



Analite Özgü Preanalitik Değişkenler

Doç. Dr. Fehime Benli Aksungar

Acibadem Labmed Laboratuvarları
İleri Analiz ve Metabolizma
fehime.aksungar@acibademlabmed.com.tr

Acibadem Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
fehime.aksungar@acibadem.edu.tr

ACIBADEM
LABMED

ACIBADEM
ÜNİVERSİTESİ

3 ayrı spesifik test grubunun preanalitik özellikleri

- Kriyoglobulinemi
- İdrar Koruyucuları gerçekten etkili mi?
- Ağır metal ölçümlerinde preanalitik etkenler

Hasta

60 Yaşında, Erkek hasta

3 gündür koyu renk idrar ve vücutta sarılık

6 aydır bacaklarında döküntü şikayetleri var

Döküntü kortikosteroid tedavisine rağmen düzelmemiş!!!

Hemogram sonuçlarında anemi tespit edilince, anemi tedavisine başlanmış ancak takip hemogramlarında düzelme yok!!!!

Hemogram :

WBC $13 \times 10^3/\mu\text{L}$

RBC $2.0 \times 10^6/\mu\text{L}$

Hb 12.0 g/dL

Hct 22 %

MCV 111.7 fL

RDW

PLT $124 \times 10^3/\mu\text{L}$





Figure 1 Agglutinations on the complete blood count tube. It was anticoagulated with K2-EDTA, analyzed at room temperature and red blood cell, Hemoglobin and Hematocrit results were discordant with each other.

Table 1 Complete blood count results at room temperature vs 37 °C¹

	At room temperature	At 37 °C	Reference ranges
White blood cells	13.93	15.27	3.8-10.0 × 10 ³ /μL
RBC	2.0	3.1	4.0-6.2 × 10 ⁶ /μL
Hemoglobin	12.1	12.6	13.0-17.5 g/dL
Hematocrit	22	32.5	40%-52%
Mean corpuscular volume	111.7	103.5	80-95 fL
Mean corpuscular hemoglobin	61.4	40.1	25-34 pg
Mean corpuscular hemoglobin concentration	55	38.8	31-37 g/dL
RBC distribution width	Cannot be calculated	17.1	11.2%-15%
Platelets	124	142	150-400 × 10 ³ /μL

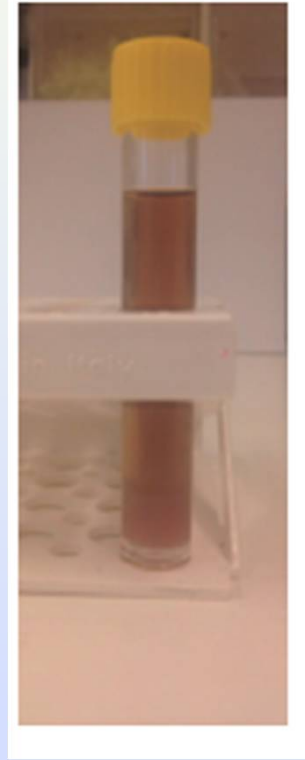
¹Measurements are performed from different samples. RBC: Red blood cells.

Kriyoglobulin?

Daha önce hastada vaskülit tabloları için Kriyoglobulin araştırması yapılmış, sonuç negatifmiş!!!

Tüpler örnek alımı öncesi 37°C getirildi
Yine 37°C de hücrelerin ayrılması için inkübe edildi.
Serum sekonder tüplere alındı ve 7 gün 4°C de bekletildi.
Hergün göz ile inspeksiyon yapıldı
6. ve 7. günde!!! gözle görünür bir presipitat tespit edildi ve
Kryokrit ölçümü yapıldı (%15)
Konfirmasyon için örnek 37 dereceye alınarak çözünmesi izlendi

Kriyoglobulin tespit edildi. Hasta HCV açısından araştırıldı



Submit a Manuscript: <http://www.wjgnet.com/esps/>
Help Desk: <http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx>
DOI: 10.12998/wjcc.v4.i3.81

World J Clin Cases 2016 March 16; 4(3): 81-87
ISSN 2307-8960 (online)
© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

CASE REPORT

Hepatitis C virus positive patient diagnosed after detection of atypical cryoglobulin

Belkiz Ongen, Fehime Benli Aksungar, Bahattin Cicek, Isin Akyar, Abdurrahman Coskun, Mustafa Serteser, Ibrahim Unsal



Kriyoglobulin ölçümü /tespiti preanalitik fazdan çok etkilenen bir işlem (Ön işlemler 37 °C de yapılmazsa tespit edilemeyebilir!!!)

Laboratuvar uzmanlarının bu konuda bilinçli olması gerekiyor
Bazı kriyoglobulinler (mikst tip) , 5-7. günde çökerler

Kriyoglobulin %90 oranla
HCV pozitif hastalarda
karşımıza çıkıyor, HCV
tedavisi ile miktarı azalıyor

Söz konusu hasta hem yanlış
tedavi aldı
Hem zaman kaybetti!!

Sample withdrawal and transport are the most important and the critical steps for detection of cryoglobulins. Several groups have been described different analytic approaches for detection of cryoglobulins^[4,10,18-20]. The main reason for false negative cryoglobulin results is incorrect withdrawal and transport procedures. United Kingdom National External Quality Assurance Scheme (UKNEQAS) organization conducted a research about detection and reporting of cryoglobulins in 137 laboratories; only in 36% of the laboratories the analysis was done without letting the temperature drop below 37 °C during serum separation, sample transport and centrifugation^[7].

Table 2 Classification of cryoglobulins and laboratory findings^[4,18]

Cryoglobulin type	Content	Related diseases	Laboratory findings
Type I	Monoclonal immunoglobulins (IgG, IgM or IgA) or Bence Jones protein/ monoclonal free light chains	Multiple Myeloma Waldenstrom Macroglobulinemia Lymphoproliferative disease related monoclonal gammopathy Light chain disease	Precipitation within 24 h Hyperviscosity
Type II (mixed)	Monoclonal immunoglobulins (IgG, IgM or IgA) and polyclonal immunoglobulins (usually IgG)	HCV Essential cryoglobulinemia Sjogren's syndrome Rheumatoid arthritis Chronic lymphocytic leukemia	Precipitation within 7 d HCV positivity Decreased C3 Decreased C4 Decreased CH50
Type III (mixed)	Polyclonal immunoglobulins	Essential cryoglobulinemia Sjogren's syndrome Systemic lupus erythematosus Viral infections (HBV, CMV, EBV, HIV) Endocarditis Biliary cirrhosis	Increased autoantibodies such as ANA, ENA, AMA

Kriyoglobulinler, soğukta damar içinde çökme eğiliminde olan non-spesifik antikorlar. Vaskulit ve nekroza neden olabilirler

Type I cryoglobulin concentrations are > 5 g/L, so that they tend to precipitate within 1 d; whereas in mixed cryoglobulinemia, development of precipitation can take a couple of days^[2]. After the precipitation is observed samples should be incubated at 37 °C again and dissolution of the precipitates at this temperature should be confirmed. If the precipitates do not dissolve at 37 °C, test should be reported to be negative. HBV: Hepatitis B virus; CMV: Cytomegalovirus; EBV: Epstein-Barr virus; ANA: Antinuclear antibodies; ENA: Extractable nuclear antigen antibodies; AMA: Antimitochondrial antibodies; HIV: Human immunodeficiency virus.

Kriyoglobulin Tiplendirmesi

Kriyokrit 3 kez 4-°C SF ile yıkandı ve en son 37-°C de çözünmesi sağlandı. IFE ve CZE/IS yöntemi ile tiplendirildi

Ongen B *et al.* HCV patient with atypical cryoglobulin

Immunodisplacement report

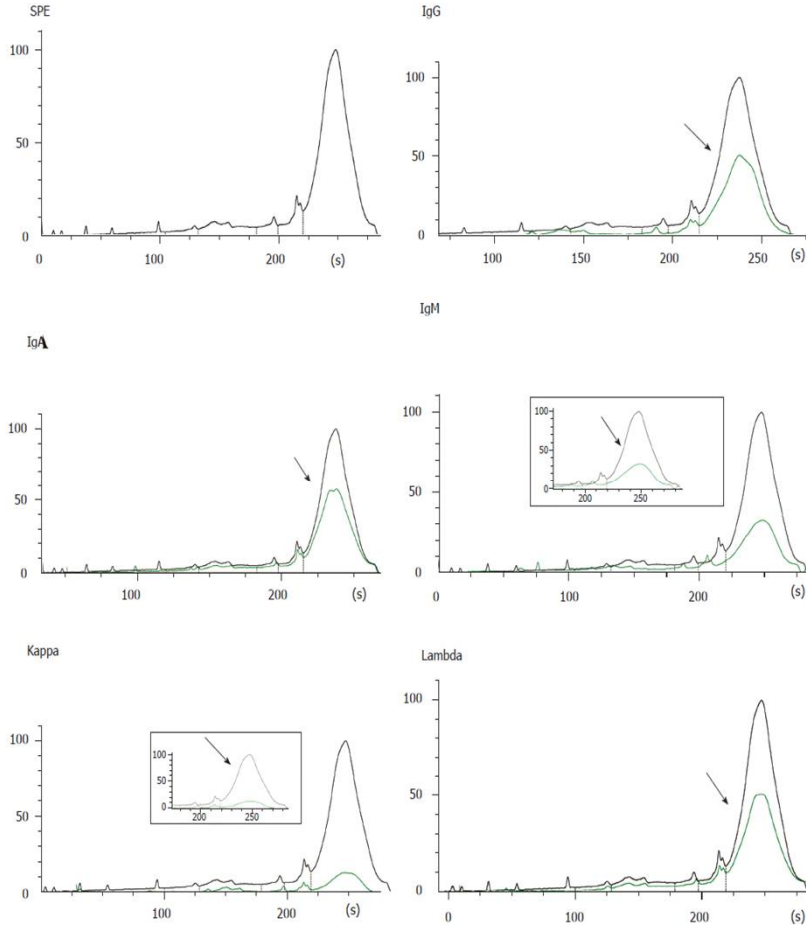


Figure 4 Cryoglobulin immunosubtraction was performed with V8 automated clinical capillary electrophoresis (Helena, United Kingdom). Arrows indicate specifically subtracted parts of immunoglobulins which mean cryoglobulin is composed of these. In this report, a mixed cryoglobulin is present. Monoclonal IgM kappa and polyclonal IgG and IgA heavy chains together with lambda light chain are detected (report shows heavy and light chains separately). Small frames indicate zoomed traces for monoclonal IgM kappa. Serum protein electrophoresis (SPE), shows total protein electrophoresis of cryoglobulin and an absent albumin band indicates washing and isolating of the cryoprecipitate is successfully performed.

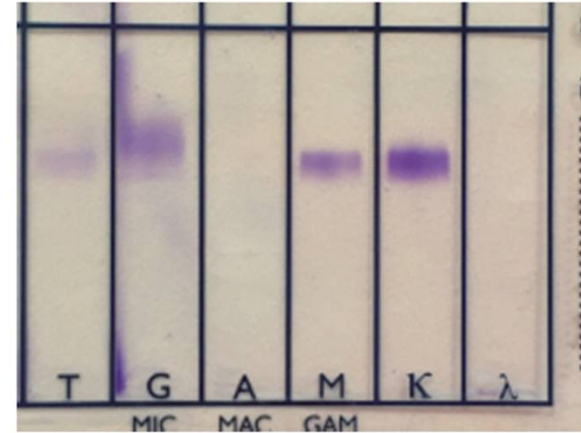


Figure 3 Cryoglobulin immunofixation electrophoresis with SAS-1 agarose gel (Helena, United Kingdom). A polyclonal IgG and monoclonal IgM kappa are detected. T lane shows total protein electrophoresis of cryoglobulin and an absent albumin band shows washing and isolating of the cryoprecipitate is successfully performed.

World J Clin Cases 2016 March 16; 4(3): 81-87

ISSN 2307-8960 (online)

© 2016 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Ongen B, et al.

CASE REPORT

Hasta

38 yaşında erkek hasta

24 saatlik idrar örneğinde katekolaminler ve metabolitleri istenmiş

İdrarın HCL ile toplanmış olduğunu düşünüyoruz. (Katoloğumuzda örnek toplama koşulları yazıyor.)

Adrenalin	18.9	<21ug/Gün
Noradrenalin	64.2	<80 ug/Gün
Dopamin	3506	<400 ug/Gün !!!
Normetanefrin	164	< 484 ug/Gün
Metanefrin	82	< 261 ug/Gün

**Örnek çalışılmadan önce
ölçülen PH değeri 5
Volum: 2580 mL**

Doktoruna danışılıyor, ilaç kullanmadığı öğreniliyor, yeni ve kontrollü bir 24 saatlik örnekle tekrarlandığı zaman, tüm sonuçlar referans aralığında bulunuyor

İdrar koruyucuları etkili mi?

24 saatlik idrar testlerinde örnek hastanın kendisi tarafından toplanıyor (standardizasyonu çok zor bir aşama)

İki preanalitik faz var:

1. Örneğin toplanması ve Laboratuvara ulaştırılması (Hasta)
2. İlk Lab' a ulaştıktan sonra özel metabolit ölçümleri için örneğin hazırlanması ve merkez lab'a transportu (Sağlık personeli!!!)

2014 de yapılan bir çalışmada >65yaş, kronik hastalığı olan bireylerde, doğru ve uygun 24 saatlik idrar toplama oranı <%50 bulunmuş!!!! (Miller et al.)

Çalışma Düzeni:

15 erkek teknisyen arkadaşımızdan spot idrar alındı. Hepsi ışıktan korundu. İlk örnekleme yapıldıktan sonra 4 parçaya bölündü

- 1. Grup: Örnek alındıktan sonra 30-60 dk içinde çalışıldı (pH:4-6)
- 2. Grup: Koruyucusuz 24 saat oda ısısında bekletildi (pH:6-8)
- 3. Grup: Koruyucusuz 24 saat 2-8 derecede bekletildi (pH:7)
- 4. Grup: 6 N HCL eklenerek 24 saat oda ısısında (pH: 2-3)
- 5. Grup: 6 N HCL eklenerek 24 saat 2-8 derecede bekletildi (pH:2)

Bir testten toplam 75 sonuç üretildi (LC-MS/MS ve AAS testleri olduğu için maliyetleri düşüktür☺)

Instand e.V. EQAS

Assessment March - 2016

Individual results

Ubier - Str. 20 / PF 250211
40223 / 40093 Düsseldorf
Tel (0211) 159213 - 0
FAX (0211) 159213 - 30

4423 Dr Ibrahim UNSAL Acibadem Labmed Clinic Laboratories

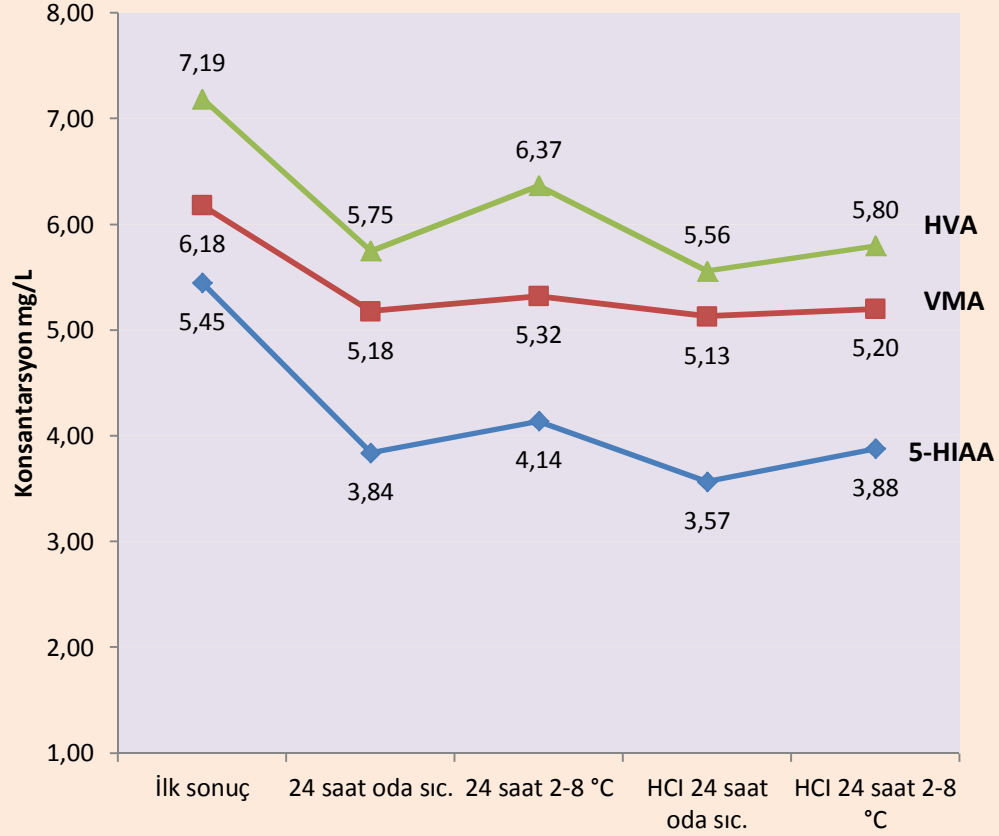
8.4.2016

Urine Chemistry 03 (175) (Prof. Dr. med. Friedrich Maly)		sample	your result	target	range	dev. (%)	
Epinephrine umol/L	171 RE	21	.077	.071	.039 - .103	12 +	
		22	.329	.295	.162 - .428	12 +	
to convert your results (s.21=14.10 and s.22=60.20) from ug/l -> umol/L used conversion factor : 0.00546							
Dopamine umol/L	171 RE	21	1.36	1.38	.759 - 2.00	-1 +	
		22	3.09	3.15	1.73 - 4.57	-2	
to convert your results (s.21=208.0 and s.22=474.0) from ug/l -> umol/L used conversion factor : 0.00653							
Homovanillic acid umol/L	171 ZX	21	24.97	26.0	14.3 - 37.7	-4 +	
		22	70.26	74.2	40.8 - 108	-5	
to convert your results (s.21=4.55 and s.22=12.80) from mg/l -> umol/L used conversion factor : 5.48900							
5-Hydroxyindolea acid umol/L	171 ZX	21	22.44	22.2	12.2 - 32.2	1 +	
		22	63.28	60.0	33.0 - 87.0	5	
to convert your results (s.21=4.29 and s.22=12.10) from mg/l -> umol/L used conversion factor : 5.23000							
Metanephrines umol/L	171 RE	21	.852	.771	.424 - 1.12	11 +	
		22	1.98	1.86	1.02 - 2.70	6	
to convert your results (s.21=168.0 and s.22=390.0) from ug/l -> umol/L used conversion factor : 0.00507							
Norepinephrine umol/L	171 RE	21	.379	.371	.204 - .538	2 +	
		22	1.23	1.23	.677 - 1.78	0	
to convert your results (s.21=64.20 and s.22=208.0) from ug/l -> umol/L used conversion factor : 0.00591							
Normetanephrine umol/L	171 RE	21	1.39	1.51	.831 - 2.19	-8 +	
		22	5.05	5.23	2.88 - 7.58	-3	
to convert your results (s.21=255.0 and s.22=926.0) from ug/l -> umol/L used conversion factor : 0.00546							
Vanillylmandelic acid umol/L	171 ZX	21	24.37	24.1	13.3 - 34.9	1 +	
		22	80.23	79.4	43.7 - 115	1	
to convert your results (s.21=4.83 and s.22=15.90) from mg/l -> umol/L used conversion factor : 5.04600							

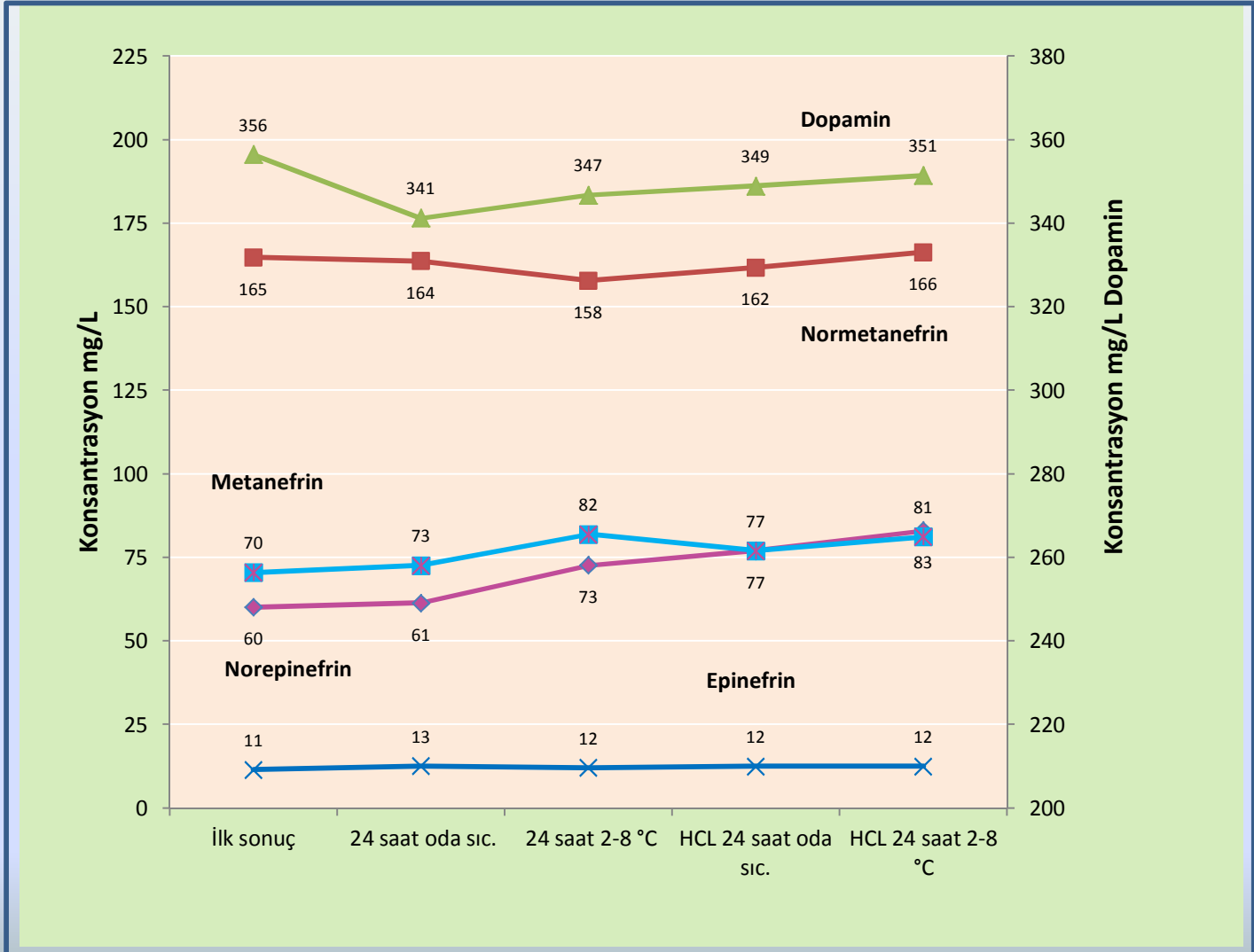
** BRAVO **

For additional available information see web-site: www.instand-ev.de EQAS

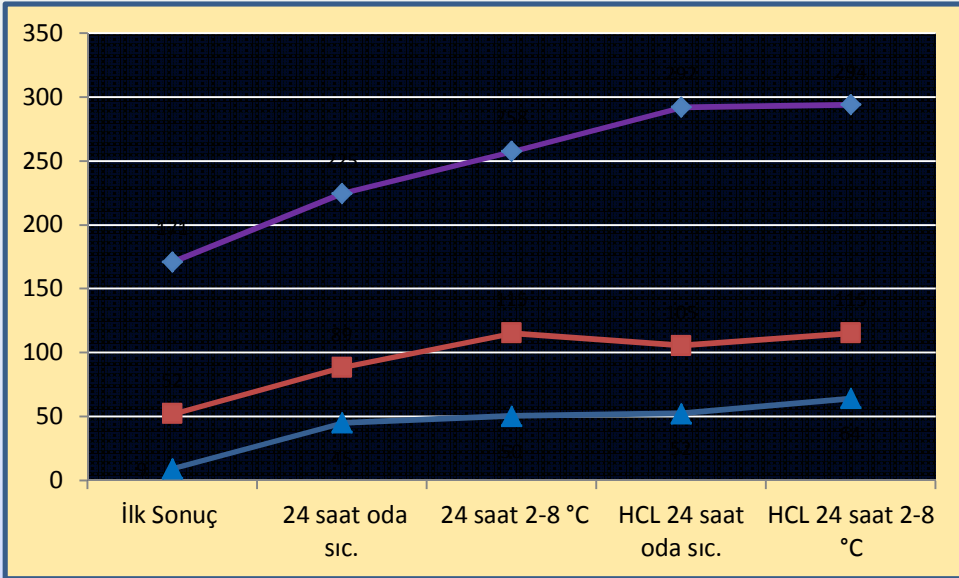
5-HIAA, VMA, HVA Değişimleri



İdrar Katekolamin Değişimleri



Norepinefrin



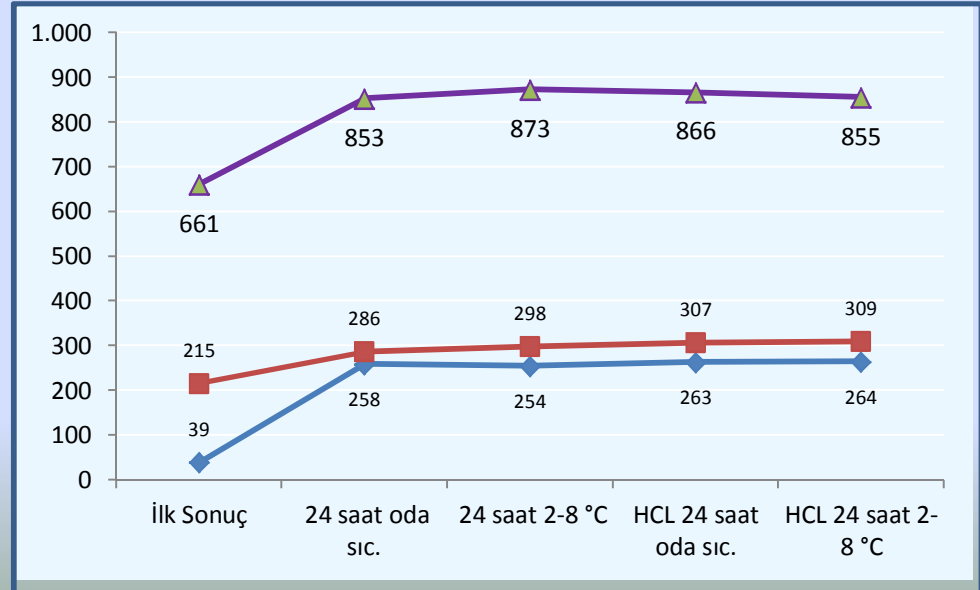
3 teknisyenin ilk sonuçları ile bekledikten sonraki sonuçları oldukça farklıydı

Taze örnek pH 7

Norepinefrin <80ug/gün
Dopamin < 400 ug/gün

Dopamin

İdrarda katekolaminler ve metabolitlerinin sulfatla konjuge olmuş formları da var, biz free formlarını ölçüyoruz (diagnostik anlamı olan kısım bu). Zamanla ve asit PH ya bağlı olarak konjuge olmuş moleküller unkonjuge olarak free forma dönüşüyor.



İdrar	Norepinephrine	Epinephrine	Dopamin	pH
2614718417	15,824	4,206	96,017	2
5217975571	34,165	9,26	257,08	4
5217973825	11,914	1,808	72,248	3
5217973701	0,717	0,871	83,902	3
5217973706	31,408	12,802	332,059	4
5217973707	5,23	1,73	88,552	3
5217973704	17,849	1,884	103,061	3
5217973703	1,584	0,646	24,349	5
5217970394	12,779	2,634	70,038	3
5217973702	4,943	1,41	47,982	4
5217973696	14,991	4,045	242,104	4
5217973229	17,936	5,18	70,012	1
5217972301	6,709	1,846	62,734	3
5217973351	13,509	3,348	87,315	3
5217970396	27,133	3,579	205,596	3
5217973698	8,873	2,77	47,196	5
5217973700	11,945	3,17	170,23	5
5217973697	17,824	2,835	140,382	3
5217973694	35,095	2,999	165,761	3
5217973699	8,428	2,367	139,277	3
5217973705	12,799	2,091	104,118	4
5217973347	14,315	4,655	306,991	4
5217972300	16,763	1,173	71,623	3
5217970479	5,439	2,283	103,131	3
5217969436	8,807	1,845	133,381	4
5217973379	11,838	4,992	406,824	5
5217973695	3,975	2,346	46,294	4
5217978232	7,916	2,081	59,297	4
5217978234	4,45	2,979	92,562	2
5217976769	20,262	2,954	100,867	6
5217978230	7,152	0,557	80,968	3
4515199333	12,527	3,909	74,085	2
5217971234	10,27	2,054	111,791	2
4515204226	8,591	4,953	56,414	4
5217978662	7,713	2,076	101,412	4
5217977103	7,47	0,373	250,095	3
5217977805	40,161	6,258	172,067	1
5217978665	22,643	45,111	117,301	4
5217978133	40,481	2,48	191,111	3
5217978484	24,616	2,692	255,704	1
5217977552	3,29	1,412	65,878	1
4515199343	38,714	5,613	184,335	4

Rutin çalışma sırasında idrar katekolaminleri çalışması öncesi için yapılan pH ölçümleri

Referans aralıkları:

Epinefrin <21ug/gün
Norepinefrin <80ug/gün
Dopamin < 400 ug/gün

Alkali pH da oto-oksidadasyondan dolayı molekülü kaybederken aşırı asit pH da dekonjugasyondan dolayı yüksek sonuçlar bulabiliyoruz

Preservation of urine free catecholamines and their free O-methylated metabolites with citric acid as an alternative to hydrochloric acid for LC-MS/MS-based analyses

[Mirko Peitzsch](#)¹ / Daniela Pelzel¹ / Peter Lattke¹ / Gabriele Siegert¹ / Graeme Eisenhofer^{1, 2}

¹Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Medical Faculty Carl Gustav Carus, University Hospital Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany- **Jan 2016**

“ Studies on the stability of metabolites in urine have yielded mixed results and variable recommendations on appropriate preservatives and methods of collection”

Preanalytical requirements of urinalysis

Joris Delanghe*¹, Marijn Speeckaert²

¹Department of Clinical Chemistry, Ghent University Hospital, Gent, Belgium

²Department of Nephrology, Ghent University Hospital, Gent, Belgium

*Corresponding author: joris.delanghe@ugent.be

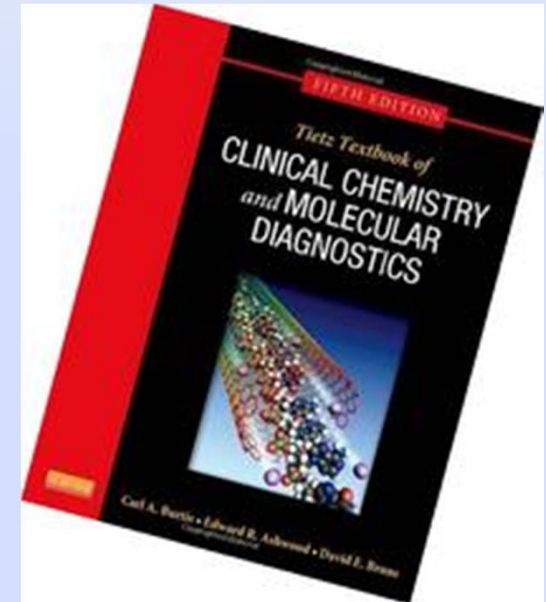
Abstract

Urine may be a waste product, but it contains an enormous amount of information. Well-standardized procedures for collection, transport, sample preparation and analysis should become the basis of an effective diagnostic strategy for urinalysis. As reproducibility of urinalysis has been greatly improved due to recent technological progress, preanalytical requirements of urinalysis have gained importance and have become stricter. Since the patients themselves often sample urine specimens, urinalysis is very susceptible to preanalytical issues. Various sampling methods and inappropriate specimen transport can cause important preanalytical errors. The use of preservatives may be helpful for particular analytes. Unfortunately, a universal preservative that allows a complete urinalysis does not (yet) exist. The preanalytical aspects are also of major importance for newer applications (e.g. metabolomics). The present review deals with the current preanalytical problems and requirements for the most common urinary analytes.

Key words: flow cytometry; preservatives; sample preparation; urinalysis

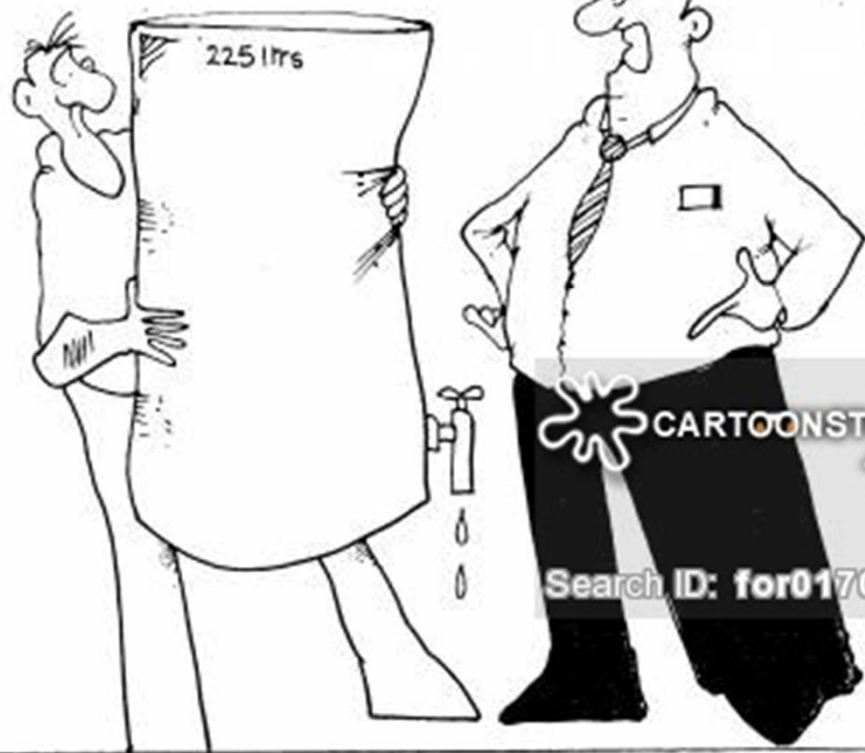
Received: September 30, 2013

Accepted: November 20, 2013



Spot idrar veya bir gecelik idrarlar ideal örnekler olarak gösterilmeye başlandı!!!-2016

URINE SAMPLE... I SAID SAMPLE!



Catecholamines Fractionated by LC- MS/MS, Urine Free



**National Reference
Laboratories**

Specimen Required

Patient Preparation

Drugs and medications may affect results and should be discontinued for at least 72 hours prior to specimen collection, if possible.

Collect

24-hour or random urine. Refrigerate 24-hour specimen during collection.

Specimen Preparation

Thoroughly mix entire collection (24-hour or Random) in one container. Transfer a 4 mL aliquot to an ARUP Standard Transport Tube. (Min: 2.5 mL) Catecholamines are not stable above pH 7. The pH of such specimens must be adjusted by the addition of 6M HCl acid or sulfamic acid prior to transport. A pH less than 2 can cause assay interference. Record total volume and collection time interval on transport tube and test request form. Specimen preservation can be extended to 1 month refrigerated by performing one of the following:

Option 1: Transfer a 4 mL aliquot (Min: 2.5 mL) to an ARUP Standard Transport Tube. Adjust pH to 2.0-4.0 with 6M HCl.

Option 2: Transfer a 4 mL aliquot (Min: 2.5 mL) to an ARUP Standard Transport Tube containing 20 mg sulfamic acid (ARUP Supply #48098), available online through eSupply using ARUP Connect™ or contact ARUP Client Services at (800) 522-2787. (Min: 2.5 mL).

Storage/Transport Temperature

Refrigerated. Also acceptable: Frozen.

Unacceptable Conditions

Room temperature specimens. Specimens preserved with boric acid or acetic acid. Specimens with pH greater than 7.

Remarks

Stability

Ambient: Unacceptable; Refrigerated: 1 week (unpreserved), 1 month (preserved); Frozen: 6 months (preserved)

Hasta

- 2 yaşında erkek hasta
- 1 ay önce çinko düzeyleri 0,95 ug/mL (Referans aralığı 0.70-1.30)
- Yeni ölçüm sonucu 1.92 ug/mL (tekrarı aynı yöndedir)
- Doktoru supplement vermediğini söylüyor???

Ağır metal ölçümleri

- Serum **Çinko** ölçümleri
- Haftada ~ 1200, ayda ~ 5000 sonuç üretiyoruz
- Yöntem: **Flame AAS ve ICP/MS**
- Referans aralığı 0.70-1.3 ug/mL=mg/L= ppm
- **Preanalitik kontaminasyona çok açık bir test!!!**
- Porsiyonlama çok dikkatle yapılmalı, tüpten tüpe aktarılmalı, **pipet ucu örneğe temas etmemeli!!!!**

Laboratuvarımızda bir çalışma yapıldı:

Aynı çinko örnekleri 4 e ayrıldı.

Otoanalizörde 1 test, 4 test ve 10 test çalışıldı:

Çinko Düzeyleri (ppm) Ref.Aralığı 0,70- 1.30	İşlem yapılmayan örnek	Otoanalizörde 1 test çalışıldıktan sonra	Otoanalizörde 4 test çalışıldıktan sonra	Otoanalizörde 10 test çalışıldıktan sonra
20 Denek Ortalaması	0,825	0,91	1,26	1,663**
% Fark		10	52	101

** Üst referans aralığını (URL) geçen sonuçlar

- Çinko/Ağır metal ölçümleri için ayrı örnek alınmalı

- Mümkünse örnek eser element tüpüne alınmalı!!

Bu her zaman mümkün olmuyor: jelsiz kuru tüp

- Örnekten pipet ile porsiyonlama yapılmamalı

- Başka cihazlarda çalışma yapılmış örneklerden çalışılmamalı

- Alüminyum, Bakır, çinko preanalitik kontaminasyona en açık ağır metaller

- Selenyum en az preanalitik kontamine olan ağır metal

Product Name: Infobase 2009 - Release Date: March 2009

September 1997

C38-A
Vol. 17 No. 13
Replaces C38-P
Vol. 14 No. 23

Control of Preanalytical Variation in Trace Element Determinations; Approved Guideline

This document provides guidelines for patient preparation, specimen collection, transport, and processing for the measurement of trace elements in a variety of biological matrices.





ACIBADEM
LABMED



ACIBADEM
ÜNİVERSİTESİ