle de l'hémolyse sur le dosage de la troponine T hs). Les méthodes de dosages immunologiques sont de loin les moins soumises à ce type de perturbations. (25,48,50,51)

Le fait que parmi les 5 dosages immunologiques étudiés, seul le dosage de la troponine T hs soit soumis à une interférence est plutôt en faveur d'une interférence pré-analytique avec une potentielle intervention de protéases qui dégraderaient la troponine T cardiaque.(22–24)

VI. Quelles longueurs d'ondes semblent les plus concernées ?

La longueur d'onde principale utilisée lors de la mesure spectrophotométrique est un paramètre important concernant les interférences de l'hémolyse, de l'ictère et de la lipémie.

1. Hémolyse

Les principales bandes d'absorption de l'hémoglobine sont situées à 415 nm, 540 nm et 578 nm. Théoriquement les dosages réalisés à des longueurs d'ondes proches de ces pics d'absorption sont susceptibles d'être fortement impactés par l'hémolyse.

Pourtant, il est difficile d'étudier les longueurs d'onde spécifiques aux dosages impactés puisque dans 1 cas sur 2, l'interférence constatée est due principalement à un mécanisme d'apport pouvant de plus masquer une interférence spectrale. Parmi les dosages impactés autrement que par une interférence d'apport (ALAT, LIP, PAL), on ne retrouve aucune longueur d'onde de mesure commune à l'ensemble des paramètres.

Il est aussi intéressant de noter que pour une même longueur d'onde de 570 nm, un dosage peut être impacté (PAL) ou non (ALB).

2. Lipémie

Les lipoprotéines présentes dans les échantillons lipémiques ont la capacité d'absorber la lumière. La quantité de lumière absorbée est alors inversement proportionnelle à la longueur d'onde utilisée et décroît ainsi entre 300 à 700 nm sans aucun pic d'absorption spécifique. Les lectures spectrophotométriques réalisées à de faibles longueurs d'onde sont donc particulièrement sensibles à la lipémie.(13)

Nos résultats montrent que les longueurs d'onde primaires pour lesquelles on observe des interférences sont de 340 et 570 nm. Ce constat est conforté par l'étude de l'interférence pour des concentrations d'Intralipid® supérieures à celles recommandées par le CLSI où 7 paramètres parmi les 9 impactés utilisent une lecture à 340 nm.

3. Ictère

La bilirubine conjuguée présente une absorption maximale entre 350 et 520 nm.

Cinq dosages sont impactés par la bilirubine conjuguée : ceux de la créatinine, du cholestérol total et des triglycérides nécessitent tous trois une lecture d'absorbance à 505 nm. L'interférence de la bilirubine conjuguée touche donc l'ensemble des dosages utilisant cette longueur d'onde de mesure. Les longueurs d'ondes de lecture pour les dosages du HDL-cholestérol et des protéines totales, également impactés, sont respectivement de 600 et 546 nm.

VII. Selon le sens de l'interférence

1. Hémolyse

Le dosage de 13 paramètres est impacté par l'hémolyse (ALAT, ASAT, CK, CT, GGT, LDH, LIP, Mg, P, PAL, PT, TG, TNT).

Pour 9/13 paramètres, on constate une surestimation qui dans 8/9 cas est la conséquence d'un effet pré-analytique.

Pour 4/13 paramètres impactés par l'hémolyse, on constate une sous-estimation. A l'exception du dosage de troponine T cardiaque, on peut qualifier ces interférences de spectrale (ALAT) ou physico-chimiques (LIP et PAL).

2. Lipémie

Les 3 dosages impactés par la lipémie au sens du CLSI conduisent à une sous-estimation du résultat.

Pour des concentrations d'Intralipid® allant au-delà du seuil recommandé par le CLSI, 9 dosages sont impactés. L'interférence est négative dans 7/9 cas et celle-ci-apparaît de façon indépendante de la valeur du paramètre dans 5/7 cas.

3. Ictère

L'interférence est négative pour les 5 dosages impactés par la bilirubine conjuguée.

VIII. Mesures de prévention et solutions

1. Phase pré-analytique

1. Réalisation des prélèvements, dispositifs utilisés, transport et centrifugation

Le dialogue avec les services de soins et le rappel des bonnes pratiques de prélèvement sont des éléments indispensables qui permettent de diminuer la fréquence des prélèvements hémolysés. Ce constat a notamment été fait au sein de plusieurs études portant sur des services d'urgences dans lesquels la fréquence des prélèvements hémolysés était significativement augmentée.(46,52,53)

Afin de réduire les échantillons lipémiques, en particulier en ville et en dehors des situations d'urgence, il est également important d'informer les patients des conditions de réalisation du prélèvement notamment lorsqu'il s'agit de l'observance d'une période de jeûne.(13)

Le choix éclairé des dispositifs de prélèvement dont celui des tubes est crucial. L'anticoagulant et le vide préexistant sont des facteurs susceptibles de modifier la fréquence de l'hémolyse *in vitro* et son impact.(54,55) Le transport, notamment lorsqu'il est réalisé par pneumatique(54–57) ainsi que la centrifugation sont aussi des éléments à prendre en compte et à maîtriser.(56–58)

2. Élimination physique des impuretés

Un des moyens permettant de s'affranchir des interférences est le pré-traitement de l'échantillon qui a pour objectif l'élimination physique des substances interférentes.

Certaines méthodes anciennes consistent à prévenir le contact entre l'un ou l'autre des constituants de l'échantillon et le réactif en employant des procédés chimiques ou physiques tels que des membranes de dialyse. Bien que quelques appareils aient déjà été pourvus de ce type de système avec un certain succès, ces méthodes, peu adaptées à l'automatisation, ont été délaissées.(20,59)

Le pré-traitement des échantillons hémolysés est inefficace et sans intérêt.

Les situations d'hyperlipémie sont celles qui poussent le plus à l'emploi de ces méthodes. L'ultracentrifugation à des vitesses comprises entre 200 000 à 600 000 *g* est la solution recommandée par le CLSI.(31) Cependant, celle-ci n'est pas adoptée en routine, du fait de son coût et de la perte de temps qu'elle pourrait occasionner. Lorsqu'un pré-traitement est réalisé, il l'est généralement via une centrifugation à haute vitesse ou via l'utilisation de réactif comme le Lipoclear®.

La centrifugation à haute vitesse s'effectue à 10 000 *g*. Certains auteurs affirment que cette dernière est aussi efficace que l'ultracentrifugation.(60) On peut cependant penser que si de faibles vitesses s'avèrent suffisantes pour clarifier des échantillons riches en chylomicrons, elles restent inappropriées au traitement des sérums ou plasma riches en VLDL.(13)

Les lipides peuvent également être extraits manuellement en utilisant des solvants polaires comme le polyéthylène glycol ou la cyclodextrine. Ce même principe est exploité avec des réactifs commerciaux tels que le Lipoclear®. Ce réactif contient un polymère qui fixe les lipides. Après centrifugation, les particules lipidiques ont précipité au fond du tube et les analyses peuvent être réalisées sur le surnageant clarifié. Pour autant, l'utilisation du Lipoclear® n'est pas recommandée pour tous les dosages et est remise en cause.(61,62)

Parmi les stratégies permettant de s'affranchir de l'interférence de la bilirubine sur le dosage de la créatinine, on peut citer des méthodes préconisant une dialyse préalable, l'utilisation de ferricyanide de potassium(63), l'incorporation de SDS (44,45,63–65) ou la déprotéinisation(65). Pour autant, ces dernières au même titre que les « gold standards » que sont la chromatographie liquide haute performance et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ne sont pas des techniques envisageables en biochimie de routine et d'urgence.

2. Phase analytique

1. Détermination des indices sériques

La détermination automatisée des indices sériques réalisée au CHU de Nantes, en parallèle aux dosages de biochimie classique est intégrée à la phase analytique.

Le développement et l'utilisation croissante de l'indice sérique, d'abord semi-quantitatif puis quantitatif, dans la pratique de routine témoignent du fait que cet outil est devenu un élément indispensable aux biologistes. La détermination des indices sériques présente plusieurs avantages : tout d'abord, elle permet de s'affranchir de l'inspection visuelle systématique et du jugement arbitraire qui en découle quant à la qualité de l'échantillon.(66) Elle permet une évaluation de la qualité standardisée, en temps réel, quel que soit le volume d'échantillons traité et compatible avec une automatisation totale de la prise en charge de l'échantillon.(21) Il faut également souligner dans ses points forts, sa transmission et son archivage automatique sur le Système Informatique du Laboratoire (SIL). Enfin, cet outil est utile afin d'évaluer la qualité du processus pré-analytique et l'impact lors d'un changement de tubes de prélèvement par exemple.(8)

La détermination systématique des indices sériques, malgré de multiples avantages, présentent tout de même certaines limites ou pistes d'amélioration. Ainsi malgré les bonnes performances des indices sériques dont témoignent les résultats positifs de nos travaux de corrélation et plusieurs publications (67), les mesures d'indices sériques ne sont pas validées pour le diagnostic.(68,69) Bien

qu'efficace dans la plupart des situations, la mesure des indices sériques peut être sujette à des interférences (médicaments et produits de contraste ou immunoglobulines monoclonales).(70,71) La mise en place d'un tel système n'exclue donc jamais totalement la vérification visuelle de l'aspect de l'échantillon. De plus, bien que les indices sériques soient incorporés dans des algorithmes décisionnels (notamment de redosage), ils ne peuvent être utilisés dans de potentielles formules de correction. Certains auteurs regrettent qu'aucune étude concernant l'impact de la détermination des indices sériques sur le temps d'analyse n'ait été réalisée. Ce constat est sans doute discutable lorsque la détermination des indices est réalisée immédiatement avant ou en parallèle aux autres dosages, sur le même automate. Pour autant, la remarque mérite d'être posée lorsque l'on s'attache à des échantillons analysés sur un automate différent de celui-sur lequel est réalisée la détermination des indices (à l'exemple d'échantillons destinés à analyses immunologiques devant transiter par un automate dédié principalement à la colorimétrie).(8) Enfin, dans un souci toujours croissant de qualité, on peut souhaiter que soient mis en place des contrôles de qualité interne afin de garantir la fiabilité de cette détermination.

2. Optimisation des méthodes de dosages et de détection

Les solutions aux interférences relèvent en partie de l'amélioration des méthodes de dosages notamment en termes de spécificité, d'optimisation des réactifs utilisés et d'innovation. Les longueurs primaires et secondaires et les cinétiques de dosages doivent également être optimisées de façon à s'affranchir de ces effets.(20,72)

3. Dilution de l'échantillon

Devant un échantillon hémolysé, lipémique ou ictérique, la question de la dilution de l'échantillon peut se poser. Il s'avère qu'elle n'apporte pas toujours une correction de l'interférence. Les résultats des dilutions pratiquées sur des échantillons critiques varient selon le paramètre dosé, selon sa concentration, et selon le type d'interférence observée.(61)

En effet pour l'hémolyse, la dilution ne permet généralement pas de résoudre le problème de l'interférence. Elle est sans effet dans l'ensemble des cas d'interférences d'apport et n'est réellement pertinente que pour une seule enzyme sur les cinq étudiées.(GGT)

Dans le cas d'échantillons lipémiques, la dilution n'est qu'une solution partielle aux interférences, ne permettant que la correction des valeurs élevées d'ALAT et d'ASAT.

Enfin actuellement aucune dilution automatique n'est réalisée dans le cas des échantillons ictériques. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet d'une dilution manuelle sur les dosages impactés par l'ictère.

3. Phase post-analytique

Après la détection d'un échantillon hémolysé, lipémique et ictérique pour lequel un dosage est impacté vient la question du rendu du résultat. Différentes stratégies existent.

La première consiste à ne pas rendre le résultat, d'en informer le clinicien et de demander un nouvel échantillon. Cette démarche peut être une cause de tension avec les services et de retard au diagnostic (52). Pour les 2% d'échantillons hémolysés qui résultent d'une hémolyse intra-vasculaire, l'absence de rendu est complètement injustifiée. Cette démarche doit également être opposée à la possibilité de doser sur sang total un certain nombre de paramètres pour des services de soins

équipés d'appareils de biologie délocalisée. Ces appareils fournissent des résultats sans mesure de l'index d'hémolyse (CA, CRE, K, GLU), puisque ces analyses sont réalisées sur sang total (d'où leur intérêt potentiel en urgence). Les services de soins obtenant des résultats sur un appareil de biologie délocalisée, alors qu'ils ne les obtiennent pas par le laboratoire, pourraient alors être tentés de privilégier à tort cette utilisation.

La deuxième démarche est plus que contestable. Il s'agit de rendre un résultat ajusté du dosage impacté grâce à l'utilisation d'un algorithme ou d'une formule de correction. En effet, depuis 1962, des formules de correction sont proposées de manière à corriger la kaliémie mesurée sur échantillons hémolysés.(73) Selon les différentes études réalisées, les facteurs de correction appliqués à la mesure de la kaliémie varient de 0.3 à 0.6 mmol/L de potassium pour 100 mg/dL d'hémoglobine soluble.(74) La détermination systématique et quantitative de l'indice d'hémolyse facilite l'élaboration et l'emploi de ces formules. Leur utilisation a même été étendue à la mesure de l'activité LDH.(75,76) Cependant, plusieurs études ont démontré que ces facteurs de correction présentaient une variabilité inter-individuelle importante qui ne permettait pas l'utilisation de ce type de formule de corrections. (77–79)

La dernière solution, celle qui nous paraît la plus adaptée et celle que nous avons choisi d'employer au sein du laboratoire, est de rendre le résultat du dosage accompagné d'un commentaire précisant le sens voire le niveau de l'interférence.

En pratique, au CHU de Nantes, les conclusions de ce travail ont été prises en compte dans la rédaction de deux procédures de validation technique ayant pour objectifs :

- de garantir la prise en compte par un clinicien d'une interférence analytique importante compromettant l'interprétation d'un résultat
- d'éviter le cas échéant, la transmission de résultats impactés de façon majeure par une hémolyse trop importante pouvant compromettre l'interprétation médicale
- de permettre la transmission, à la demande du clinicien, d'un résultat obtenu sur un prélèvement très hémolysé.

A titre d'exemple, deux commentaires ont été créés concernant le dosage de la troponine T hs sur le laboratoire à réponse rapide de l'Hôtel Dieu.

- l'un à utiliser pour un indice d'hémolyse compris entre 100 et 150 ng/mL (62 à 93 µmol/L) : «Prélèvement hémolysé, à ce niveau d'hémolyse sous-estimation limitée de la troponine (maximum 10%). Renouveler le prélèvement en fonction du contexte clinique »
- l'autre en cas d'indice d'hémolyse supérieur à 150 ng/mL (93 µmol/L) «Prélèvement hémolysé, à ce niveau d'hémolyse sous-estimation significative de la troponine (maximum 40%). Renouveler le prélèvement en fonction du contexte clinique »

De la même façon au laboratoire de l'hôpital Guillaume et René Laennec, pour tout prélèvement hémolysé, un résultat d'ASAT sera assorti du commentaire « Activité GOT (ASAT) surestimée en cas d'hémolyse liée au prélèvement ».

Pour les plasmas d'aspect ictérique, trois commentaires ont également été créés et sont ajoutés automatiquement aux résultats des dosages en fonction de l'indice d'ictère :

- « Prélèvement ictérique : sous-estimation des créatininémies < 200 µmol/L »
- « Prélèvement ictérique : sous-estimation des triglycérides »
- « Prélèvement ictérique : sous-estimation des protéinémies < 50 g/L »

IX. L'harmonisation des pratiques, une évolution indispensable

Comme nous l'avons souligné lors de ce travail, il existe une importante hétérogénéité concernant les études d'interférences. Les causes en sont multiples : les modes de prélèvements, les tubes, les anticoagulants et les systèmes analytiques diffèrent selon les auteurs. Les stratégies utilisées afin d'engendrer et d'étudier les interférences ne sont pas identiques. Les concentrations d'analytes ainsi que les seuils utilisés afin de définir un biais significatif sont également variables.

Une harmonisation des pratiques, réclamée par de nombreux auteurs (21,39,50,58), est nécessaire à tous les niveaux :

- mise au point des études d'interférences
- systèmes de mesure et rendu des indices sériques
- définition de l'interférence significative
- conduite à tenir en cas de dosage impacté.

Le document *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline* du CLSI est un référentiel ayant pour buts d'aider les fournisseurs à caractériser la sensibilité de leurs tests aux substances interférentes et d'assister les biologistes confrontés à des résultats incohérents dus à des substances interférentes. Ce document répond partiellement à la nécessité d'harmonisation des pratiques concernant l'élaboration des études d'interférences mais ne solutionne pas les autres points mentionnés précédemment.(2)

CONCLUSION

Les fournisseurs sont responsables de la caractérisation des performances analytiques de leurs méthodes de dosage et doivent délivrer les informations concernant la sensibilité de leurs analyses aux interférences. Pourtant au sein d'un laboratoire donné, les limites d'interférences annoncées par les fournisseurs ne sont pas toujours vérifiées. Bien que cela ne soit pas le rôle des laboratoires, certaines publications recommandent aux biologistes de s'assurer de la conformité des données communiquées et de définir leurs propres critères d'acceptabilité basés sur leurs performances analytiques et l'utilisation clinique de leur analyse.(39) Cependant, le coût et le temps nécessaire à ce type d'étude rend leur généralisation difficile.

Lors de notre étude, nous avons analysé l'impact de l'hémolyse, de la lipémie et de l'ictère sur des dosages biochimiques fréquemment demandés en urgence comme en routine au sein de notre laboratoire. Les résultats obtenus ont été confrontés aux données fournisseurs qui dans la plupart des cas ont été vérifiées. Ils nous ont permis d'élargir nos conditions de rendu de résultats pour certains paramètres, particulièrement en cas de valeurs pathologiques, ce qui permet potentiellement un gain de temps dans la prise en charge des patients.

La prévention de ces interférences passe en partie par la maîtrise de la phase pré-analytique, l'un des challenges les plus importants pour le laboratoire de Biologie Médicale, qui fait l'objet de nombreuses publications.(80) Quant à l'impact des interférences, il mériterait d'être investigué de manière plus approfondie dans d'autres disciplines, notamment en hémostase.

BIBLIOGRAPHIE

1. The Lewin Group. The Value of Diagnostics: Innovation, Adoption and Diffusion into Health Care. 2005.
2. Wayne, PA. CLSI Interference testing in clinical chemistry. Approved guideline-second edition. CLSI document EP07-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
3. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem*. 1994;40(11 Pt 1):1996–2005.
4. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. *Biochim Clin*. 2002;26(95):7.
5. Dhondt J, Hayte J, Demouveaux A. Les prélèvements hémolysés. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2000;58:639.
6. Lippi G, Salvagno GL, Brocco G, Guidi GC. Preanalytical variability in laboratory testing: influence of the blood drawing technique. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(3):319–25.
7. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(6):764–72.
8. Lippi G, Plebani M. Continuous-Flow Automation and Hemolysis Index A Crucial Combination. *J Lab Autom*. 2013;18(2):184–8.
9. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(6):720–7.
10. Brousse A. Les Principales interférences endogènes dans les examens de biochimie clinique. 1996. Thèse d'exercice : Pharm., Université de Nantes; n°14. 69 p.
11. Walker PL, Crook MA. Lipaemia: Causes, consequences and solutions. *Clin Chim Acta*. 2013 ;418:30–2.
12. Grunbaum AM, Gilfix BM, Gosselin S, Blank DW. Analytical interferences resulting from intravenous lipid emulsion. *Clin Toxicol Phila Pa*. 2012;50(9):812–7.
13. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Medica*. 2014 Feb 15;24(1):57–67.
14. Simundic A-M, 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):1009–14.
15. Kroll MH. Evaluating Interference Caused by Lipemia. *Clin Chem*. 2004 1;50(11):1968–9.
16. Lippi G, Aloe R. Hyponatremia and Pseudohyponatremia: First, Do No Harm. *Am J Med*. 2010;123(9):e17.
17. Dimeski G, Mollee P, Carter A. Effects of Hyperlipidemia on Plasma Sodium, Potassium, and Chloride Measurements by an Indirect Ion-Selective Electrode Measuring System. *Clin Chem*. 2006 ;52(1):155–6.

18. Da Fonseca-Wollheim F. Haemoglobin interference in the bichromatic spectrophotometry of NAD(P)H at 340/380 nm. *Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc.* 1993;31(9):595–601.
19. Alvarez F, Whalen K, Scott MG. Conjugated, but not unconjugated, bilirubin negatively interferes in Hitachi 747 assay of inorganic phosphorus. *Clin Chem.* 1993;39(11 Pt 1):2345–6.
20. Grafmeyer D, Bondon M, Manchon M, Levillain P. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analysers. Results of an interlaboratory study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem J Forum Eur Clin Chem Soc.* 1995;33(1):31–52.
21. Dolci A, Panteghini M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clin Chim Acta* [Internet]. [cited 2014 Jan 2]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000989811300421X>
22. Bais R. The Effect of Sample Hemolysis on Cardiac Troponin I and T Assays. *Clin Chem.* 2010 ;56(8):1357–9.
23. Wenk RE. Mechanism of Interference by Hemolysis in Immunoassays and Requirements for Sample Quality. *Clin Chem.* 1998 ;44(12):2554–2554.
24. Aoki Y, Ihara H, Nakamura H, Aoki T, Yoshida M. Effects of serum bilirubin on determination of uric acid by the uricase-peroxidase coupled reaction. *Clin Chem.* 1992 ;38(7):1350–2.
25. 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.
26. Vermeer HJ, Thomassen E, Jonge N de. Automated Processing of Serum Indices Used for Interference Detection by the Laboratory Information System. *Clin Chem.* 2005 ;51(1):244–7.
27. Owen LJ, Keevil BG. Does Bilirubin Cause Interference in Roche Creatinine Methods? *Clin Chem.* 2007 ;53(2):370–1.
28. Dolci A, Panteghini M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clin Chim Acta.* 2014 ;432:38–43.
29. Sodi R, Darn SM, Davison AS, Stott A, Shenkin A. Mechanism of interference by haemolysis in the cardiac troponin T immunoassay. *Ann Clin Biochem.* 2006;43(Pt 1):49–56.
30. Lippi G. Interference studies: focus on blood cell lysates preparation and testing. *Clin Lab.* 2012;58(3-4):351–5.
31. Wayne, PA. CLSI Hemolysis, icterus, and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis. Approved guideline-second edition. CLSI document C56-A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
32. Pozharski EV, McWilliams L, MacDonald RC. Relationship between Turbidity of Lipid Vesicle Suspensions and Particle Size. *Anal Biochem.* 2001 ;291(1):158–62.
33. Férézou J, Gulik A, Domingo N, Milliat F, Dedieu J-C, Dunel-Erb S, et al. Intralipid 10%: physicochemical characterization. *Nutrition.* 2001;17(11–12):930–3.

34. Bornhorst JA, Roberts RF, Roberts WL. Assay-Specific Differences in Lipemic Interference in Native and Intralipid-Supplemented Samples. *Clin Chem*. 2004 ;50(11):2197–201.
35. Twomey PJ, Don-Wauchope AC, McCullough D. Unreliability of triglyceride measurement to predict turbidity induced interference. *J Clin Pathol*. 2003;56(11):861.
36. Rosenthal MA, Katz HB. An innovative method for determining lipemia interference in blood specimens. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2011 ;412(7-8):665–7.
37. Franzini C, Morelli AM, Cattozzo G. Use of a synthetic soluble bilirubin derivative to assess interference in creatinine measurements. *Clin Chem*. 1991 ;37(2):236–8.
38. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem*. 1986;32(3):470–5.
39. Nikolac N, Simundic A-M, Miksa M, Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Caruso B, et al. Heterogeneity of manufacturers' declarations for lipemia interference — An urgent call for standardization. *Clin Chim Acta*. 2013 ;426:33–40.
40. Fraser CG. Test result variation and the quality of evidence-based clinical guidelines. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2004 ;346(1):19–24.
41. Ricos C, Perich C, Minchinela J, Alvarez V, Simon M, Biosca C, et al. Application of biological variation - a review. *Biochem Medica*. 2009;250–9.
42. Steen G, Vermeer HJ, Naus AJM, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CHH. Multicenter evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assays. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(4):413–9.
43. Ricós C, Iglesias N, García-Lario J-V, Simón M, Cava F, Hernández A, et al. Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem*. 2007;44(Pt 4):343–52.
44. Szoke D, Braga F, Valente C, Panteghini M. Hemoglobin, bilirubin, and lipid interference on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta*. 2012;413(1–2):339–41.
45. Ji JZ, Meng QH. Reply to “Haemoglobin, bilirubin, and lipid interference on Roche Cobas 6000 assays” (CCA-D-11-00941R1). *Clin Chim Acta*. 2012 ;413(1–2):342–3.
46. Heyer NJ, Derzon JH, Wings L, Shaw C, Mass D, Snyder SR, et al. Effectiveness of practices to reduce blood sample hemolysis in EDs: A laboratory medicine best practices systematic review and meta-analysis. *Clin Biochem*. 2012;45(13–14):1012–32.
47. Florkowski C, Wallace J, Walmsley T, George P. The Effect of Hemolysis on Current Troponin Assays—A Confounding Preanalytical Variable? *Clin Chem*. 2010 ;56(7):1195–7.
48. Snyder JA, Rogers MW, King MS, Phillips JC, Chapman JF, Hammett-Stabler CA. The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic's Eci and Roche's elecsys immunoassay systems. *Clin Chim Acta*. 2004;348(1–2):181–7.
49. Bais R. Two cardiac troponin assays not affected by hemolysis — A patient safety issue. *Clin Chim Acta*. 2013 ;424:1–2.

50. Monneret D, Mestari F, Atlan G, Corlouer C, Ramani Z, Jaffre J, et al. Hemolysis indexes for biochemical tests and immunoassays on Roche analyzers: Determination of allowable interference limits according to different calculation methods. *Scand J Clin Lab Invest*. 2015 ;1–8.
51. Ryder KW, Trundle DS, Bode MA, Cole RE, Moorehead WR, Glick MR. Effects of hemolysis, icterus, and lipemia on automated immunoassays. *Clin Chem*. 1991 ;37(6):1134–5.
52. 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):143–53.
53. Lippi G, Avanzini P, Aloe R, Cervellin G. Blood collection from intravenous lines: is one drawing site better than others? *Lab Med*. 2014;45(2):172–5.
54. Bowen RAR, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Medica*. 2014 ;24(1):31–44.
55. Lippi G, Becan-McBride K, Behúlová D, Bowen RA, Church S, Delanghe J, et al. Preanalytical quality improvement: in quality we trust. *Clin Chem Lab Med*. 2013 ;51(1):229–41.
56. Tiwari AK, Pandey P, Dixit S, Raina V. Speed of sample transportation by a pneumatic tube system can influence the degree of hemolysis. *Clin Chem Lab Med*. 2012;50(3):471–4.
57. Streichert T, Otto B, Schnabel C, Nordholt G, Haddad M, Maric M, et al. Determination of Hemolysis Thresholds by the Use of Data Loggers in Pneumatic Tube Systems. *Clin Chem*. 2011 ;57(10):1390–7.
58. Harmonization in hemolysis detection and prevention. A working group of the Catalonian Health Institute (ICS) experience : Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) [Internet]. [cited 2015 Feb 26]. Available from: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2014.52.issue-11/cclm-2013-0935/cclm-2013-0935.xml>.
59. Glick MR, Ryder KW. Analytical systems ranked by freedom from interferences. *Clin Chem*. 1987 ;33(8):1453–8.
60. Dimeski G, Jones BW. Lipaemic samples: effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. *Biochem Medica*. 2011;21(1):86–92.
61. Vermeer HJ, Steen G, Naus AJM, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CHH. Correction of patient results for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids: a practical approach. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(1):114–9.
62. Saracevic A, Nikolac N, Simundic A-M. The evaluation and comparison of consecutive high speed centrifugation and LipoClear® reagent for lipemia removal. *Clin Biochem*. 2014;47(4–5):309–14.
63. O’Leary N, Pembroke A, Duggan PF. A simplified procedure for eliminating the negative interference of bilirubin in the Jaffé reaction for creatinine. *Clin Chem*. 1992 ;38(9):1749–51.
64. Srisawasdi P, Chaichanajarernkul U, Teerakanjana N, Vanavanan S, Kroll MH. Exogenous interferences with Jaffe creatinine assays: addition of sodium dodecyl sulfate to reagent eliminates bilirubin and total protein interference with Jaffe methods. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(3):123–33.

65. Lolekha PH, Jaruthunyaluck S, Srisawasdi P. Deproteinization of serum: Another best approach to eliminate all forms of bilirubin interference on serum creatinine by the kinetic Jaffe reaction. *J Clin Lab Anal.* 2001 ;15(3):116–21.
66. Simundic A-M, Nikolac N, Ivankovic V, Ferenc-Ruzic D, Magdic B, Kvaternik M, et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(11):1361–5.
67. Lippi G, Luca Salvagno G, Blanckaert N, Giavarina D, Green S, Kitchen S, et al. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(8):934–9.
68. Szoke D, Braga F, Valente C, Panteghini M. Measurement of icteric index as approach to detect abnormal total bilirubin values. *J Clin Pathol.* 2013;66(12):1095–7.
69. Salinas M, López-Garrigós M, Lugo J, Gutiérrez M, Flors L, Leiva-Salinas C. Diagnostic accuracy of icteric index to detect abnormal total bilirubin values. *J Clin Pathol.* 2012;65(10):928–33.
70. Fliser E, Jerkovic K, Vidovic T, Gorenjak M. Investigation of unusual high serum indices for lipemia in clear serum samples on siemens analysers dimension. *Biochem Medica.* 2012;22(3):352–62.
71. Darby D, Broomhead C. Interference with serum indices measurement, but not chemical analysis, on the Roche Modular by Patent Blue V. *Ann Clin Biochem.* 2008;45(Pt 3):289–92.
72. Saibaba KS, Bhaskar MV, Rao PV, Ramana GV, Dakshinamurty KV. Interferences in clinical chemistry analysis. *Indian J Clin Biochem IJCB.* 1998;13(2):55–62.
73. Caraway WT. Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests. Effect of hemolysis, lipemia, anticoagulants, medications, contaminants, and other variables. *Am J Clin Pathol.* 1962;37:445–64.
74. Zou J, Nolan DK, LaFiore AR, Scott MG. Estimating the effects of hemolysis on potassium and LDH laboratory results. *Clin Chim Acta.* 2013 ;421:60–1.
75. Jay DW, Provasek D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. *Clin Chem.* 1993;39(9):1804–10.
76. Owens H, Siparsky G, Bajaj L, C. Hampers L. Correction of factitious hyperkalemia in hemolyzed specimens. *Am J Emerg Med.* 2005;23(7):872–5.
77. Hawkins R. Variability in Potassium/Hemoglobin Ratios for Hemolysis Correction. *Clin Chem.* 2002;48(5):796–796.
78. Mansour MMH, Azzazy HME, Kazmierczak SC. Correction Factors for Estimating Potassium Concentrations in Samples With In Vitro Hemolysis: A Detriment to Patient Safety. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 ;133(6):960–6.
79. Lippi G, Avanzini P, Pavesi F, Bardi M, Ippolito L, Aloe R, et al. Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochem Medica.* 2011;21(3):297–305.
80. Simundic A-M, Lippi G. Preanalytical phase - a continuous challenge for laboratory professionals. *Biochem Medica.* 2012;22(2):145–9.

Article original

Ann Biol Clin 2014 ; 72 (3) : 297-311

Interférence de l'hémolyse sur le dosage
de vingt-deux paramètres biochimiques*Hemolysis influence on twenty-two biochemical parameters
measurement*

Damien Ali
Émilie Sacchetto
Erwan Dumontet
Didier Le Carrer
Jean-Luc Orsonneau
Odile Delaroche
Edith Bigot-Corbel

Laboratoire de biochimie, Centre
hospitalier universitaire de Nantes,
Hôpital Guillaume et René Laënnec,
Saint-Herblain, France
<edith.bigot@chu-nantes.fr>

Résumé. L'étude de l'influence de l'hémolyse a été déterminée expérimentalement pour vingt-deux paramètres biochimiques sur automate Cobas 6000 ce (Roche Diagnostics). La méthode des ajouts d'hémolysat a été utilisée pour créer une gamme d'hémoglobine de concentration croissante variant de 0 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$. La limite de 10 % de variation a été choisie pour définir une influence de l'hémolyse sur la mesure. Les paramètres étudiés ont été classés en plusieurs catégories : les paramètres pour lesquels l'hémolyse n'influence pas la mesure : albumine, acide urique, calcium, protéine C réactive, myoglobine, NT-pro BNP, protéine S100 β , et urée ; les paramètres impactés de façon positive entraînant une surestimation du résultat : aspartate amino-transférase, cholestérol total, créatine kinase, créatinine, lactate-déshydrogénase, magnésium, phosphore, protéines totales, triglycérides ; et les paramètres impactés de façon négative entraînant une sous-estimation du résultat : alanine aminotransférase, gamma glutamyl-transférase, lipase, phosphatase alcaline, troponine T hypersensible. Pour certains paramètres, l'influence de l'hémolyse est variable en fonction de la grandeur du paramètre mesuré, cette interférence étant observée pour des valeurs normales mais disparaissant pour des valeurs pathologiques : créatinine, cholestérol, phosphatase alcaline, triglycérides ou à l'inverse l'interférence étant plus marquée pour des valeurs usuelles que pathologiques : lipase, alanine amino-transférase. La connaissance de cette variabilité d'interférence permet au biologiste d'adapter ses modalités de compte rendu dans le cas d'échantillons hémolysés.

Mots clés : hémolyse, hémoglobininémie, interférence, surestimation, sous-estimation

Abstract. The study of the influence of hemolysis was determined experimentally for twenty two biochemical parameters on the analyzer Cobas 6000 ce (Roche Diagnostics). The addition method of hemolysate was used to create an increasing concentration of hemoglobin ranging from 0 to 2000 $\mu\text{mol/L}$. The limit of 10% variation was chosen to define the influence of hemolysis on the measurement. The parameters studied were classified into several categories: the parameters for which hemolysis does not influence the measurement: albumin, uric acid, calcium, C-reactive protein, myoglobin, NT-pro BNP, S100 protein, and urea; parameters impacted positively leading to an overestimation of the result: aspartate aminotransferase, total cholesterol, creatine kinase, creatinine, lactate dehydrogenase, magnesium, magnesium, total protein, triglycerides; and negatively impacted settings so causing an underestimation of the result: alanine amino-transferase, gamma glutamyl transferase, lipase, alkaline phosphatase, troponin T hypersensitive. Certain parameters influence of hemolysis varies depending on the magnitude of the measured parameter this interference being observed for normal values but disappearing for pathological values:

Article reçu le 12 décembre 2013,
accepté le 07 janvier 2014.

Tirés à part : E. Bigot-Corbel

Pour citer cet article : Ali D, Sacchetto É, Dumontet E, Le Carrer D, Orsonneau JL, Delaroche O, Bigot-Corbel E. Interférence de l'hémolyse sur le dosage de vingt-deux paramètres biochimiques. *Ann Biol Clin* 2014 ; 72(3) : 297-311 doi:10.1684/abc.2014.0952

297

© John Libbey Eurotext, 2014

creatinine, cholesterol, alkaline phosphatase, triglycerides, or the inverse interference is greater than for conventional pathological values; lipase, alanine amino-transferase. Knowledge of this variability interference allows the biologist to adapt its methods of reporting in the case of haemolysed samples.

Key words: hemolysis, hemoglobinemia, interference, underestimation, overestimation

L'hémolyse des échantillons biologiques a depuis longtemps été considérée comme impactant les résultats des examens biochimiques classiques pour diverses raisons. Depuis quelques années les fournisseurs d'automates et réactifs de biochimie fournissent les seuils ou index pour l'hémolyse, l'ictère et la lactescence au-delà desquels les résultats ne sont plus fiables [1-3]. L'index d'hémolyse est déterminé comme étant la plus haute concentration en hémoglobine présente dans l'échantillon donnant un résultat compris entre plus ou moins 10 % par rapport au même échantillon non hémolysé. Cet index est toutefois défini pour une seule valeur (le plus souvent normale) du paramètre testé considéré. Notre objectif dans ce travail a consisté à s'assurer que les index fournis par le fournisseur étaient applicables quelle que soit la plage de mesure du paramètre et également de définir l'impact (en % de variation) de l'hémolyse pour l'index fixé par le fournisseur et au-delà, sur le résultat obtenu. En effet, s'il ne fait aucun doute que l'hémolyse liée soit aux conditions de prélèvement soit à la phase pré-analytique entraîne des résultats erronés, dans les cas d'hémolyse intravasculaire les résultats du prélèvement hémolysés sont informatifs et doivent pouvoir être rendus [4-6].

L'hémolyse intravasculaire aiguë ou chronique est rencontrée plus spécialement chez les sujets présentant des anémies hémolytiques, mais aussi dans certaines conditions chirurgicales comme la chirurgie cardiaque réalisée sous circulation extracorporelle (CEC), les sujets ayant bénéficié d'un remplacement valvulaire, ou chez les patients sous assistance circulatoire. Dans notre hôpital, cette situation est assez fréquemment observée liée à l'activité chirurgicale cardiologique importante sur le site (minimum 1 500 chirurgies sous CEC par an). Chez ce type de patients en post-opératoire ou en soins intensifs chez qui l'hémolyse intravasculaire est le plus souvent aiguë, l'obtention des résultats biochimiques sur les bilans biologiques réalisés toutes les 6 à 12 h est primordiale pour permettre aux anesthésistes réanimateurs un suivi correct et une prise en charge optimale des patients.

L'hémolyse, faisant suite à une altération ou rupture de la membrane érythrocytaire quelle qu'en soit la cause, se caractérise par un relargage de l'hémoglobine et plus généralement du contenu intra-érythrocytaire dans le plasma. La valeur usuelle maximale d'hémoglobine libre dans le

plasma est de 0,02 g/L (1,2 $\mu\text{mol/L}$) et de 0,05 mg/L (3,1 $\mu\text{mol/L}$) dans le sérum [7]. Visuellement décelable à partir d'une concentration en hémoglobine libre d'environ 0,1 à 0,3 g/L (6,2 à 18,6 $\mu\text{mol/L}$), l'hémolyse est clairement visible à partir d'une lyse de 0,5 % des globules rouges [7, 8].

Les causes d'hémolyse sont très majoritairement (98 % des cas) liées à des problèmes pré-analytiques nombreux et de causes diverses. De façon non exhaustive on peut citer les hémolyses liées au patient : veines fragiles, ponction difficile, prélèvement capillaire ; au système de prélèvement : calibre des aiguilles inférieur à 21 G, pression négative élevée dans le tube, sous remplissage des tubes ; au prélèvement : agitation trop vigoureuse des tubes prélevés ; aux conditions de transport : pneumatique, température excessive ; aux conditions de centrifugation : vitesse trop importante, re-centrifugation des tubes avec gel séparateur [9, 10]. Cependant, dans 2 % des cas l'hémolyse est intravasculaire, là encore les causes sont très nombreuses : héréditaires, acquises ou iatrogènes [11].

L'hémolyse n'étant visible qu'après la centrifugation et l'impact sur les paramètres biochimiques potentiellement important, certains laboratoires adoptent des procédures d'exclusion de ces prélèvements sans distinction et parfois à tort.

Les mécanismes possibles des interférences liées à l'hémolyse peuvent être classés en interférences d'apport, interférences spectrales ou physiques et interférences chimiques.

Pour les interférences d'apport, il s'agit en fait d'une surcharge provenant du contenu érythrocytaire qui va entraîner une surestimation de l'analyte dosé en cas d'hémolyse extravasculaire mais qui reflète la réalité en cas d'hémolyse intravasculaire, l'importance de l'augmentation du paramètre est directement proportionnelle à sa concentration intra-érythrocytaire et à l'importance de l'hémolyse (ex : potassium, sodium, phosphore, lactico déshydrogénase, aspartate amino transférase...).

Les interférences spectrales sont liées à l'additivité de la loi de Beer-Lambert, et vont s'observer pour les paramètres dont la mesure finale est spectrophotométrique et réalisée à une longueur d'onde proche des principales longueurs d'onde d'absorption de l'hémoglobine c'est-à-dire : 415, 540 et 578 nm. Il peut s'agir d'une surestimation

ou sous-estimation du paramètre dosé (selon que l'on mesure en cinétique descendante ou ascendante) et dans tous les cas l'interférence spectrale fournit un résultat « erroné ».

Les interférences chimiques sont liées aux perturbations induites par l'hémoglobine ou tout autre composant érythrocytaire (protéines structurales, lipides, enzymes, carbohydrates) lors de la réaction chimique ou enzymatique utilisée pour le dosage du paramètre. Là encore il peut donc s'agir de surestimation ou de sous-estimation et le résultat fourni est erroné dans le sens où il ne correspond pas à la réalité. À titre d'exemple on peut citer l'interférence lors du dosage de la créatine kinase par libération d'adénylate kinase [7].

L'interférence de l'hémolyse sur les dosages immunochimiques est beaucoup moins fréquente que pour les dosages spectrophotométriques, cependant on retrouvera les interférences liées à une éventuelle surcharge. Il peut toutefois exister des interférences liées à la réactivité croisée des anticorps utilisés vis-à-vis de protéines érythrocytaires [12, 13].

Matériels et méthodes

Paramètres étudiés

L'interférence de l'hémolyse a été étudiée sur les paramètres suivants : alanine amino transférase (ALAT), albumine (ALB), aspartate amino transférase (ASAT), acide urique (AUR), calcium (CA), créatine kinase (CK), créatinine (CRE), protéine C réactive (CRP), cholestérol total (CT), gamma glutamyl transférase (GGT), lactate déshydrogénase (LDH), lipase (LIP), myoglobine (Mb), magnésium (Mg), fragment N terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B (NT-Pro BNP), phosphore (P), phosphatases alcalines (PAL), protéines totales (PT), protéine S100 β (S100), triglycérides (TG), troponine T cardiaque hypersensible (TNT), urée (UR). Cette interférence a été étudiée soit sur une seule valeur (CK, LDH, Mb, Mg, P) soit sur deux valeurs (ALAT, ALB, AUR, CA, CRE, CRP, CT, GGT, NT-Pro BNP, PT, TG, TNT, UR, ou sur 3 valeurs ou plus (ASAT, LIP, PAL, S100) (tableau 1).

Surcharge en hémoglobine des échantillons plasmatiques

Préparation de l'hémolysat

À partir des échantillons sanguins sur tubes héparinés effectués sur des volontaires sains, et centrifugation à 2 500 g pendant 10 min, les globules rouges sont obtenus après élimination du plasma et du Buffy coat. Trois lavages en sérum physiologique froid ont été réalisés. Les globules rouges sont ensuite lysés par addition d'eau distillée volume à volume, une centrifugation à 4 000 g

pendant 10 min permet d'éliminer les débris cellulaires. L'hémoglobine est mesurée sur l'hémolysat en utilisant l'appareil Sysmex® XE-2100D (Sysmex corporation, Villepinte, France) ; l'hémolysat est ensuite conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

La méthode de surcharge en hémoglobine utilisée consiste à réaliser à partir de l'hémolysat décongelé une gamme de concentration en hémoglobine variant de 0 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$ soit de 0 à 32,2 g/L. Chaque point de cette gamme de concentration en hémoglobine est additionné volume à volume à des plasmas de concentration variable pour chacun des paramètres étudiés ; un témoin servant de valeur de référence est réalisé en additionnant de la même façon volume à volume du sérum physiologique à chacun des plasmas analysés. Sur chacun des différents échantillons ainsi préparés (avec sérum physiologique et concentrations variables d'hémoglobine), la mesure des paramètres biochimiques est réalisée [14].

Instrumentation

L'appareil utilisé est le Cobas 6000 analyseur (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les paramètres ont été mesurés selon les techniques et réactifs dédiés, les coefficients de variation déterminés à partir des contrôles de qualité interne (CIQ) et l'incertitude de mesure déterminée à partir de l'externalisation des CIQ de chaque paramètre sont indiquées dans le tableau 2. En parallèle, sur chaque échantillon la mesure de l'index sérique d'hémolyse est réalisée par l'automate selon la technique décrite par le fabricant : 6 μL de plasma dilué dans 150 μL de NaCl 0,9 %, mesure de l'absorbance à 570 nm pour la longueur d'onde principale et 600 nm pour la longueur d'onde secondaire. Le résultat est ensuite multiplié par un facteur d'échelle de manière à obtenir un résultat d'indice d'hémolyse « H » affiché sur l'automate, correspondant approximativement à une concentration en hémoglobine en $\mu\text{mol/L}$.

Présentation des résultats - statistiques

Nous avons calculé pour chacun des paramètres le rapport de concentration Y/X, défini comme étant le rapport de la concentration mesurée [plasma + hémolysat] (Y) /concentration mesurée [plasma + NaCl] (X). Ce rapport est représenté en ordonnée sur les graphiques présentés. Notre critère d'acceptabilité est représenté sur le graphique par les barres horizontales (plus ou moins 10 % soit Y/X compris entre 0,9 et 1,1).

Résultats

L'index d'hémolyse a été converti en concentration d'hémoglobine pour une facilité d'interprétation des résultats (tableau 1 et figures 1 à 3) [15].

Article original

Tableau 1. Paramètres pour lesquels l'influence de l'hémolyse a été étudiée sur l'automate Cobas 6000 ce Roche.

Paramètre	Principe de dosage	Méthode	Longueur d'onde de mesure	Domaine de linéarité	CV reproductibilité (%)	Incertitude de mesure (%)	
ALAT	Alanine amino-transférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0,08-11,7 μ kat/L	4,4	8,81
ALB	Albumine	Méthode colorimétrique	Vert de bromocrésol	570 nm	2-60 g/L	3,1	ND
ASAT	Aspartate amino-transférase	Méthode enzymatique	IFCC avec phosphate de pyridoxal	340 nm	0,08-11,7 μ kat/L	2,2	6,15
AUR	Acide urique	Méthode enzymatique	Uricase -POD-Chromogène	546 nm	11,9-1487 μ mol/L	1,8	6,09
CA	Calcium	Méthode colorimétrique	NM-BAPTA	340 nm	0,20-5 mmol/L	1,8	3,65
CK	Créatine kinase	Méthode enzymatique	IFCC - NAC activé	340 nm	0,12-33,4 μ kat/L	1,7	5,11
CRE	Créatinine	Méthode colorimétrique	Jaffé cinétique compensée	505 nm	15-2200 μ mol/L	4,0	9,31
CRP	Protéine C réactive	Immunoturbidimétrie	Particules de latex recouvertes d'Ac murin anti-CRP	570 nm	0,3-350 mg/L	3,8	8,13
CT	Cholestérol total	Méthode enzymatique	Cholestérol estérase, cholestérol oxydase - POD-chromogène	505 nm	0,1-20,7 mmol/L	3,2	8,76
GGT	Gamma glutamyl transférase	Méthode enzymatique	SZASZ	415 nm	0,05-20,0 μ kat/L	1,8	5,99
LDH	Lactate déshydrogénase	Méthode enzymatique	IFCC (lactate \rightarrow pyruvate)	340 nm	0,17-16,7 μ kat/L	2,8	6,85
LIP	Lipase	Méthode enzymatique	Ester de 1,2-O-dilauryl-rac-glycéro-3-acide glutarique	570 nm	0,05-5,01 μ kat/L	2,7	8,17
Mb	Myoglobine	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	21-3000 μ g/L	5,3	10,27
Mg	Magnésium	Méthode colorimétrique	Bleu de xylidyle	600 nm	0,10-2,0 mmol/L	2,7	4,37
NT-pro BNP	Fragment N-Terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	5-35000 ng/L	8,3	9,03
P	Phosphore	Méthode colorimétrique	Molybdate d'ammonium	340 nm	0,10-6,46 mmol/L	2,8	6,27
PAL	Phosphatases alcalines	Méthode enzymatique	IFCC avec tampon aminométhyl propanol	450 nm	0,084-20,0 μ kat/L	3,7	7,25
PT	Protéines totales	Méthode colorimétrique	Biuret avec iodure de potassium	546 nm	2,0-120 g/L	1,7	4,27

Tableau 1. (suite)

Paramètre	Principe de dosage	Méthode	Longueur d'onde de mesure	Domaine de linéarité	CV reproductibilité (%)	Incertitude de mesure (%)	
S100 β	Protéine S100 β	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	0,05-39 $\mu\text{g/L}$	5,9	ND
TG	Triglycérides	Méthode enzymatique	LPL, glycérokinase, GPO-POD-chromogène	505 nm	0,1-10,0 mmol/L	2,9	6,47
TNT hs	Troponine T hypersensible	Méthode immuno chimique	Sandwich-électrochimiluminescence, Ruthénium	-	3-10000 ng/L	4,8	13,00
UR	Urée	Méthode enzymatique	Uréase	340 nm	0,5-40 mmol/L	2,2	5,35

Pour chaque paramètre sont précisés : l'acronyme, le nom du paramètre, la méthodologie utilisée (principe, méthode et longueur d'onde de mesure), le domaine de linéarité fourni par le fabricant, ainsi que le CV de reproductibilité obtenu pendant la période de l'étude (déterminé comme la valeur la plus élevée obtenue par passage de 3 niveaux de contrôle interne de qualité) et l'incertitude de mesure des paramètres déterminée à partir des résultats de contrôles internes de qualité externalisés. ND = non déterminé.

Alanine amino transférase (ALAT)

La mesure de l'activité ALAT est impactée par l'hémolyse. Pour une valeur normale d'ALAT (0,34 μkat), l'hémolyse interfère de façon positive pour une concentration en hémoglobine de 50 $\mu\text{mol/L}$ (0,8 g/L) puis de façon négative à partir de 750 $\mu\text{mol/L}$ (12,1 g/L). Pour une activité ALAT élevée (3 $\mu\text{kat/L}$), l'interférence négative n'apparaît que pour des concentrations en hémoglobine plus élevées : 500 $\mu\text{mol/L}$ (8,1 g/L), elle est ensuite proportionnelle à l'importance de l'hémolyse (figure 3A).

Albumine (ALB)

Aucune interférence de l'hémolyse (étudiée de 0 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$ soit de 0 à 32,2 g/L) sur la mesure de l'albumine (méthode colorimétrique au vert de bromocrésol) n'est observée pour une valeur normale et une valeur basse (40 et 21 g/L) (figure 1A).

Aspartate amino transférase (ASAT)

L'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de l'activité ASAT. Pour une valeur d'ASAT normale à 0,34 $\mu\text{kat/L}$, une augmentation de plus de 10 % de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 7 $\mu\text{mol/L}$ soit 0,1 g/L, donc bien avant le seuil visuel de détection. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse jusqu'à une concentration en hémoglobine de 300 $\mu\text{mol/L}$ (4,8 g/L), au-delà de cette concentration en hémoglobine un plateau est atteint. Cependant pour des

activités ASAT supérieures à la normale, on ne retrouve pas cette interférence de l'hémolyse à des seuils aussi bas. En effet, nous avons testé l'interférence de l'hémolyse pour deux activités ASAT à 3,3 et 7,4 $\mu\text{kat/L}$; dans ces conditions, l'augmentation de l'activité mesurée n'est observée qu'à partir de concentration en hémoglobine supérieure à 200 $\mu\text{mol/L}$ (3,2 g/L). De plus, elle reste modérée et ne semble pas proportionnelle à l'importance de l'hémolyse (figure 2A).

Acide urique (AUR)

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure de l'acide urique (méthode à l'uricase) n'est observée pour les valeurs normales d'uricémie : 211 et 372 $\mu\text{mol/L}$ (figure 1B).

Calcium (CA)

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure du calcium (méthode NM-BAPTA) n'est observée pour une valeur normale et une valeur basse de calcémie : 2,44 et 1,13 mmol/L (figure 1C).

Créatinine kinase (CK)

Sur une valeur de CK normale (1,64 $\mu\text{kat/L}$), l'hémolyse interfère évidemment de façon positive de façon assez importante. Une augmentation de plus de 10 % de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 75 $\mu\text{mol/L}$, soit 1,2 g/L. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse (figure 2B).

Article original

Tableau 2. Paramètres pour lesquels l'influence de l'hémolyse a été étudiée sur l'automate Cobas 6000 ce Roche.

Paramètre	Données fournisseur			Données expérimentales					
	Valeur testée	Index d'hémolyse (exprimé en concentration d'hémoglobine)		Valeur étudiée	Index d'hémolyse déterminé	Valeur étudiée	Index d'hémolyse déterminé	Valeur étudiée	Index d'hémolyse déterminé
		$\mu\text{mol/L}$	g/L						
ALAT ($\mu\text{kat/L}$)	0,58	436	7	0,34	<u>44</u>	2,94	<u>305</u>		
ALB (g/L)	35	621	10	21	> 1999	40	> 795		
ASAT ($\mu\text{kat/L}$)	0,58	12	0,2	0,34	< <u>7</u>	3,32	154	7,35	> 186
AUR ($\mu\text{mol/L}$)	417	621	10	211	> 1999	372	> 1101		
CA (mmol/L)	2,2	621	10	1,13	> 1999	2,44	> 1346		
CK ($\mu\text{kat/L}$)	2,34	124	2	1,64	<u>44</u>				
CRE ($\mu\text{mol/L}$)	80	621	10	62	693	268	> 1000		
CRP (mg/L)	5	621	10	35	> 1999	182	> 1037		
CT (mmol/L)	5,2	436	7	2,19	144	3,69	<u>269</u>		
GGT ($\mu\text{kat/L}$)	0,67	124	2	0,83	540	7,12	587		
LDH ($\mu\text{kat/L}$)	3,34	9	0,15	2,84	< <u>7</u>				
LIP ($\mu\text{kat/L}$)	1	621	10	0,6	<u>835</u>	1,47	<u>272</u>	3,54	< <u>531</u>
Mb ($\mu\text{g/L}$)	NC	869	14	43	890				
Mg (mmol/L)	0,7	496	8	0,45	429				
NT-pro BNP (ng/L)	NC	621	10	196	> 1056	1830	> 1999		
P (mmol/L)	0,87	186	3	0,65	<u>74</u>				
PAL ($\mu\text{kat/L}$)	1,67	124	2	0,99	<u>74</u>	3,79	> 1027	14,89	> 2147
PT (g/L)	66	621	10	36	<u>220</u>	69	<u>385</u>		
S100 ($\mu\text{g/L}$)	NC	621	10	0,06 0,09	> 1177	0,38	> 1145	1,2 1,96	> 1140 > 1028
TG (mmol/L)	2,3	436	7	0,99	<u>282</u>	2,94	> 1136		
TNT hs (ng/L)	> 100*	62	1	38,3	83	272,1	109		
UR (mmol/L)	8,3	621	10	5,6	> 1999	16,6	> 1006		

Pour chaque paramètre sont précisés : les données fabricants (valeur du paramètre pour laquelle a été déterminé l'index d'hémolyse et index d'hémolyse à partir de laquelle une interférence est signalée), les données expérimentales (valeurs testées au laboratoire et index d'hémolyse déterminé expérimentalement pour cette valeur). L'index d'hémolyse correspond à la concentration en hémoglobine la plus faible donnant un résultat supérieur à plus ou moins 10 % par rapport à la valeur attendue. En italique les index expérimentaux supérieurs à ceux fournis par le fabricant, en souligné les index expérimentaux inférieurs à ceux fournis par le fabricant. En gras les index expérimentaux identiques à ceux fournis par le fabricant. NC = données non communiquées, * sans précision.

Créatinine (CRE)

Selon la valeur de créatinine, l'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure. En effet, pour une valeur de créatinine normale (62 $\mu\text{mol/L}$), l'interférence apparaît pour une

valeur d'hémoglobininémie de 700 $\mu\text{mol/L}$ (11,3 g/L), tandis qu'aucune interférence n'est observée jusqu'à plus de 1 000 $\mu\text{mol/L}$ (16,1 g/L) d'hémoglobine pour une valeur de créatinine de 270 $\mu\text{mol/L}$ (figure 2C).

Protéine C réactive (CRP)

Aucune interférence de l'hémolyse sur le dosage de la CRP (méthode immuno-turbidimétrique) n'est observée pour les valeurs de 35 et 182 mg/L (figure 1D).

Cholestérol (CT)

L'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure du cholestérol. La valeur d'hémoglobine à partir de laquelle on observe une augmentation de mesure de plus de 10 % dépend de la valeur du cholestérol. Plus la valeur de cholestérol est basse, plus l'interférence apparaît pour des hémoglobinémies faibles. Dans notre exemple, pour une valeur de cholestérol de 3,7 mmol/L, l'interférence apparaît pour une valeur d'hémoglobine de 500 $\mu\text{mol/L}$ (8,1 g/L), tandis qu'elle apparaît dès 200 $\mu\text{mol/L}$ (3,2 g/L) lorsque la valeur de cholestérol est plus faible : 2,19 mmol/L (figure 2D).

Gamma glutamyl transférase (GGT)

La mesure de l'activité GGT est impactée de façon négative par l'hémolyse uniquement pour des hémolyses importantes correspondant à une hémoglobinémie > 500 $\mu\text{mol/L}$ (8,1 g/L). L'interférence est observée de façon quasi identique pour des valeurs normales ou élevées : 0,8 et 7 $\mu\text{kat/L}$ et proportionnelle à l'importance de l'hémolyse (figure 3B).

Lactate déshydrogénase (LDH)

Sur une valeur de LDH à 3 $\mu\text{kat/L}$, l'hémolyse interfère évidemment de façon positive sur la mesure de l'activité LDH de façon très importante, et ceci même en absence visible d'hémolyse. Une augmentation de plus de 10 % de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 7 $\mu\text{mol/L}$ soit 0,1 g/L, donc bien avant le seuil visuel de détection. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse (figure 2E).

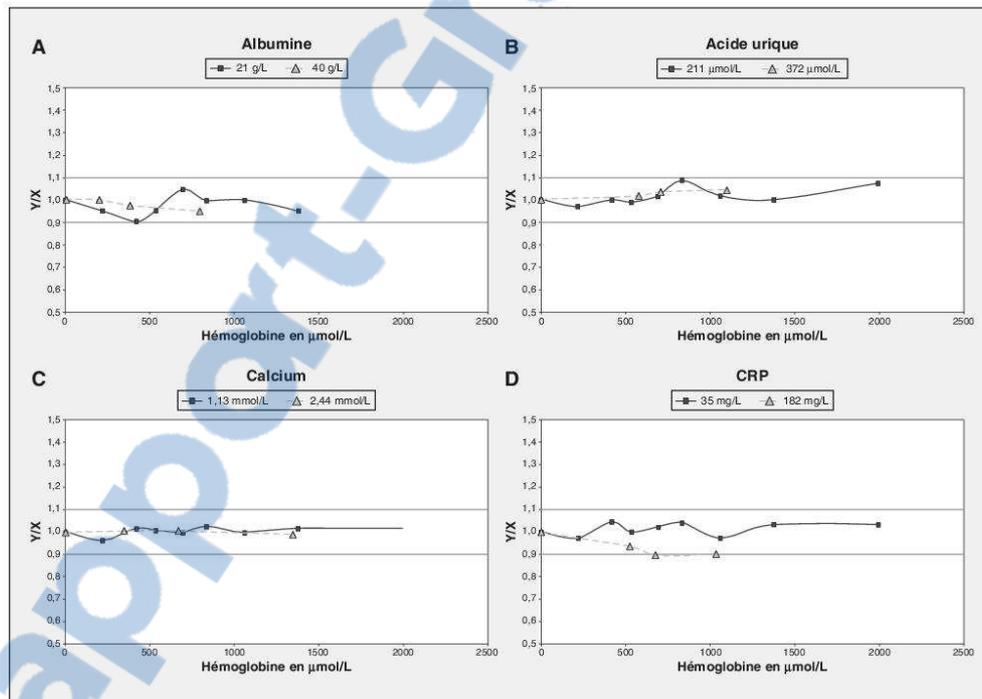


Figure 1. Paramètres non impactés par l'hémolyse. Représentation graphique des résultats expérimentaux obtenus pour l'acide urique (A), l'albumine (B), le calcium (C) la protéine C réactive (D), la myoglobine (E), le NT-pro BNP (F), la protéine S100 (G), et l'urée (H). En abscisse la concentration en hémoglobine dans l'échantillon en $\mu\text{mol/L}$. En ordonnée le rapport entre la valeur du paramètre obtenue en présence d'hémoglobine et la valeur du paramètre obtenue en absence d'hémoglobine. Les traits horizontaux bleus indiquent la zone d'acceptabilité de 10 % soit un rapport compris entre 0,9 et 1,1.

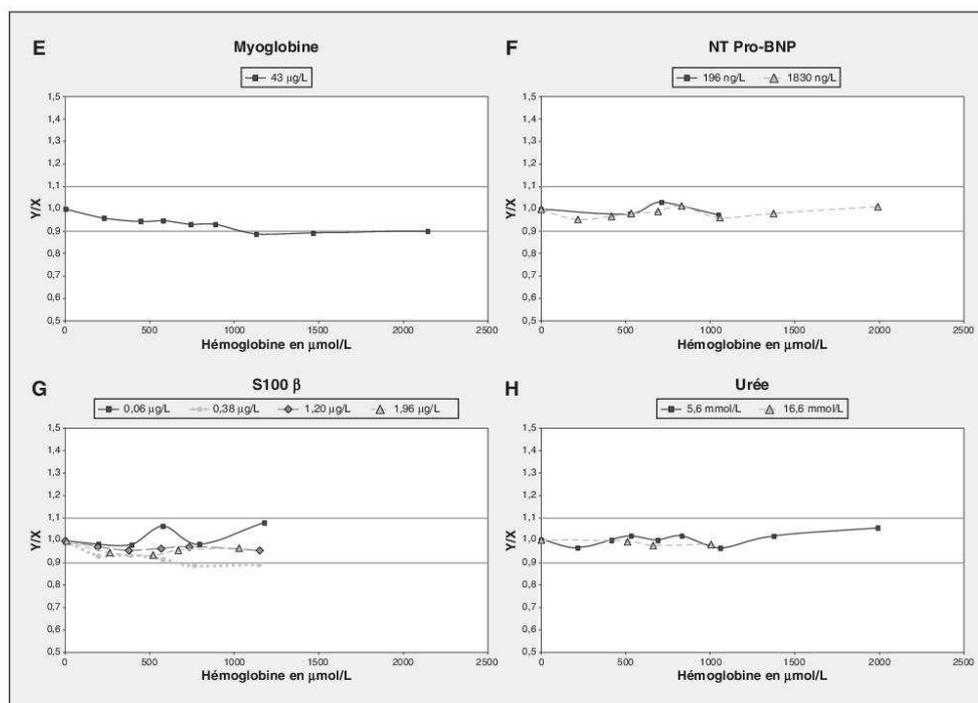


Figure 1. (suite)

Lipase (LIP)

La mesure de l'activité lipasique est impactée de façon négative par l'hémolyse. Cette interférence est plus importante pour une activité lipase élevée que pour une activité lipase normale. Pour une valeur normale (0,6 µkat/L) l'interférence s'observe à partir d'une valeur d'hémoglobininémie > 850 µmol/L (13,7 g/L), tandis que pour des activités lipase supérieures à 1 µkat/L (1,5 et 3,5 µkat/L), une valeur d'hémoglobininémie > 500 µmol/L (8,1 g/L) entraîne une diminution de plus de 10 % de l'activité mesurée (figure 3C).

Myoglobine (Mb)

L'hémolyse n'interfère quasiment pas sur le dosage de la myoglobine. Aucune interférence n'est observée sur une valeur de myoglobine de 43 µg/L jusqu'à une valeur d'hémoglobine de 1 000 µmol/L (16,1 g/L). Au-delà, on observe une diminution très légère (maximum 12 %) pour des valeurs d'hémoglobine comprises entre 1 000 et 2 000 µmol/L (16,1 et 32,2 g/L) (figure 1E).

Magnésium (Mg)

L'hémolyse interfère de façon positive sur la mesure de du magnésium. La valeur d'hémoglobininémie à partir de laquelle on observe une augmentation de mesure de plus de 10 % est de 500 µmol/L (8,1 g/L). Cette augmentation est ensuite proportionnelle à l'importance de l'hémolyse (figure 2F).

Fragment N terminal du précurseur du peptide natriurétique de type B (NT-Pro BNP)

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure du NT-pro BNP (méthode Clia) n'est observée pour les valeurs normales et élevées (196 et 1 830 ng/L) (figure 1F).

Phosphore (P)

Pour une phosphorémie normale (0,65 mmol/L), l'hémolyse interfère évidemment de façon positive de façon assez importante. Une augmentation de plus de

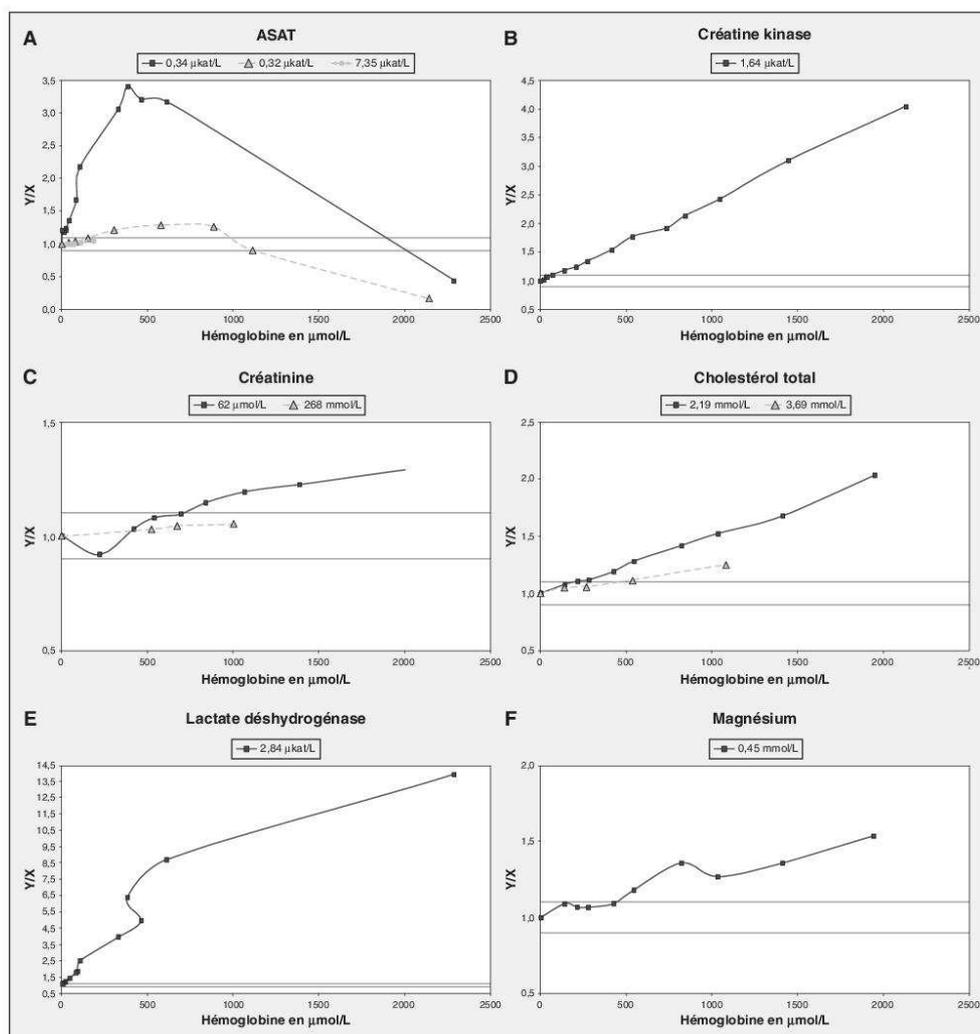


Figure 2. Paramètres impactés de façon positive par l'hémolyse. Représentation graphique des résultats expérimentaux obtenus pour l'aspartate amino-transférase (A), le cholestérol total (B), la créatine kinase (C), la créatinine (D), la lactico-déshydrogénase (E), le magnésium (F), les protéines totales (G), les triglycérides (H). En abscisse la concentration en hémoglobine dans l'échantillon en $\mu\text{mol/L}$. En ordonnée le rapport entre la valeur du paramètre obtenue en présence d'hémoglobine et la valeur du paramètre obtenue en absence d'hémoglobine. Les traits horizontaux bleus indiquent la zone d'acceptabilité de 10 % soit un rapport compris entre 0,9 et 1,1.

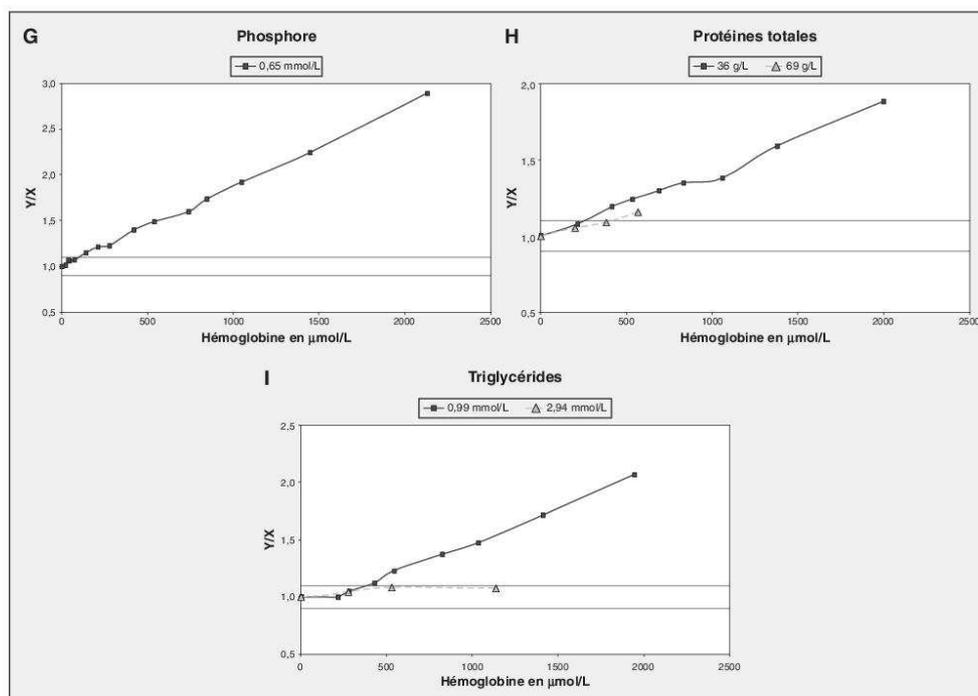


Figure 2. (suite)

10 % de l'activité mesurée est notée avec une concentration en hémoglobine de 100 $\mu\text{mol/L}$ soit 1,6 g/L. Cette augmentation est proportionnelle au degré d'hémolyse (figure 2G).

Phosphatases alcalines (PAL)

La mesure de l'activité PAL est impactée de façon négative par l'hémolyse, mais uniquement pour une activité PAL normale. En effet pour une activité PAL à 1 $\mu\text{kat/L}$, il y a diminution de l'activité mesurée à partir d'une concentration en hémoglobine de 140 $\mu\text{mol/L}$ (2,3 g/L). Cette diminution augmente proportionnellement jusqu'à une hémoglobinémie de 750 $\mu\text{mol/L}$ (12,1 g/L), puis devient moins importante au-delà mais reste significative. Par contre, pour une activité PAL élevée (3,8 et 15 $\mu\text{kat/L}$), aucun impact de l'hémolyse n'est retrouvé quelle que soit la valeur d'hémoglobine sur une gamme de 0 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$ (0 à 32,2 g/L) (figure 3D).

Protéines totales (PT)

L'hémolyse interfère de façon positive sur le dosage des protéines totales. La valeur d'hémoglobinémie à partir de laquelle on observe une augmentation de mesure de plus de 10 % est de 400 $\mu\text{mol/L}$ (6,4 g/L). Pour une valeur de protéines totales normale, l'interférence est présente dès 250 $\mu\text{mol/L}$ (4,0 g/L) pour des valeurs de protéines totales inférieures aux valeurs usuelles. Cette augmentation est ensuite proportionnelle à l'importance de l'hémolyse tant pour une valeur normale : 69 g/L que basse : 36 g/L. Cette interférence est directement liée à la surcharge protéique induite par l'hémoglobine car, si on déduit de la valeur de PT mesurée la valeur d'hémoglobine, on trouve des résultats compris entre $\pm 10\%$ (figure 2H).

Protéine S100 β (S100)

Aucune interférence de l'hémolyse (hémoglobinémie testée de 0 à 1 150 $\mu\text{mol/L}$ soit 18,5 g/L) n'est observée sur

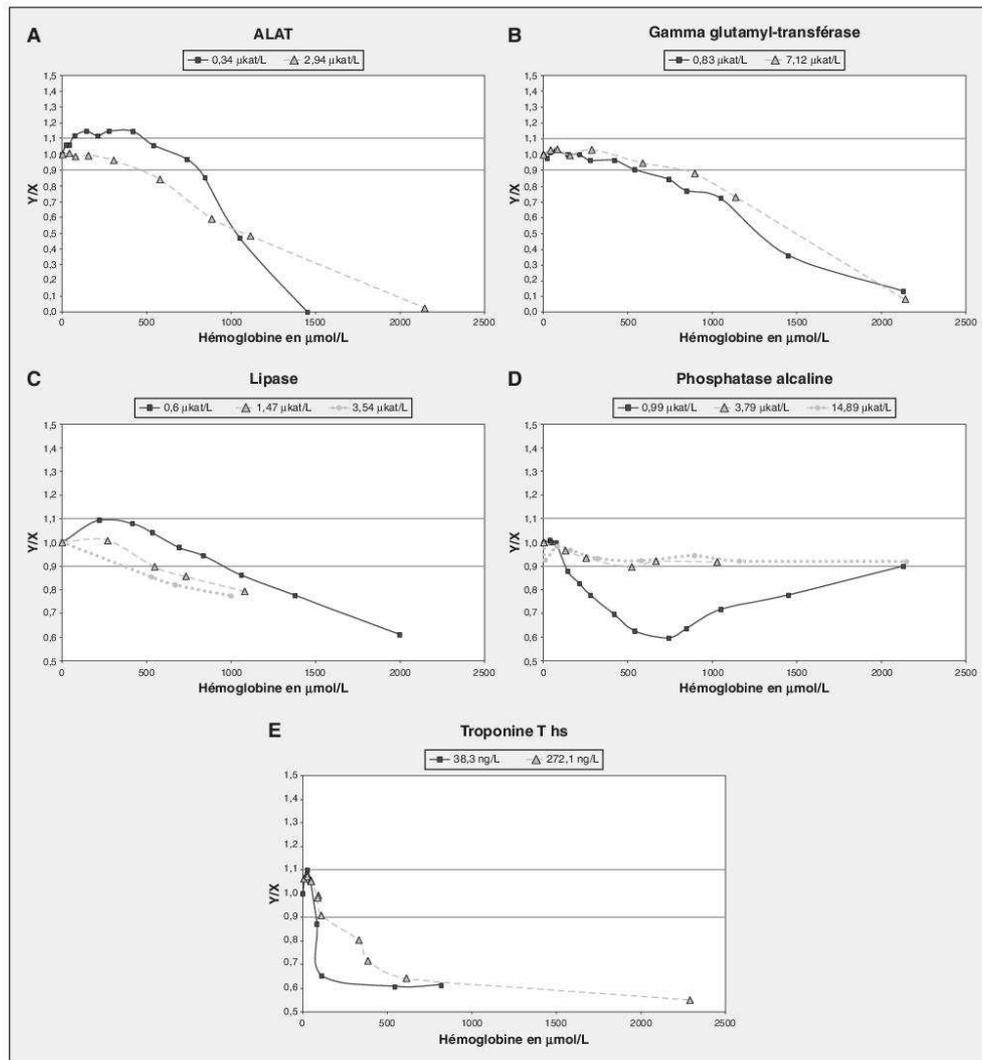


Figure 3. Paramètres impactés de façon négative par l'hémolyse. Représentation graphique des résultats expérimentaux obtenus pour l'alanine amino-transférase (A), la gamma glutamyl-transférase (B), la lipase (C), la phosphatase alcaline (D), la troponine T hypersensible méthode stat (E). En ordonnée le rapport entre la valeur du paramètre obtenue en présence d'hémoglobine et la valeur du paramètre obtenue en absence d'hémoglobine. Les traits horizontaux bleus indiquent la zone d'acceptabilité de 10 % soit un rapport compris entre 0,9 et 1,1.

Article original

le dosage de la protéine S100 β , pour des valeurs normales : 0,06 $\mu\text{g/L}$ comme pour des valeurs élevées jusqu'à 1,96 $\mu\text{g/L}$ (figure 1G).

Triglycérides (TG)

Selon la valeur de triglycérides, l'hémolyse interfère de façon positive ou non sur la mesure. En effet, pour une valeur de triglycérides normale, l'interférence apparaît pour une valeur d'hémoglobininémie de 400 $\mu\text{mol/L}$ (6,4 g/L), tandis qu'aucune interférence n'est observée jusqu'à plus de 1 100 $\mu\text{mol/L}$ (17,7 g/L) d'hémoglobine pour une valeur de triglycérides de 3 mmol/L (figure 2I).

Troponine T hypersensible (TNT)

L'hémolyse interfère de façon négative sur la mesure de la troponine T ultrasensible (méthode rapide STAT), dès 80 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobininémie (1,6 g/L) pour des valeurs de troponine de 38 ng/L (zone grise) et à partir de 110 $\mu\text{mol/L}$ d'hémoglobininémie (1,8 g/L) pour une valeur de troponine à 270 ng/L. Cette interférence ne semble pas être de plus de - 40 % par rapport à la valeur réelle, quelle que soit l'importance de l'hémolyse (figure 3E).

Urée (UR)

Aucune interférence de l'hémolyse sur la mesure de l'urée (méthode à l'uréase) n'est observée pour les valeurs normales et élevées : 5,6 et 16,5 mmol/L (figure 1H).

À l'issue de ce travail nous pouvons donc classer les paramètres étudiés en 3 catégories.

Paramètres non impactés ou très faiblement impactés par l'hémolyse

Dans notre étude, un certain nombre de paramètres ne semblent aucunement impactés par l'hémolyse. Il s'agit de : albumine, acide urique, calcium, CRP, myoglobine, NT-proBNP, protéine S100 β et urée. Pour ces paramètres, aucune variation supérieure à plus ou moins 10 % par rapport à la référence n'est observée, et ceci sur l'ensemble de la plage d'hémolyse s'étendant de 12 à 2 000 $\mu\text{mol/L}$ (0,2 à 32,2 g/L), et sur deux valeurs du paramètre. Comparé à l'index fournisseur (621 $\mu\text{mol/L}$ = 10 g/L), nous observons que même bien au-delà de cet index la fiabilité du résultat est assurée pour ces 6 paramètres (figure 1).

Paramètres faiblement impactés par l'hémolyse

Pour la créatinine, le cholestérol total, GGT, la lipase, le magnésium et les triglycérides, on peut considérer que l'hémolyse jusqu'à 400 $\mu\text{mol/L}$ (6,4 g/L) n'induit pas de biais supérieur à plus ou moins 10 % sur des valeurs nor-

males et/ou pathologiques. L'interférence constatée au-delà de cette limite n'est pas retrouvée pour des valeurs pathologiques de triglycérides ou de créatinine (figures 2 et 3).

Paramètres perturbés par l'hémolyse

Parmi les paramètres perturbés par l'hémolyse, il faut distinguer ceux pour lesquels l'interférence est identique quelle que soit la valeur du paramètre. Il s'agit des protéines totales et de la troponine T. Pour l'ALAT, l'ASAT, et la PAL, l'interférence est observée de façon plus importante pour des valeurs normales que pour des valeurs élevées.

Enfin, la CK, la LDH et le phosphore sont des paramètres très fortement impactés par l'hémolyse, et ceci dès les très faibles concentrations en hémoglobine, l'interférence est ensuite proportionnelle au degré d'hémolyse (figure 2).

Discussion

L'influence exercée par l'hémolyse sur la mesure des paramètres biochimiques permet de distinguer plusieurs catégories : les paramètres non impactés, les paramètres impactés de façon positive et proportionnelle au degré d'hémolyse, et ceux pour lesquels l'interférence est d'origine spectrale qu'ils soient impactés de façon négative ou positive. Le seuil de 10 % de variation par rapport à la valeur vraie définissant une interférence sur la mesure a été choisi en fonction des données de la littérature, mais également compte tenu de l'incertitude de mesure déterminée dans notre laboratoire, pour chacun des paramètres étudiés. Pour les paramètres impactés par l'hémolyse, il est toutefois bon de distinguer que, pour certains, l'influence de l'hémolyse est variable en fonction de la valeur du paramètre permettant le rendu de résultats anormaux (élevés par exemple) sans difficulté.

Absence d'interférence

Certains paramètres ne sont aucunement impactés par l'hémolyse quelle que soit la valeur du paramètre considérée (basse, normale ou élevée). Il s'agit de l'albumine, l'acide urique, du calcium, de la myoglobine, du NT-proBNP de la CRP, de la protéine S100 β et de l'urée. Pour tous ces paramètres, la présence dans l'échantillon d'hémoglobine jusqu'à une concentration de 1 000 $\mu\text{mol/L}$ (soit 16,1 g/L) voire 2 000 $\mu\text{mol/L}$ (32,2 g/L) n'entraîne aucune erreur sur la mesure.

Interférences d'apport : paramètres augmentés de façon proportionnelle au degré d'hémolyse

Il s'agit des paramètres pour lesquels les valeurs intra-érythrocytaires sont très supérieures aux valeurs

plasmatiques et donc où l'hémolyse impacte le résultat de façon positive et proportionnelle : ASAT, CK, LDH, Mg, P, PT. Cependant, bien que le mécanisme causant l'interférence soit le même, les limites d'indice sont variables car elles dépendent du rapport intra-érythrocytaire/plasma de l'analyte considéré. C'est pour la LDH, dont le rapport intra-érythrocytaire/plasma est égal à 750, que l'indice d'hémolyse est le plus faible < 7 $\mu\text{mol/L}$ (< 0,1 g/L). Pour le phosphore et l'ASAT, bien que les rapports intra-érythrocytaire/plasma soient comparables (40 pour ASAT et 50 pour le P), l'impact de l'hémolyse est différent puisque l'augmentation observée est moins importante pour le P que pour l'ASAT se traduisant par un indice d'hémolyse < 7 $\mu\text{mol/L}$ (0,1 g/L) pour l'ASAT contre 74 $\mu\text{mol/L}$ (1,2 g/L) pour le P. C'est évidemment pour ces paramètres que l'on retrouve les indices fournisseurs les plus faibles mais qui s'étendent quand même de 12 $\mu\text{mol/L}$ (0,2 g/L) pour ASAT à 186 $\mu\text{mol/L}$ (3,0 g/L) pour le phosphore [16]. Les résultats obtenus dans notre étude sont légèrement plus faibles que les limites indiquées dans les fiches techniques fournisseurs [17, 18].

**Interférences physiques ou chimiques :
paramètres pour lesquels l'interférence sera
variable en fonction de la valeur du paramètre**

Les problèmes d'interférence spectrale ne se manifestent ni de façon proportionnelle à l'importance de l'hémolyse, ni sur l'ensemble de la gamme de mesure. Ceci est observé que l'interférence soit négative (sous-estimation) ou positive (surestimation). En règle générale, l'interférence est plus importante pour les valeurs normales du paramètre, mais devient beaucoup plus faible voire négligeable pour des valeurs élevées, rendant alors tout à fait possible le rendu du résultat sans risque de sur- ou sous-estimation. En effet, par exemple pour la PAL, la présence d'hémoglobine entraîne une sous-estimation du résultat mais ceci n'est observé que pour des valeurs normales de PAL, des valeurs de PAL élevées ne sont pas sous estimées jusqu'à des concentrations en hémoglobine > 1 000 $\mu\text{mol/L}$ (16,1 g/L). De même, la surestimation des TG, du CT et de la CRE n'est observée que pour des valeurs normales ou basses, les valeurs élevées n'étant pas surestimées de plus de 10 %. Il en est de même pour l'ASAT ou, bien que la quantité intra-érythrocytaire soit élevée, des valeurs d'ASAT à plus de 10 fois ou 20 fois la normale ne sont pas impactées par l'hémolyse et peuvent être rendues jusqu'à une valeur d'hémoglobine de 200 $\mu\text{mol/L}$ (3,2 g/L). Enfin pour l'ALAT et la lipase, on observe l'effet inverse, à savoir une interférence de l'hémolyse plus importante sur les valeurs élevées que sur les valeurs basses.

La qualité informative des paramètres biochimiques d'urgence est largement démontrée dans la prise en charge des patients. Les conditions de réalisation de ces examens ont permis d'améliorer le temps de rendu du résultat puisque, dans la liste des paramètres que nous avons étudiés, le temps maximum d'analyse est de 18 min. Associé à un délai d'acheminement correct des échantillons, le laboratoire est donc à même de rendre les résultats dans un délai compatible avec une prise en charge rapide des patients, c'est-à-dire en moins d'une heure. Ceci est vrai pour les échantillons qui ne présentent aucune anomalie post-centrifugation et en particulier l'absence d'hémolyse. Les causes d'hémolyse sont effectivement nombreuses, le pourcentage des échantillons hémolysés est variable selon les hôpitaux et les systèmes de prélèvement utilisés. Si, dans la plupart des cas, cette hémolyse est extravasculaire, il n'en demeure pas moins qu'elle peut être d'origine intravasculaire dans environ 2 % des cas, ne devant pas conduire à une absence de dosage ou de rendu de résultat [19]. Une solution coûteuse consisterait à doser systématiquement l'haptoglobine sur les échantillons hémolysés. En effet, la diminution de l'haptoglobine est reconnue comme un témoin de l'hémolyse *in vivo* (indépendamment du mécanisme et du lieu), et semble peu affectée par l'hémolyse *in vitro* [20]. Ceci tient au fait que le complexe hémoglobine-haptoglobine est rapidement éliminé de la circulation par les monocytes et macrophages tissulaires *via* la fixation du complexe sur le récepteur CD136, ce mécanisme ne pouvant donc se produire qu'*in vivo*. Le dosage systématique de l'haptoglobine dans les échantillons présentant un index d'hémolyse élevé n'étant pas envisageable, il faut pouvoir connaître les limites de dosage de chacun des analytes, et surtout de rendu des résultats, sachant qu'un patient pour lequel l'échantillon est hémolysé parce que difficile à prélever, risque de ne jamais avoir de résultat pour certains paramètres impactés par l'hémolyse.

Il faut donc juger de l'impact de l'hémolyse non seulement en termes d'intensité de l'hémolyse mais aussi de la valeur du résultat trouvé. Ainsi, il est informatif et intéressant d'observer que l'interférence n'est pas comparable quelle que soit la valeur du paramètre. En cas d'absence d'interférence de l'hémolyse sur une valeur pathologique, on ne peut pas utiliser l'argumentaire « impossibilité technique ou absence de dosage de l'analyte car interférence analytique liée à l'hémolyse ».

Les limites « fournisseur » établies sont utilisées dans la programmation des automates pour signaler lorsque l'indice limite est dépassé que le paramètre en question est sous alarme. Une cause d'erreur possible consisterait alors à diluer l'échantillon de manière à réduire l'indice d'hémolyse (volume d'échantillon réduit donc diminution de l'indice d'hémolyse), alors que l'impact de l'hémolyse

Article original

devient plus important dans cette zone de mesure [21]. C'est le cas par exemple pour l'ASAT, les PAL ou la CRE où l'on voit clairement que pour des valeurs faibles l'impact de l'hémolyse est important alors qu'il est négligeable pour des valeurs élevées.

Enfin, l'absence de rendu de résultat par le laboratoire de certains analytes pour un échantillon hémolysé doit être opposée à la possibilité fournie aux services de soins équipés d'appareils de biologie délocalisée d'obtenir sur sang total un certain nombre de paramètres. Ces appareils fournissent des résultats sans mesure de l'index d'hémolyse (CA, CRE, K, GLU) et particulièrement la kaliémie, puisque ces analyses sont réalisées sur sang total (d'où leur intérêt potentiel en urgence). Les services de soins obtenant des résultats sur un appareil de biologie délocalisée, alors qu'ils ne les obtiennent pas par le laboratoire, pourraient alors être tentés de privilégier à tort cette utilisation.

Grâce à cette étude, nous avons évalué l'impact de l'hémolyse sur différents niveaux de valeurs des paramètres biochimiques couramment demandés en urgence. Ceci nous a permis d'établir un certain nombre de règles sur le rendu des résultats en cas d'échantillon hémolysé. Ces règles permettent de garantir aux cliniciens et aux patients le rendu de résultats fiables même en cas d'échantillon hémolysé [6, 22]. Elles peuvent être résumées de la façon suivante.

Le dosage et le rendu de résultats des paramètres non impactés par l'hémolyse sont systématiques et ne s'accompagnent pas de commentaire. Les valeurs élevées des paramètres ASAT, CT, CRE, TG doivent être rendues même si l'échantillon est hémolysé, avec un commentaire signalant la présence d'hémolyse et le sens de l'interférence. Les valeurs élevées des paramètres pour lesquels l'hémolyse entraîne une sous-estimation du résultat : ALAT, GGT, LIP, PAL, TNT doivent être rendues avec un commentaire signalant la sous-estimation liée à l'hémolyse. Les résultats normaux ou élevés pour les paramètres impactés de façon proportionnelle : ASAT, CK, LDH, MG, P, PT et bien sûr le potassium (K) ne doivent pas être rendus. Les résultats des paramètres Mg, P et bien sûr K inférieurs aux normes usuelles doivent être rendus avec un commentaire indiquant que l'hémolyse surestime le résultat.

Conclusion

L'objectif d'un laboratoire de biochimie d'urgence est de rendre rapidement des résultats fiables. Nous avons étudié l'impact de l'hémolyse sur la détermination des paramètres biochimiques les plus fréquemment demandés en urgence, et confronté les résultats obtenus aux données indiquées par le fournisseur. Ceci nous a permis d'élargir nos conditions

de rendu de résultats pour certains paramètres, particulièrement en cas de valeurs pathologiques, que l'hémolyse soit liée au patient ou aux conditions pré-analytiques. Le rendu de résultats des paramètres dont la mesure n'est pas perturbé par la présence d'hémoglobine, même sur prélèvement hémolysé permet un gain de temps dans la prise en charge des patients.

Remerciements. Nous remercions la société Roche Diagnostics pour la fourniture des réactifs nécessaires à cette étude.

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Lippi G, Luca Salvagno G, Blanckaert N, Giavarina D, Green S, Kitchen S, et al. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:934-9.
2. Lippi G, Luca Salvagno G, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:311-6.
3. Zimoffen C, Gerrard G, Ensinnck A, D'Arrigo M. Hemolysis interference in routine clinical chemistry assays. *MI54. Clin Chem Lab Med* 2008;46:S307.
4. Hawkins RC. Poor knowledge and faulty thinking regarding hemolysis and potassium elevation. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:216-20.
5. Plehani M, Lippi G. Hemolysis index : quality indicator or criterion for sample rejection ? *Clin Chem Lab Med* 2009;47:899-902.
6. Negri M, Facchinetti R. Results of hemolyzed samples can be useful. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1339.
7. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. *Biochim Clin* 2002;26:95-7.
8. Dhondt J, Hayte J, Demouveau A. Les prélèvements hémolysés. *Ann Biol Clin* 2000;58:639.
9. Lippi G, Salvagno GL, Brocco G, Guidi GC. Preanalytical variability in laboratory testing : influence of the blood drawing technique. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:319-25.
10. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, et al. Haemolysis : an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:764-72.
11. Ismaïl A, Shingler W, Seneviratne J, Burrows G. In vitro and in vivo haemolysis and potassium measurement. *British Med J* 2005;330:949.
12. Wenk RE. Mechanism of interference by hemolysis in immunoassays and requirements for sample quality. *Clin Chem* 1998;44:2554.
13. Bais R. The effect of sample hemolysis an cardiac troponin I and T assays. *Clin Chem* 2010;56:1357-9.
14. CLSI. *Interference testing in clinical chemistry : approved guideline-second edition*. CLSI document EP07-A2. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

15. Petrova D, Cocisiu G, Eberle C, Oellerich M, Brandhorst G. Can the Roche hemolysis index be used for automated determination of free hemoglobin ? A comparison to photometric assays. *Clin Chem Lab Med* 2012 ; 50 : A261.
16. Zou J, Nolan DK, LaFiore AR, Scott MG. Estimating the effects on hemolysis on potassium and LDH laboratory results. *Clin Chim Acta* 2013 ; 421 : 60-1.
17. Ji ZJ. Reply to «Haemoglobin, bilirubin, and lipid interference on Roche Cobas 6000 assays». *Clin Chim Acta* 2012 ; 413 : 342-3.
18. Ji ZJ, Meng QH. Evaluation of the interference on haemoglobin, bilirubin and lipid interference on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta* 2011 ; 412 : 1550-3.
19. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, *et al.* Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2007 ; 45 : 728-36.
20. Zerbani A, Giraudeau V. Dosage de l'haptoglobine par immunonéphélométrie sur Immage®(Beckmann) : attention à l'interférence de l'hémoglobine. *Ann Biol Clin* 1999 ; 57 : 490.
21. Vermeer HJ, Steen G, Naus AJ, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmaker CH. Correction of patient results for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids : a practical approach. *Clin Chem Lab Med* 2007 ; 45 : 114-9.
22. Carraro P. Potassium report of hemolyzed serum samples. *Clin Chem Lab Med* 2008 ; 46 : 425.

DAMIEN ALI

**INTERFÉRENCES DE L'HÉMOLYSE, DE LA LIPÉMIE ET DE L'ICTÈRE QUE LE DOSAGE DES
PRINCIPAUX PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES**

RÉSUMÉ

L'étude de l'influence de l'hémolyse, de la lipémie et de l'ictère a été déterminée expérimentalement pour vingt-quatre paramètres biochimiques dosés sur l'automate Cobas 6000 ce (Roche Diagnostics). La méthode des ajouts a été utilisée pour créer une gamme d'hémoglobine, d'Intralipid® et de ditaurate de bilirubine de concentration croissante. La limite de 10 % de variation a été choisie pour définir une influence sur la mesure. Les paramètres étudiés ont été classés en plusieurs catégories selon que leur dosage était impacté ou non par ces trois facteurs pré-analytiques. La connaissance de la variabilité de ces interférences permet au biologiste d'adapter ses modalités de compte rendu dans le cas d'échantillons plasmatiques hémolysés, lipémiques ou ictériques.

Mots-clés : Hémolyse, lipémie, ictère, interférence, Cobas 6000

HEMOLYSIS, LIPEMIA AND ICTERUS INFLUENCES ON BIOCHEMICAL PARAMETERS

MEASUREMENT

ABSTRACT

The influence of hemolysis, lipemia and icterus has been studied for 24 biochemical parameters measured onto Cobas 6000 Ce Roche analyser. The additions method was used to create a range of increasing concentration of hemoglobin, Intralipid® and bilirubin ditaurate . The limit of 10 % variation was chosen to define an influence on the measurement. Then, the parameters studied were classified into categories according on whether the assay was affected or not by the three pre-analytical factors. The knowledge of these interferences is crucial and allows the biologist to provide trusted medical reports even in case of hemolyzed, lipemic or icteric plasma samples.

Keywords : Hemolysis, lipemia, icterus, interference, Cobas 6000