

# CAT

## Critically Appraised Topic

### H-index voor de bepaling van vrij hemoglobine

Author: Martijn Lodewyckx

Supervisor: dr. Steven Pauwels, prof. dr. apr. Peter Declercq, apr. Sara Vijgen

Date: 28/07/2020

#### CLINICAL BOTTOM LINE

---

*Spectrofotometrische bepaling van de "serum-indices" laat toe om op de meeste automatische analyzers mogelijke interferentie door hemolyse, icterie en lipemie te detecteren. De H-index wordt bovendien in verschillende laboratoria gebruikt voor de bepaling van vrij hemoglobine. In de literatuur is er evidentie dat vooral in enkele specifieke klinische settings (ECMO, VAD) de bepaling van vrij hemoglobine een meerwaarde is om intravasculaire hemolyse te detecteren. In verschillende gepubliceerde studies en in enkele eigen experimenten werd bovendien aangetoond dat de H-index op verschillende analyzers accuraat en precies vrij hemoglobine kan bepalen. De aanwezigheid van vrij hemoglobine in plasma of serum wordt echter in de meerderheid van de gevallen veroorzaakt door in vitro hemolyse. Bij de interpretatie moet men hiermee steeds rekening houden en er is extra aandacht nodig voor een correcte bloedafname. Aangezien er geen commerciële kalibratoren en externe kwaliteitscontroles beschikbaar zijn voor de serum-indices is het bovendien belangrijk dat de kwaliteit van de bepaling van vrij hemoglobine intensief intern bewaakt wordt.*

#### CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

---

Serum-indices zijn berekeningen op basis van absorbantiemetingen die toelaten een (semi-)kwantitatieve of kwalitatieve inschatting te maken van icterie, lipemie en hemolyse in serum of plasma. Meestal gebeurt de bepaling door bij twee of meer golflengtes de absorbantie rechtstreeks te meten. Op automatische chemie-analyzers van Roche gebeurt de meting van de hemolyse-index met de SI2-applicatie bij 600/570 nm met correctie voor de absorbantie door lipemie (700/660 nm) (1) (figuur 1). Op Abbott Architect-toestellen gebeurt de absorbantiemeting bij 500/524 nm.

De serum-indices zijn initieel ontwikkeld om interferentie door hemolyse, icterie of lipemie in te schatten en vervangen een manuele beoordeling op basis van uitzicht. Hoewel in de bijsluiters van de serum-indices meestal wordt aangegeven dat deze niet gebruikt kunnen worden voor de kwantitatieve bepaling van triglyceriden, hemoglobine of bilirubine wordt in de praktijk de H-index toch gebruikt voor de bepaling van vrij hemoglobine (2). In het klinisch laboratorium van het Jessa-ziekenhuis in Hasselt werden de mogelijkheden en de klinische meerwaarde van deze analyse onderzocht na een concrete vraag van een perfusionist-intensivist naar een vrij hemoglobine bepaling bij ECMO-patiënten.

Naast de H-index bestaan er al langer verschillende methoden (al dan niet fotometrisch) om vrij hemoglobine in serum en plasma te bepalen. Hoewel het vaak over vrij eenvoudige analyses gaat, worden ze in de meeste laboratoriumpraktijken niet frequent gebruikt. Het doel van deze CAT is enerzijds een overzicht bieden van de klinische settings waarin de bepaling van vrij hemoglobine een meerwaarde zou kunnen zijn. Daarnaast wordt nagegaan (door middel van een literatuuronderzoek en enkele experimenten) of de automatische H-index op verschillende scheikunde-analyzers accuraat en voldoende precies vrij hemoglobine in serum of plasma kan meten. Ten slotte wordt nagegaan op welke manier de kwaliteit van de bepaling van de H-index kan bewaakt worden, analoog aan andere laboratoriumanalyses.

## QUESTION(S)

---

- 1) Vraag 1: In welke klinische settings kan de bepaling van vrij hemoglobine een meerwaarde bieden?
- 2) Vraag 2: Is de H-index een accurate en precieze methode om vrij hemoglobine te meten?
- 3) Vraag 3: Op welke manier kan de kwaliteit van de automatische H-index in het klinisch labo bewaakt worden?

## **1 Klinische meerwaarde**

Een laboratoriumtest is slechts zinvol in het diagnostisch proces wanneer het de uitkomst verbetert door informatie te geven die het beleid van de patiënt beïnvloedt. Hoewel het rationele gebruik van laboratoriumtesten primair de verantwoordelijkheid is van de clinicus, is het aanbieden van de test de verantwoordelijkheid van het laboratorium (3). Vrij hemoglobine (al dan niet bepaald met de H-index) is een test die reeds langer bestaat maar omwille van moeilijke diagnostiek en de aanwezigheid van alternatieve biomarkers voor hemolyse in de meeste laboratoria niet breed gebruikt wordt. Desondanks worden in de literatuur verschillende indicaties vermeld waarbij de bepaling van vrij hemoglobine nuttig zou kunnen zijn.

### **1.1 Screening intravasculaire hemolyse**

In een studie van Lippi et al. (2018) wordt voor vrij hemoglobine (specifiek H-index) een brede toepassing als screeningstest voor intravasculaire hemolyse voorgesteld. Aangezien bij intravasculaire hemolyse hemoglobine vrij komt zou vrij hemoglobine mogelijk een goede biomarker hiervoor kunnen zijn (4).

De oorzaken van in vivo hemolyse kunnen gecategoriseerd worden op verschillende manieren. Zo wordt er een onderscheid gemaakt tussen congenitale en verworven oorzaken. Congenitale hemolyse kan te wijten zijn aan pathologische hemoglobine-varianten (hemoglobinopathieën), enzymatische defecten (bv. G6PD-deficiëntie) en deficiënties van de erythrocytaire membraan (bv. congenitale sferocytose). Verworven hemolyse kan veroorzaakt worden door intrinsieke afwijkingen van de rode bloedcel (bv. paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie, PNH), mechanische erythrocytaire destructie (bv. microangiopathie of traumatische cardiale hemolyse), chemische factoren (medicatie) of infectieuze factoren (bv. malaria). Ten slotte kan verworven hemolyse ook veroorzaakt worden door immuungemedieerde afbraak van rode bloedcellen (auto-immuun of allo-immuun) (5).

Hoewel bij al deze oorzaken premature afbraak van rode bloedcellen plaatsvindt, gebeurt dit vaak ook (gedeeltelijk) extravasculair. Afhankelijk van het mechanisme, gebeurt hemolyse slechts intravasculair als er aanzienlijke schade aan de RBC-membraan optreedt. Hierbij gaat het vooral om complement-geïnduceerde lysis bij PNH, mechanische hemolyse, trombotische microangiopathieën en lysis door bacteriële toxines. Anderzijds kan er ook intravasculaire hemolyse optreden bij andere oorzaken van hemolytische anemie als de hemolyse excessief is en het reticulo-endotheliaal systeem, dat normaal instaat voor de afbraak van rode bloedcellen, gesatureerd is (6).

De diagnostische benadering van anemie omvat verschillende eerste- en tweedelijns laboratoriumtesten. Hemolyse wordt verdacht wanneer de anemie normocytair en regeneratief is en gepaard gaat met verhoogde waarden van ongeconjugeerd bilirubine en LDH, samen met laag haptoglobine. Vooral haptoglobine wordt in de praktijk vaak beschouwd als een test die “diagnostisch” is voor intravasculaire hemolyse. Echter ook in afwezigheid van intravasculaire hemolyse kan haptoglobine onderdrukt zijn (levercirrose, hoge oestrogeenlevels, in vitro hemolyse). Bij hypersplenisme, megaloblastische anemie of gebruik van medicatie (zoals corticosteroiden of androgenen) kan haptoglobine vals verhogen en hemolyse maskeren. Aangezien haptoglobine een acute fase-eiwit is, geldt dit ook voor de aanwezigheid van inflammatie. De sensitiviteit en specificiteit van haptoglobine, als indicator voor in vivo hemolyse, worden ingeschat op respectievelijk 91,8% en 98,4% (7).

Wanneer hemolyse zich voornamelijk intravasculair voordoet zal hemoglobine ook vrij voorkomen in het bloed nadat de klaring via haptoglobine gesatureerd is. Bij excessieve intravasculaire hemolyse zal vrij hemoglobine daarbij de renale drempel voor tubulaire reabsorptie overschrijden en kan hemoglobinurie optreden wat met een dipstick kan aangetoond worden (6). Vrij hemoglobine kan ook rechtstreeks gemeten worden in bloed. Verschillende methoden kunnen hiervoor worden gebruikt.

Anders dan voor haptoglobine is er weinig onderzoek naar de diagnostische waarde, sensitiviteit en specificiteit van vrij hemoglobine voor intravasculaire hemolyse. Aangezien de oorzaak van verhoogde waarden in de meerderheid van de gevallen in vitro hemolyse is, is de aanwezigheid van vrij hemoglobine echter weinig specifiek. Bovendien is het moeilijk om in het laboratorium een onderscheid te maken tussen in vitro en in vivo hemolyse. Hemolyse die niet aanwezig is in alle afgenomen stalen is suggestief voor in vitro hemolyse, maar dat principe is moeilijk praktisch toepasbaar in de laboratoriumpraktijk (8). Daarom moet voor de interpretatie van vrij hemoglobine in een screeningssetting nog steeds rekening gehouden worden met andere parameters (LDH, haptoglobine, indirect bilirubine, reticulocytose) om het onderscheid te kunnen maken. In de belangrijkste guidelines over de diagnostische work-up van hemolytische anemie wordt een vrij hemoglobinebepaling dan ook niet opgenomen.

## 1.2 Extracorporele membraanoxygenatie

Extracorporele membraanoxygenatie (ECMO) wordt steeds meer gebruikt ter ondersteuning van ernstig cardiaal of respiratoir falen. Risico's die hiermee gepaard gaan zijn onder meer trombusvorming en trombo-embolische events aangezien contact van bloed met het ECMO-systeem activatie van de coagulatie veroorzaakt. Intensieve anticoagulatie en monitoring van de stolling is daarom belangrijk bij deze procedures. Door de complexiteit van ECMO, inflammatie en orgaanfalen is het echter moeilijk de stollingsstatus bij deze patiënten te monitoren. De parameters die gebruikt worden voor de detectie van trombi zijn de deltaP-parameter en D-dimeren. De deltaP detecteert rechtstreeks verandering in de druk in het ECMO-systeem en is niet geschikt voor een vroege detectie van trombi. Ook de interpretatie van D-dimeren is moeilijk aangezien waarden vaak a priori gestegen zijn bij de kritisch-zieke patiënten die nood hebben aan ECMO.

In een recente Nederlandse studie van Bosma et al. (2019) wordt daarom vrij hemoglobine (specifiek H-index) voorgesteld als indicator voor de vorming van stolsels. Kleine trombi en shear stress kunnen in het ECMO systeem namelijk schade aan erythrocyten en bijgevolg hemolyse veroorzaken. Bovendien blijkt hemoglobine zelf bij ECMO ook een belangrijke rol te spelen in de pathogenese van het optreden van stolsels. Vrij hemoglobine activeert bloedplaatjes en bevordert de adhesie aan fibrinogeen door interactie met vWF (9). Daarnaast veroorzaakt het vrij voorkomen van hemoglobine ook oxidatieve stress en kan het aanleiding geven tot nier- en eventueel multi-orgaanschade en is het geassocieerd met de nood aan transfusie (10) (11).

In de studie van Bosma et al. is dan ook aangetoond dat een vrij hemoglobine van meer dan 20 mg/dL een onafhankelijke predictor is van mortaliteit. Bij patiënten met trombose t.h.v. de pump head van het ECMO-systeem werden in deze studie vrij hemoglobine-waarden van meer dan 100 mg/dL geobserveerd. In de studie van Omar et al. (2015) werd aangetoond dat een vrij hemoglobine van meer dan 50 mg/dL 24 uur na implantatie van het ECMO-systeem een onafhankelijke predictor van mortaliteit is. Hoewel er dus een consensus is over het nut van de vrij hemoglobine bepaling om hemolyse te detecteren, de oorzaak op te sporen of in te grijpen in het ECMO-systeem (switch oxygenator, vervangen pump head), is er geen consensus over de exacte treshold waarbij dit moet gebeuren.

## 1.3 Ventriculaire assist devices

Analoog aan ECMO is er bij patiënten met een implanteerbare ventricularly assist device (VAD) een belangrijk risico op mechanische hemolyse. De meest gebruikte biomarkers om vroegtijdig hemolyse te detecteren zijn LDH, haptoglobine en vrij hemoglobine. In een studie van Esposito et al. (2018) werd de waarde van LDH vs. vrij hemoglobine na implantatie van een Impella VAD vergeleken. Bij patiënten in cardiogene shock blijkt echter dat pre-implantatie LDH-levels ook vaak verhoogd zijn en dat zelfs bij significante hemolyse er vaak geen verdere verhoging van LDH-levels optreedt. Een stijging van 27 mg/dL in vrij hemoglobine 24 uur na implantatie bleek dan ook een betere indicator te zijn voor hemolyse dan LDH. In deze setting is vrij hemoglobine dus een sensitieve en specifieke biomarker voor mechanische hemolyse en laat het klinici toe om de performance level, flow rate en positie van het toestel aan te passen en klinisch significante hemolyse te voorkomen (12).

## 1.4 Infectieuze pathologie

Ook in andere pathologieën worden hoge vrij hemoglobine-concentraties als prognostisch gezien. In een experimentele setting is aangetoond dat vrij hemoglobine de inflammatoire respons bij sepsis beïnvloedt, waarschijnlijk onder meer omdat vrij hemoglobine de LPS-geïnduceerde vrijzetting van TNF-alfa doet toenemen en vrij hemoglobine gepaard gaat met oxidatieve stress. Analoog hieraan is aangetoond dat bij sepsis-patiënten hoge concentraties vrij hemoglobine geassocieerd zijn met een hogere mortaliteit. De H-index zou in deze setting dan ook nuttig kunnen zijn als biomarker om vroegtijdig patiënten op te sporen met slechte prognose en therapeutisch in te grijpen (13).

Ook bij malaria, waarbij intravasculaire hemolyse een intrinsieke eigenschap is van de pathofysiologie, blijkt dat vrij hemoglobine een biomarker is voor oxidatieve stress en bijdraagt aan de pathogenese van acuut nierfalen en geassocieerd is met de nood aan hemodialyse en overlijden. In een experimentele setting wordt onderzocht of er, in deze gevallen, een gunstig effect is van supportieve therapie met medicatie die vrij-hemoglobine gemedieerde oxidatieve stress reduceert (14).

## 1.5 Andere oorzaken van hemolytische anemie

De bepaling van vrij hemoglobine kan mogelijk ook bij andere oorzaken van in vivo hemolyse nuttig zijn bij het inschatten van de ernst van, of bij de opvolging van, hemolyse. Er is bovendien groeiende evidentie dat in de pathofysiologie van de verschillende hemolytische anemieën vrij hemoglobine een belangrijke factor is. Wanneer de mechanismen om hemoglobine te klaren uit de circulatie gesatureerd zijn gaat de aanwezigheid van vrij hemoglobine gepaard met de consumptie van stikstofmonoxide (NO). NO speelt een belangrijke rol in de vasculaire homeostase en is een kritieke regulator van basale en stress-gemedieerde relaxatie van gladde spiercellen, endotheliale adhesie en plaatjesactivatie en -aggregatie. Daarnaast ondergaat vrij hemoglobine in de circulatie auto-oxidatie waarna het aanleiding kan geven tot oxidatieve stress. Er werd aangetoond dat dit belangrijke factoren zijn in de pathogenese van paroxysmale nachtelijke hemoglobinurie, als prototype van intravasculaire hemolyse. Hierdoor zou de bepaling van vrij hemoglobine niet enkel nuttig kunnen zijn om de ernst van intravasculaire hemolyse op te volgen, maar ook om het risico op klinische sequellen in te schatten (15).

## 2 Analytische performantie H-index

### 2.1 Accuraatheid

#### 2.1.1 Literatuur

Verschillende methodes kunnen in theorie worden gebruikt voor de bepaling van vrij hemoglobine: chromogene assays, spectrofotometrische assays, immunonefelometrische assays en enzyme-linked immunosorbent assays (16). Traditioneel werd hemoglobine gemeten met een chromogene assay met benzidine omwille van de sensitieve detectie van kleine hoeveelheden hemoglobine. Door toxiciteit/carcinogeniteit van benzidine wordt deze test in de routine laboratoriumpraktijk niet meer toegepast maar is deze vervangen door verschillende assays die de absorptie bij meerdere golflengtes meten.

De meeste van deze spectrofotometrische assays meten de absorptie bij 2 tot 3 golflengtes, zoals de Harboe-methode (referentiemethode voor de directe spectrofotometrische bepaling van vrij hemoglobine). Deze tests zijn niet beschikbaar op de automatische analyzers van onder meer Abbott, Siemens en Roche.

De H-index van Roche en Abbott verschilt van de Harboe-methode doordat de absorptie slechts bichromatisch gemeten wordt (in tegenstelling tot 3 verschillende golflengtes bij Harboe). Daarnaast is de Harboe-methode ontwikkeld en gevalideerd voor de kwantitatieve bepaling van vrij hemoglobine terwijl de H-index ontwikkeld is om mogelijke interferentie door hemolyse te detecteren.

Verschillende studies hebben de bepaling van vrij hemoglobine met de H-index vergeleken met conventionele methoden (figuur 2). In een studie van Unger et al. (2007) werd aangetoond dat er een goede correlatie bestaat tussen de H-index gemeten met Roche Modular System P en de spectrofotometrische methode van Golf ( $r=0,990$ ) en werd geconcludeerd dat de H-index op Roche Modular P in de meeste klinische settings volstaat voor de bepaling van vrij hemoglobine (17). Door Lippi et al. (2009) werd in een multicenter-studie de H-index op verschillende toestellen vergeleken met de cyaanmethemoglobine-methode door middel van een verdunningsreeks van gehemolyseerd volbloed. Op de verschillende analyzers (Roche Modular System P en Integra 400 Plus; Siemens Dimension RxL, ADVIA 2400 en ADVIA 1800; Olympus AU 680 en Coulter DXC 800) was er een goede correlatie met de referentiemethode, weliswaar met een lichte overschatting van vrij hemoglobine-waarden bij Siemens ADVIA 1800 en 2400. De correlatiecoëfficiënt tussen de H-index op Roche Modular P en de cyaanmethemoglobine-methode was in 3 verschillende centra 1,00 met een excellente correlatie bij Passing en Bablok regressie-analyse (18). In een gelijkaardige studie van Fernandez et al. (2014) werd eveneens een goede correlatie gevonden tussen de H-index en de cyaanmethemoglobine-methode op verschillende toestellen (Roche Cobas c511, c711, Modular System P; Beckman Coulter 5400, Synchron LXi725; Siemens Advia 2400 en Vista). Hierbij werd er enkel een kwalitatieve correlatie uitgevoerd en bekwam men steeds een Cohen kappa-coëfficiënt groter dan 0,8 (19). Ten slotte werd ook in een studie van Gabaj et al. (2018) de H-index bepaling vergeleken met de SLS-hemoglobine methode op Cobas 6000 c501 en Abbott Architect c8000. Op de c501 module van Roche weken de H-index waarden niet significant af van de vrij hemoglobine-waarden gemeten met de SLS-methode. Op Abbott Architect was er een kleine significante proportionele en constante bias (hogere waarden met H-index, echter nooit meer dan 10% tenzij bij lage waarden) (20).

#### 2.1.2 Experimenteel

5 stalen volbloed werden gehemolyseerd door na centrifugatie de rode bloedcellen op te lossen in een gelijke hoeveelheid water en nadien gedurende 24 uur in te vriezen bij  $-25^{\circ}\text{C}$ . Na ontdooien en centrifugeren werd op het supernatant totaal hemoglobine bepaald met Sysmex XN-20. Bij deze cyanide-vrije (gemodificeerde) hemoglobinemethode wordt gebruik gemaakt van natriumlaurylsulfaat (SLS) dat de rode en witte bloedcellen hemolyseert door absorptie aan de RBC-membraan. SLS oxideert vervolgens de heemgroep van hemoglobine waarbij  $\text{Fe}^{2+}$  wordt omgezet tot  $\text{Fe}^{3+}$ . De hydrofiele groep van SLS bindt dan aan  $\text{Fe}^{3+}$  waardoor een stabiel complex gevormd wordt (SLS-Hb) dat fotometrisch bepaald kan worden bij een golflengte van 540 nm. Op basis van deze 5

hemolysaten werden telkens 10 verdunningen gemaakt waarvan de theoretische vrije hemoglobineconcentratie gekend was. Op deze verdunningen werd de H-index gemeten met de SI2-applicatie van Roche op Cobas 8000 c702 (in totaal 50 analyses).

De theoretische waarde van vrij hemoglobine werd vergeleken met de vrij hemoglobine-waarde bekomen met de H-index (figuur 3-4). In onze steekproef was er een goede correlatie ( $r=0,998$ , Fischer 95% CI: 0,997-0,999) tussen de twee datasets. Bij regressie-analyse volgens Passing Bablok bekwamen we een rechte waarvan de richtingscoëfficiënt licht (maar statistisch significant) afwijkt van 1 ( $y = -1,209 (-2,24-0,66) + 0,9705 (0,93-0,99) x$ ). In onze steekproef is er dus geen significante constante bias maar wel een kleine proportionele bias tussen beide methodes. Mediaan liggen de waarden vrij hemoglobine gemeten met de H-index 3,37% lager dan de theoretische waarde op basis van de SLS-hemoglobine bepaling. Er zijn geen criteria beschikbaar om te bepalen of dit verschil klinisch significant is. Bij interpretatie van de resultaten moet er rekening mee gehouden worden dat de hemoglobinemeting op Sysmex XN-20 niet gevalideerd is voor de bepaling van vrij hemoglobine op gehemolyseerd volbloed.

## 2.2 Precisie

### 2.2.1 Literatuur

De SI2-applicatie van Roche laat toe om op de toestellen de serum-indices te kwantificeren terwijl in klinische laboratoria vaak wordt gewerkt met semi-kwantitatieve of kwalitatieve waarden om de mate van lipemie, icterie en hemolyse in te schatten. In de Roche bijsluiters wordt de intra-run repeteerbaarheid CV van de 3 serum-indices aangegeven, berekend in een experiment met humaan serum. Hierbij heeft men voor de c701 module een CV bekomen die, voor H-indices tussen 127 en 1116 mg/dL, varieert van 0,7% tot 0,9%. Bij een gemiddelde H-index van 5 mg/dL is de bepaling minder precies en bekwamen men een CV van 27% (2). In de studie van Lippi et al. (2009) werd eveneens een gemiddelde intra-run CV berekend (voor vrij hemoglobine-waarden tussen 9 en 217 mg/dL) die voor de verschillende toestellen tussen 0,1% (ADVIA 1800) en 2,7% (Integra 400 Plus) lag (18). In een studie van Gabaj et al. waarin de precisie en accuraatheid van de H-index op Abbott Architect c8000 en Roche Cobas 6000 c501 onderzocht werd, bekwamen men intra-run CV's tussen 0,7% en 1,7% en within-lab CV's tussen 0,7% en 2,1%. Hierbij was er geen significant verschil in precisie tussen Roche Cobas 6000 en Abbott Architect (20). In een studie over interne kwaliteitsbewaking van de HIL-indices op Roche Cobas c702 van Lippi et al. (2018) bekwamen men voor de H-index een intra-run en within-lab CV variërend tussen respectievelijk 1,1-2,0% en 1,6-3,3% bij een gemiddeld vrij hemoglobine level van 100 mg/dL (21). In een studie van Reineks et al. (2015) werd eveneens een intra-run CV berekend op Roche Cobas c702. Bij een gemiddelde H-index van 19 en 295 mg/dL bedroeg deze respectievelijk 5% en 1,1% (22) (figuur 5).

### 2.2.2 Experimenteel

In een eigen experiment werd de precisie van de H-index nagegaan aan de hand van het CLSI EP15-A3 protocol. 3 verschillende controlematerialen werden hierbij gebruikt (level 1 en 2: serumpools, level 3: commercieel Biorad-controlemateriaal). Van elk staal werden in totaal 35 aliquots geanalyseerd in 7 runs (7 dagen, 1 run per dag, 5 aliquots per run). Met de Grubb's test werd er nagegaan of er outliers waren. Deze waren er niet en alle data werden meegenomen in de berekening van de CV's. Via unifactoriële variantieanalyse (ANOVA) werd de intra-run en within-lab SD en CV berekend.

Voor level 1 (gemiddelde = 4 mg/dL) werd een intra-run CV van 14,6% en within-lab CV van 14,3% bekomen. De intra-run CV van level 2 (gemiddelde = 25 mg/dL) bedroeg 3,7%, de within-lab CV 4,8%. Voor het derde level (controlemateriaal met gemiddelde = 135 mg/dL) werd een intra-run en within-lab CV van respectievelijk 2,3% en 3,3% bekomen. Voor de lage waarden lijkt de CV dus eerder hoog te zijn maar aangezien voor significante hemolyse (afhankelijk van de klinische setting) cut-offs van 20-50 mg/dL worden voorgesteld is dit klinisch waarschijnlijk niet relevant (figuur 6).

## 2.3 Correlatie verschillende analyzers

### 2.3.1 Literatuur

In de bijsluiters van Roche wordt een methodevergelijking van de H-index tussen verschillende Roche-toestellen geïnccludeerd (c701-c702-c501-c502-c503). Tussen de Roche toestellen lijkt er een zeer goede correlatie te bestaan (Pearson correlatiecoëfficiënt steeds groter dan 0,995 bij de geraadpleegde bijsluiters, geen significante bias). In een studie van Gabaj et al. (2018) werd de H-index bepaling vergeleken tussen drie toestellen van verschillende firma's: Abbott Architect c8000, Roche Cobas 6000 c501 en Beckman Coulter AU5800. Enkel Cobas en Architect laten een kwantitatieve bepaling van de H-index toe. Hier vond men een lichte constante en proportionele bias tussen beide toestellen (Cobas = 0,02 (0,01-0,02) + 0,87 (0,86-0,87) Architect) (20). In de studie van Fernandez werden verschillende toestellen van Roche, Beckman en Siemens vergeleken. In deze kwalitatieve vergelijking was er voor alle toestellen een goede correlatie (19) (figuur 7).

### 2.3.2 Experimenteel

In een eigen correlatiestudie werd, voor 15 verschillende stalen met waarden die het hele meetbereik omvatten, de H-index op Abbott Architect c8000, Roche Cobas c501, c503 en c702 bepaald. Vooral tussen de verschillende c-modules van Roche bleek er een uitstekende correlatie te bestaan (Pearson correlatiecoëfficiënt steeds groter dan 0,995, geen significante proportionele of constante bias). Lineaire regressie met Passing Bablok analyse toont een significant verschil tussen Abbott Architect c8000 en de Roche-toestellen, waarbij op Architect hogere waarden gemeten werden (Cobas =  $-1,32 (-3,533 - 0,086) + 0,9103 (0,895 - 0,923)$  Architect) en waarbij de proportionele bias dus statistisch significant was (cfr. publicatie Gabaj). Er zijn geen criteria beschikbaar die toelaten te bepalen of deze bias klinisch relevant zou zijn (figuur 8).

### 3 Invloed van pre-analytiiek

De geautomatiseerde kwantitatieve H-index is waarschijnlijk een betrouwbare methode die met voldoende precisie de vrij hemoglobine-waarde kan bepalen. Problematisch bij deze parameter is echter de grote invloed van pre-analytische factoren en het moeilijke onderscheid tussen in vitro en in vivo hemolyse. Verschillende factoren kunnen vals verhoogde waarden van vrij hemoglobine veroorzaken. Tijdens bloedafname is de mate waarin hemolyse optreedt onder meer afhankelijk van het type naald, extractiesysteem (vacuüm-tubes), type vasculair access (katheter of venapunctie), armpositie, voorzichtigheid bij opmengen van het staal, de ervaring van de flebotomist en de vasculaire toestand van de patiënt. Bij transport van de stalen is bewezen dat onder meer de positie van de tube, type transport (pneumatische tube, buizenpost) en de duur en temperatuur bij transport bepalend zijn voor het al of niet optreden van in vitro hemolyse. Ook bij de voorbereiding van het staal zijn de centrifugatievoorwaarden, tijd tot centrifugatie en manipulaties van het staal belangrijk (8).

In een studie van Plebani et al. (2000) werd de incidentie van in vitro hemolyse bestudeerd. Op 15 323 geanalyseerde stalen waren 505 (3,3%) gehemolyseerd (23). Voor elk geïdentificeerd staal werd onderzocht wat de mogelijke oorzaak van hemolyse zou kunnen zijn. In 93,1% van de gevallen was de causale factor te vinden in de pre-analytiiek. Hierbij ging het meestal om een fout bij de bloedafname. Slechts in 1,8% van de gehemolyseerde stalen was in vivo hemolyse de oorzaak van de aanwezigheid van vrij hemoglobine. Belangrijk is dan ook om bij de interpretatie van de analyse rekening te houden met de mogelijkheid van in vitro hemolyse en zorgvuldig te werk te gaan tijdens de bloedafname voor bepaling vrij hemoglobine.

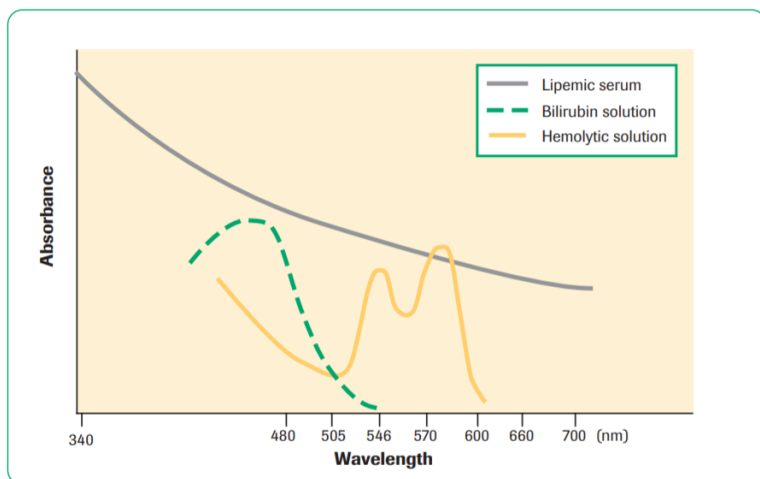
### 4 kwaliteitsbewaking

Zoals elke andere laboratoriumtest, zouden HIL-indices onderworpen moeten worden aan vereisten door regelgevende instanties of accreditatiestandaarden. Ook indien HIL-indices enkel gebruikt worden om mogelijke interferenties te detecteren is kwaliteitsbewaking nodig. Aangezien de HIL-indices op automatische scheikunde-analyzers worden bepaald met spectrofotometrie zijn ze ook gevoelig aan fouten en drifts zoals elke andere spectrofotometrische assay. Bovendien zijn er voor de HIL-indices geen kalibratoren beschikbaar voor gebruik in de routine laboratoriumpraktijk. Zo wordt voor de SI2-applicatie van Roche enkel een blanco kalibratie uitgevoerd bij een lotwissel van reagentia om te verzekeren dat er een nulsignaal wordt bekomen in afwezigheid van vrij hemoglobine.

De Clinical and Laboratory Standards Institute voorziet in zijn richtlijnen ook dat voor HIL-indices de kwaliteitsbewaking moet gemonitord worden met als doel het accepteren of verwerpen van plasma- of serumstalen of waarschuwen voor interferentie. Dit kan gebeuren door gebruik van commerciële controlematerialen of eigen bereid controlemateriaal (21). Voor externe kwaliteitscontroles is er geen commercieel aanbod. Ook in het Sciensano eQC-programma zijn de HIL-indices niet opgenomen. Aangezien Biorad controlemateriaal aanbiedt, is het wel mogelijk om de eigen resultaten van iQC te vergelijken met de resultaten in andere klinische labo's.

### 5 Conclusie

De spectrofotometrische kwantitatieve bepaling van de H-index die tegenwoordig op veel automatische scheikunde analyzers is geïnstalleerd, is op basis van literatuur en eigen experimenten een goede methode om accuraat en precies vrij hemoglobine te meten. In verschillende klinische settings kan de bepaling bovendien een meerwaarde bieden voor de clinicus. Ook bij extracorporele membraanoxygenatie (vraag van intensivist-perfusionist) is de H-index een goede parameter om hemolyse op te volgen. Aangezien de aanwezigheid van vrij hemoglobine in een screeningssetting meestal veroorzaakt wordt door in vitro hemolyse is de waarde van de bepaling hier slechts beperkt. Bovendien is het nodig dat de methode vóór implementatie grondig gevalideerd wordt en dat analoog aan andere laboratoriumanalyses de kwaliteit van de bepaling wordt bewaakt.

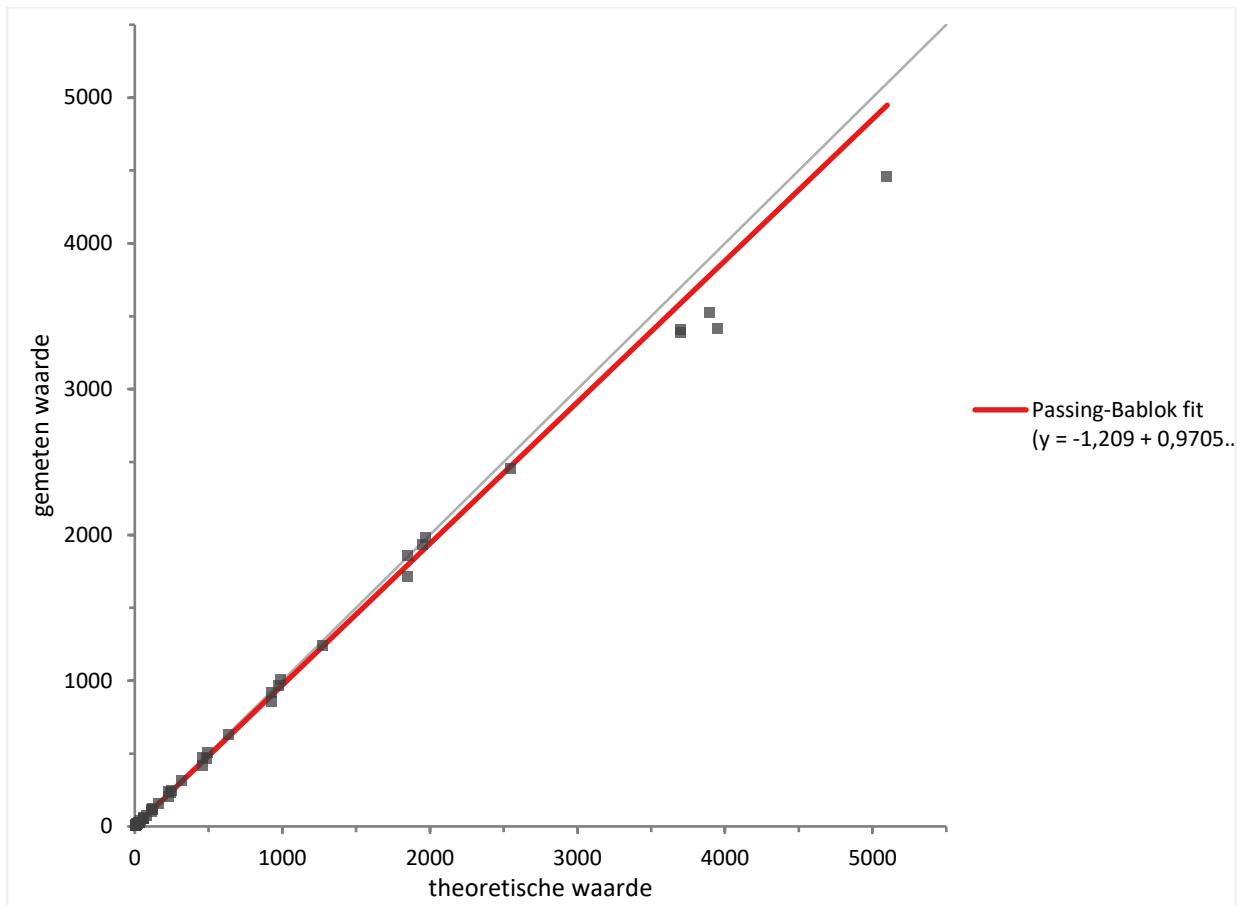


Figuur 1: Absorptiespectra icterie, lipemie en hemolyse (1).

Auteurs	Stalen	H-index methode	Vergelijkende assay	Conclusie
<b>Unger et al. (2007)</b>	200 patiëntstalen	Roche Modular System P	Golf (bichromatische spectrofotometrische assay)	r=0,99 goede correlatie
<b>Lippi et al. (2009)</b>	5 serumstalen, aangerijkt met gehemolyseerd bloed	Roche Modular System P en Integra 400 Plus; Siemens Dimension RxL, ADVIA 2400 en ADVIA 1800; Olympus AU 680 en Coulter DXC 800	Cyaanmethemoglobine-methode	Modular System P: r=1,00; geen significante bias  ADVIA 2400 en 1800: lichte overschatting  Andere toestellen: goede correlatie
<b>Fernandez et al. (2014)</b>	6 verdunningen van hemolysaat	Roche Cobas c511, c711, Modular System P; Beckman Coulter Synchron LXi725; Siemens Advia 2400 en Vista		Cyaanmethemoglobine-methode
<b>Gabaj et al. (2018)</b>	7 verdunningen van hemolysaat	Cobas 6000 c501 en Abbott Architect c8000	SLS-methode	Cobas c501: $y = 0,03 (-0,15 - 0,08) + 1,01 (0,98 - 1,03) x$ Architect c8000: $y = 0,02 (0,01-0,07) + 1,07 (1,06-1,08) x$

Figuur 2: accuraatheid H-index (literatuurstudie).





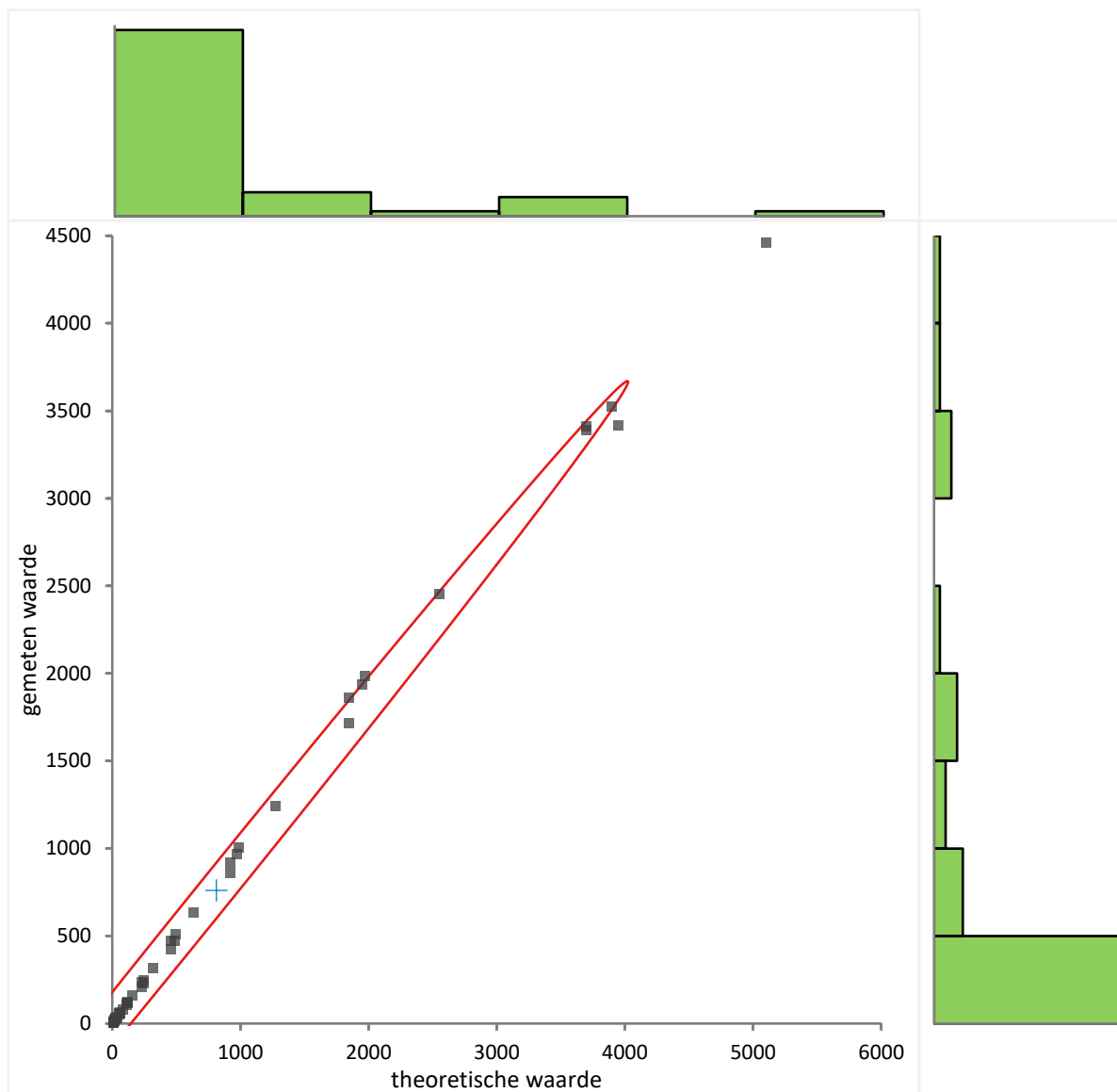
Passing-Bablok fit

Equation | gemeten waarde = -1,209 + 0,9705 theoretische waarde

Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI
Intercept	-1,209	-2,244 to 0,6590
Slope	0,9705	0,9267 to 0,9948

CI based on 999 bootstrap samples.

Figuur 3: correlatie vrij hemoglobine (SLS-methode, Sysmex) – H-index (Roche Cobas c702) (mg/dL).



Pearson's r	0,998
Fisher 95% CI	0,997 to 0,999

Figuur 4: correlatie vrij hemoglobine (SLS-methode, Sysmex) – H-index (Roche Cobas c702) (mg/dL).

Studie	Analyzer	Intra-run CV ( $\mu$ : mg/dL)	Within-lab CV ( $\mu$ : mg/dL)
<b>Bijsluiter Roche</b>	Roche Cobas c701/c702	( $\mu = 5$ ): <b>27%</b> ( $\mu = 127-1116$ ): <b>0,7-0,9%</b>	/
<b>Gabaj et al. (2018)</b>	Roche Cobas c501	( $\mu = 30-50$ ): <b>1,6%</b> ( $\mu = 100-200$ ): <b>0,8%</b>	( $\mu = 30-50$ ): <b>1,8%</b> ( $\mu = 100-200$ ): <b>0,9%</b>
<b>Gabaj et al. (2018)</b>	Abbott Architect c8000	( $\mu = 30-50$ ): <b>1,7%</b> ( $\mu = 100-200$ ): <b>0,7%</b>	( $\mu = 30-50$ ): <b>2,1%</b> ( $\mu = 100-200$ ): <b>0,7%</b>
<b>Lippi et al. (2018)</b>	Roche Cobas c702	( $\mu = 101,3$ ): <b>1,1%</b>	( $\mu = 87$ ): <b>4,9%</b>
<b>Reineks et al. (2015)</b>	Roche Cobas c702	( $\mu = 19$ ): <b>5%</b> ( $\mu = 295$ ): <b>1,1%</b>	/
<b>Lippi et al. (2009)</b>	Roche Modular System P	( $\mu = 9-217$ ): mean CV= <b>1,2%</b>	/
<b>Lippi et al. (2009)</b>	Roche Integra 400 PLUS	( $\mu = 9-217$ ): mean CV= <b>2,7%</b>	/
<b>Lippi et al. (2009)</b>	Siemens ADVIA 2400	( $\mu = 9-217$ ): mean CV= <b>0,1%</b>	/
<b>Lippi et al. (2009)</b>	Siemens ADVIA 1800	( $\mu = 9-217$ ): mean CV= <b>1,0%</b>	/

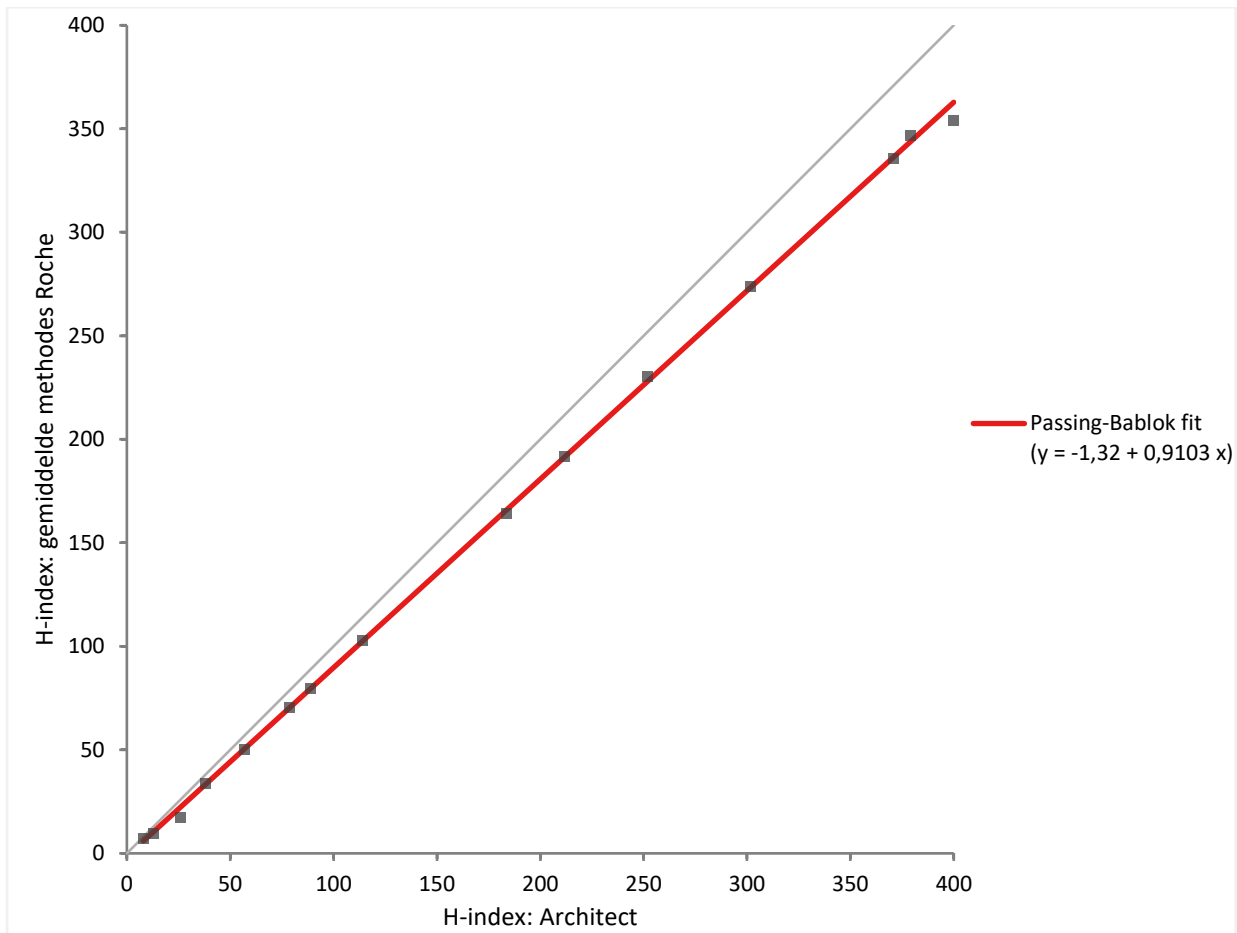
Figuur 5: precisie H-index (literatuurstudie).

Precisie	Level 1 (mean = 6 mg/dL)	Level 2 (mean = 25 mg/dL)	Level 3 (mean = 135 mg/dL)
<b>Repeteerbaarheid CV (%)</b>	14,6	3,7	2,3
<b>Reproduceerbaarheid CV (%)</b>	14,3	4,8	3,3

Figuur 6: precisie H-index (experimenteel).

Studie	Analyzers	Overeenkomst
<b>Bijsluiters Roche</b>	C501, c503, c702	Goede correlatie: $r > 0,995$ , geen significante bias
<b>Gabaj et al. (2018)</b>	Abbott Architect c8000, Roche Cobas c501	(Cobas = 0,02 (0,01-0,02) + 0,87 (0,86-0,87) Architect)
<b>Fernandez et al. (2014)</b>	Roche Cobas c511, c711, Modular System P; Beckman Coulter 5400, Synchron LXi725; Siemens Advia 2400 en Vista	Goede correlatie (kwalitatieve vergelijking)

Figuur 7: correlatie H-index verschillende analyzers (literatuur).



Passing-Bablok fit

Equation | H-index: gemiddelde methodes Roche = -1,32 + 0,9103 H-index: Architect

Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI
Intercept	-1,320	-3,533 to 0,08617
Slope	0,9103	0,8954 to 0,9231

CI based on 999 bootstrap samples.

Figuur 8: correlatie H-index Roche – Abbott Architect c8000 (mg/dL).

## To Do/ACTIONS

---

- 1) Implementatie van kwaliteitsbewaking.

## REFERENTIES

---

- 1) Roche (2007). Serum Indices: Reduction of clinical errors in laboratory medicine Going straight for the answer. Retrieved from: [https://mydialog.roche.com/Htdocs/media/pdf/actualites/2b\\_SI\\_Brochure\\_2007.pdf](https://mydialog.roche.com/Htdocs/media/pdf/actualites/2b_SI_Brochure_2007.pdf)
- 2) Roche (2020). SI2 Serum Index Gen.2 Order information c701/c702. Retrieved from: [https://pim-eservices.roche.com/eLD/web/be/en/documents?searchTerm=si2&noDefaults=true&ffLanguages=en&ffDocumentTypes=endt\\_method\\_sheet&searchType=Metadata&sourceSearchType=Metadata](https://pim-eservices.roche.com/eLD/web/be/en/documents?searchTerm=si2&noDefaults=true&ffLanguages=en&ffDocumentTypes=endt_method_sheet&searchType=Metadata&sourceSearchType=Metadata)
- 3) Bossuyt, X, Wegwijs in Laboratoriumdiagnose (2016). Leuven, België: Acco.
- 4) Lippi, Giuseppe; Favaloro, Emmanuel J; Franchini, Massimo (2018). Haemolysis index for the screening of intravascular haemolysis: a novel diagnostic opportunity? *Blood Transfusion*, Vol.16 (5), p.433-437
- 5) Bogaerts, M; Verhoef, G. *Klinische hematologie* (2015); Tielt, België: Lannoo.
- 6) Brodzsky, R. A., Diagnosis of hemolytic anemia in adults. Retrieved from: [https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-hemolytic-anemia-inadults?search=hemolytic%20anemia&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-hemolytic-anemia-inadults?search=hemolytic%20anemia&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
- 7) Shih, Andrew W.Y; McFarlane, Andrew; Verhovsek, Madeleine (2014). Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *American journal of hematology*, Vol.89 (4), p.443-447
- 8) Wan Azman, Wan Norlina; Omar, Julia; Koon, Tan Say; Tuan Ismail, Tuan Salwani (2019). Hemolyzed Specimens: Major Challenge for Identifying and Rejecting Specimens in Clinical Laboratories. *Oman medical journal*, Vol.34 (2), p.94-98
- 9) Bosma, Madeleen; Waanders, Frans; Van Schaik, H.P; Van Loon, Douwe; Rigter, Sander; Scholten, Erik; Hackeng, Chris M (2019). Automated and cost-efficient early detection of hemolysis in patients with extracorporeal life support: Use of the hemolysis-index of routine clinical chemistry platforms *Journal of Critical Care*, Vol.51, p.29-33
- 10) Omar, Hesham R; Mirsaiedi, Mehdi; Socias, Stephanie; Sprenger, Collin; Caldeira, Christiano; Camporesi, Enrico M; Mangar, Devanand (2015). Plasma Free Hemoglobin Is an Independent Predictor of Mortality among Patients on Extracorporeal Membrane Oxygenation Support. *United States: Public Library of Science (PLoS) PloS one*, Vol.10 (4), p.e0124034
- 11) Lyu, Lin; Long, Cun; Hei, Feilong; Ji, Bingyang; Liu, Jinping; Yu, Kun; Chen, Liang; Yao, Jingxin; Hu, Qiang; Hu, Jinxiao; Gao, Guodong (2016). Plasma Free Hemoglobin Is a Predictor of Acute Renal Failure During Adult Venous-Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation Support. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, Vol.30 (4), p.891-895
- 12) Esposito, Michele L; Morine, Kevin J; Annamalai, Shiva K; O'Kelly, Ryan; Aghili, Nima; Pedicini, Robert; Breton, Catalina; Mullin, Andrew; Hamadeh, Anas; Kiernan, Michael S; DeNofrio, David; Kapur, Navin K (2018). Increased Plasma-Free Hemoglobin Levels Identify Hemolysis in Patients With Cardiogenic Shock and a Trans valvular Micro-Axial Flow Pump. *Artificial organs*, Vol.43 (2), p.125-131
- 13) Adamzik, Michael; Hamburger, Tim; Petrat, Frank; Peters, Jürgen; de Groot, Herbert; Hartmann, Matthias (2012). Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome. *Critical care*, Vol.16 (4), p.R125-R125
- 14) Tsin W. Yeo; Daniel A. Lampah; Emiliana Tjitra; Retno Gitawati; Enny Kenangalem; Kim Piera; Donald L. Granger; Bert K. Lopansri; J. Brice Weinberg; Ric N. Price; Stephen B. Duffull; David S. Celermajer; Nicholas M. Anstey (2009). *The Journal of Infectious Diseases*. Vol.200 (10), p.1522-1529
- 15) Rother, Russell P; Bell, Leonard; Hillmen, Peter; Gladwin, Mark T (2005). The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin: A Novel Mechanism of Human Disease. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, Vol.293 (13), p.1653-1662
- 16) Chung, Hee-Jung; Chung, Jae-Woo; Yi, Joowon; Hur, Mina; Lee, Tae Hwan; Hwang, Sang-Hyun; Song, Yoon Kyung; Lee, Do Hoon (2020). Automation of Harboe method for the measurement of plasma free hemoglobin. *Journal of clinical laboratory analysis*, Vol.34 (6), p.e23242-n/a
- 17) Unger, Janne; Filippi, Gerlinde; Patsch, Wolfgang (2007). Measurements of free hemoglobin and hemolysis index: EDTA- or lithium-heparinate plasma? *Clinical chemistry*, Vol.53 (9), p.1717-1718
- 18) Lippi, G.; Salvagno, L. G.; Blanckaert, N.; Giavarina, D.; Green, S.; Kitchen, S.; Palicka, V.; Vassault, A. J.; Plebani, M. (2009). Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. *Clin. Chem. Lab. Med.*, Vol.47 (8), p.934-939
- 19) Pilar Fernandez, María Antonia Llopis, Carmen Perich, María Jesús Alsina, Virtudes Alvarez, Carmen Biosca, Gloria Busquets, María Vicenta Domenech, Rubén Gómez, Isabel Llovet, Joana Minchinela, Rosa Pastor, Rosa Ruiz, Ester Tarrés, Mercè Ibarz, Margarita Simón, Mercè Montesinos (2014). Harmonization in Hemolysis Detection and Prevention. A Working Group of the Catalan Health Institute (ICS) Experience. *Clin. Chem. Lab. Med.*, Vol.52 (11), p.1557-68

- 20)** Nikolac Gabaj N, Miler M, Vrtarić A, Hemar M, Filipi P, Kocijančić M, Šupak Smolčić V, Čelap I, Šimundić AM. (2018). Precision, accuracy, cross reactivity and comparability of serum indices measurement on Abbott Architect c8000, Beckman Coulter AU5800 and Roche Cobas 6000 c501 clinical chemistry analyzers. *Clin. Chem. Lab. Med.* Vol.56 (5), p.776-788
- 21)** Lippi, Giuseppe; Cadamuro, Janne; Danese, Elisa; Gelati, Matteo; Montagnana, Martina; von Meyer, Alexander; Salvagno, Gian Luca; Simundic, Ana-Maria (2018). Internal quality assurance of HIL indices on Roche Cobas c702. United States: Public Library of Science (PLoS) PLoS one, Vol.13 (7), p.e0200088
- 22)** Reineks, E., Phelan, M., Thompson, P. (2015). Performance Characteristics of Hemolysis Index on Roche Cobas 8000 Automated Analyzers Including Correlation of Hemolysis Index With Free Hemoglobin. *An. J. Clin. Pathol.* Vol. 144
- 23)** M. Plebani, P. Carraro, G. Servidio (2000). Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clinical Chemistry.* Vol. 46(2) p.306-7