

Interference dobutaminu při stanovení analytů s využitím Trinderovy reakce

Sečník P. Jr.¹, Franeková J.¹, Komínková M.¹, Kotrbatý J.¹, Hunal Z.¹, Tluchořová D.², Jabor A.¹

¹Specializovaná biochemická laboratoř, Pracoviště laboratorních metod, IKEM, Praha

²Ústavní lékárna, IKEM, Praha

SOUHRN

Práce se zabývá interferencí dobutaminu s metodami využívajícími princip Trinderovy reakce a podmínkami získání vzorku u pacientů v intenzivní péči. Dobutamin výrazně snižuje koncentrace některých analytů (kreatinin stanovený enzymově, kyselina močová, triacylglyceroly, cholesterol, lipáza). Interference se projevuje pouze při hrubém porušení zásad pro odběr vzorků.

Klíčová slova: dobutamin, katecholaminy, Trinderova reakce, analytická interference, centrální venózní katetr, L-askorbová kyselina

SUMMARY

Sečník P. Jr., Franeková J., Komínková M., Kotrbatý J., Hunal Z., Tluchořová D., Jabor A.: Interference caused by dobutamine influencing methods based on Trinder reaction

The main goal of the study is to examine analytical interference caused by dobutamine influencing methods based on Trinder peroxidase reaction and possible preanalytical pitfalls in Intensive Care Units. Dobutamine interference has significant impact on some laboratory tests, causing falsely low values upon determination of: Creatinine - enzymatic method, Uric acid, Triglycerides, Cholesterol and Lipase. The phenomenon occurs predominantly as a result of violating specimen collection rules.

Keywords: dobutamine, catecholamines, Trinder reaction, analytical interference, central venous catheter, L-ascorbic acid

Úvodní kazuistika

V laboratoři PLM-SBL (Pracoviště laboratorních metod – Specializovaná biochemická laboratoř IKEM) bylo v období několika týdnů zaznamenáno vyšší procento extrémně nízkých koncentrací kreatininu v séru/plazmě (enzymový princip stanovení), které neodpovídalo změnám klinického stavu pacienta, případně dalším ukazatelům renálních funkcí. Při bližším hledání případných problémů v preanalytické fázi jsme zjistili, že nízké hodnoty koncentrací kreatininu se týkají zejména odběru z centrálního žilního katetru (CŽK) u pacientů s intra-venózně (cestou CŽK) podávanými léčivy obsahujícími dobutamin. Po opakování odběru z periferní žíly byly stanovené koncentrace kreatininu znatelně vyšší a byly v souladu s klinickým vývojem i ostatními parametry ledvinových funkcí. Příklad konkrétního pacienta uvádíme v Tabulce 1.

Table 1. Laboratory results of patient with i.v. DOBUJECT therapy, dosage 7.5 µg/kg/min (long term plasma creatinine concentration found in patient's history was approximately 200 – 300 µmol/l)

Analyte (plasma)	Sample drawn at 6:00 (central venous catheter)	Sample drawn at 7:17 (peripheral vein)
Creatinine (µmol/l)	94.2	255.3
Urea (mmol/l)	16.7	17.5
Cystatin C (mg/l)	3.57	3.94

Na základě uvedeného jsme předpokládali, že by se mohlo jednat o lékovou interferenci se stanovením kreatininu. Schopnost dobutaminu interferovat s enzymovým stanovením kreatininu je dlouhodobě známa a byla již v literatuře popsána [1, 2, 3]. Zajímavé ale bylo, že katecholaminy se k léčbě na našich klinických pracovištích používají poměrně často (většinou jsou aplikovány cestou CŽK) a uvedený fenomén jsme registrovali až v posledním období. Po konzultaci s jednotkou intenzivní péče kardiologické kliniky a lékárnou IKEM jsme zjistili, že v nedávné době došlo ke změně dříve používaného přípravku DOBUTREX za nový – DOBUJECT. Hlavní účinná látka zůstala stejná (dobutamin), rozdíl je v pomocné látce, v přípravku DOBUJECT je obsažená kyselina L-askorbová, u které je popsán podobný mechanismus interference. Předpokládali jsme proto, že interference je dána synergickým působením obou látek.

Úvod do problematiky

Pro stanovení kreatininu v naší laboratoři používáme enzymovou metodu Abbott Creatinine (Enzymatic) 8424-31 na analyzátoru Architect. Princip stanovení spočívá ve vzniku peroxidu vodíku jako produktu enzymové reakce, který v další reakci s chromoforem katalyzované peroxidázou poskytuje barevný produkt - chinoniminové barvivo (Trinderova reakce). Uvedený princip stanovení je použit i u dalších metod na analyzátoru Architect, přehled je v Tabulce 2.

Table 2. List of methods using Trinder peroxidase reaction principle in Abbott ARCHITECT c16000.

Analyte	Diagnostic kit	Specimen
Creatinine	Abbott Creatinine (Enzymatic) 8424-31	Serum/plasma/urine/drain/punctate
Uric acid	Abbott Uric Acid 7D76-21	Plasma/urine
Total cholesterol	Abbott CHOLESTEROL 7D62-21	Serum/plasma/drain/punctate
HDL cholesterol	Abbott Ultra HDL 3K33-21	Serum/plasma
Triglycerides	Abbott Triglyceride 7D74-21	Serum/plasma
Lipase	Abbott LIPASE 7D80-31	Serum/plasma

Princip interference dobutaminu

Mechanismus interference katecholaminů se stanoví na podkladě oxidace redukované formy chromoforu peroxidem vodíku popsal Karon [1]. Uvádí 3 hlavní teorie interference se stanoví založenými na Trinderově reakci, které jsou uvedeny na obr. 1.

Za hlavní mechanismus interference u dobutaminu je považována kompetice s chromoforem o vznikající peroxid vodíku (reakční schéma A na obr. 1). Dobutamin je oxidován za spotřeby peroxidu, který je nezbytný pro přeměnu nebarevného redukováného chromoforu na barevný produkt, změna optického prostředí je tedy

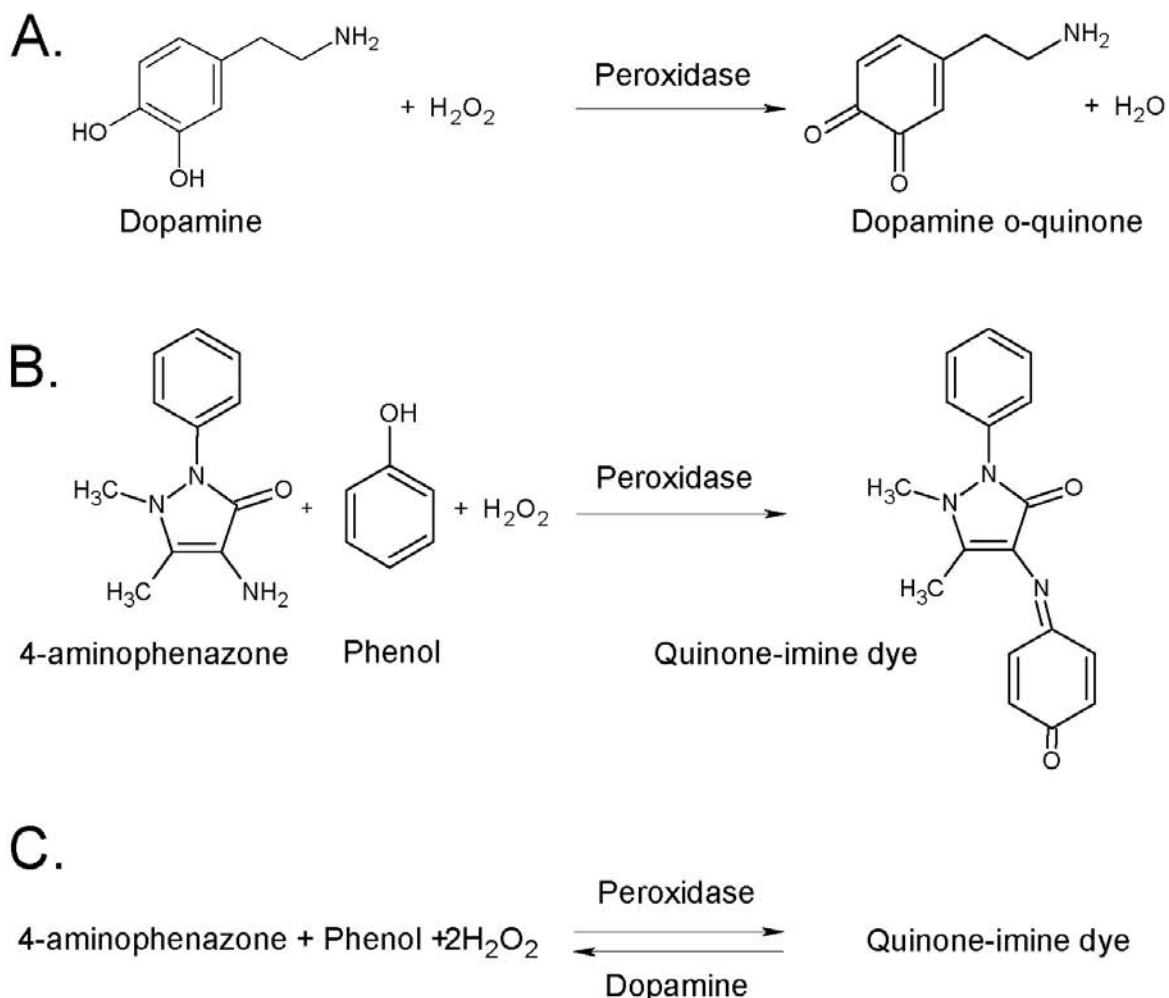


Fig. 1. Mechanisms of catecholamine - Trinder reaction interference [1]: A. Oxidation of catecholamine by peroxide to -o-quinone which leads to peroxide depletion. B. Direct interference with the Trinder reaction. C. Catecholamine affects the stability of the formed chromophore.

menší, čemuž odpovídají i nižší naměřené hodnoty absorbance. Výsledná stanovená koncentrace analytu je nižší [1, 2, 3]. Při simultánní aplikaci dobutaminu i odběru biologického materiálu z CŽK je míra interference popsána jako nejvyšší. Naopak při odběru z periferní žíly nebyla zaznamenána žádná interference. Některé studie předpokládají přítomnost vazby dobutaminu k lumen CŽK [2].

Princip interference kyseliny L- askorbové

Podobně i u kyseliny L-askorbové je popisován podobný mechanismus interference. Vitamin C je přednostně oxidován peroxidem, který je tímto spotřebován. Výsledkem je jeho nedostatek při formaci chinonimino-ového barviva v dalším kroku reakce (obr. 2).

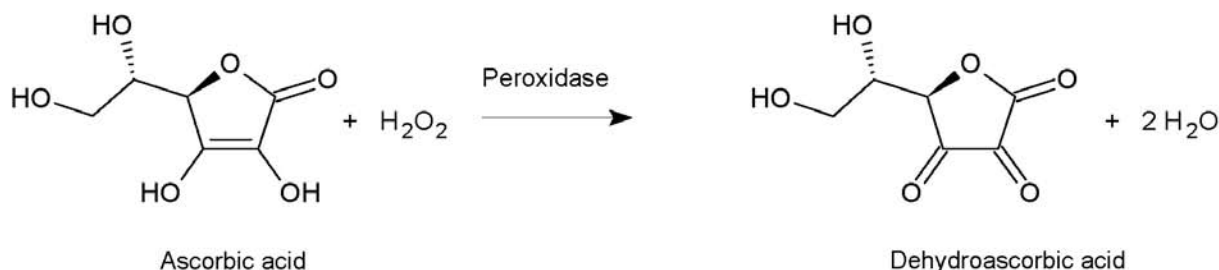


Fig. 2. Mechanism of L-ascorbic acid - Trinder reaction interference [4].

Interference se týká zejména stanovení kyseliny močové, cholesterolu, triacylglycerolů a glukózy (jen u stanovení na podkladě glukózooxidázové reakce), u kreatininu zatím popsána nebyla [4].

Experimentální část

K ověření teoretických předpokladů jsme zvolili dva typy pokusů:

Klinický pokus testoval interferenci při odběru biologického materiálu a aplikaci léků cestou centrálního žilního katétru za standardních podmínek na oddělení.

In vitro pokus se týkal potvrzení lékové interference samostatně pro DOBUJECT i kyselinu L- askorbovou podle upraveného protokolu EP07-A2 [5].

A. Klinický pokus; metodika a výsledky

V spolupráci s Klinikou kardiologie (KK) IKEM jsme prověřili postupy při odběru biologického materiálu. Vzhledem k často špatnému stavu periferního žilního řečiště u kritických pacientů jsou centrální žilní katetry (obr. 6) užívány kromě aplikace farmakoterapie i k odběru. S ohledem na různé individuální zvyklosti jsme zvolili k porovnání různé techniky odběru 4 vzorků od 1 pacienta a následně jsme provedli stanovení 4 „peroxidázových“ a 2 kontrolních „neperoxidázových“ parametrů. Odběry byly provedeny na lůžkovém oddělení KK IKEM zdravotní sestrou, za přítomnosti pracovníka laboratoře. Postup při jednotlivých odběrech včetně výsledků měření shrnuje Tabulka 3.

I přes evidentní zředění vzorku 1 při odběru (pokles celkové bílkoviny) je patrné, že zjištěné rozdíly nelze připisovat jenom tomuto faktoru a zaznamena-

ný negativní posun v koncentracích analytů u všech stanovení založených na peroxidázové reakci je s vysokou pravděpodobností výsledkem interference s podávaným léčivem DOBUJECT, které vzorek kontaminuje. Ověření bylo provedeno v následujícím pokusu in vitro.

B. IN VITRO pokus; metodika a výsledky

K potvrzení interference zjištěné v klinickém pokusu jsme zvolili postup podle upraveného protokolu EP07-A2 [5].

Testování bylo rozděleno do 2 částí.

- Interference dobutaminu se stanoveními založenými na peroxidázové reakci
- Podíl kyseliny L-askorbové v léčivu DOBUJECT na zmíněné interferenci

Prvním krokem bylo určení terapeutické koncentrace dobutaminu v ustáleném stavu při obvykle používaném dávkování. Výpočet jsme provedli z dávky dobutaminu (počítali jsme s doporučenou dávkou 7,5 µg/kg/min) podávaného v kontinuální infuzi a clearance dobutaminu. Poskytlo nám to rámcovou představu o reálných koncentracích v krvi pacientů při standardním dávkování. Přípravek DOBUJECT obsahuje 250 mg dobutaminu a 5 mg kyseliny L-askorbové v 5 ml roztoku (v jedné ampuli). Tyto informace byly východiskem k sestavení ředící řady pro dosažení cílové koncentrace dobutaminu v testovaných vzorcích.

Po analýze výsledků jsme zjistili, že míra interference je značná (pro kreatinin 87 %) už při nejnižší zvolené koncentraci dobutaminu. Pokus jsme se rozhodli zopakovat s nižšími koncentracemi dobutaminu než při prvním testování. Ke konstantnímu objemu séra v každém vzorku jsme přidávali vždy stejný objem přídavku. Přídavek obsahoval u jednotlivých vzorků pokusu DOBUJECT a fyziologický roztok v různém objemovém poměru. Tím jsme vyloučili změnu koncentrace analytů vlivem rozdílného naředění jednotlivých vzorků a zároveň dosáhli stoupající koncentrace DOBUJECTu v jednotlivých vzorcích pokusu.

Pro ověření podílu kyseliny L-askorbové na interferenci, byla vytvořena samostatná řada vzorků. Koncentrace askorbátu pro pokus jsme stanovili dle poměru látek v přípravku DOBUJECT (askorbát : dobutamin = 1:50). Při pokusu byl použit preparát pro i. v. aplikaci ACIDUM ASCORBICUM, který obsahuje 500 mg kyseliny L-askorbové v 5 ml roztoku.

Byla připravena 2 směsná séra (Pool A, Pool B) o rozdílné koncentraci kreatininu (Pool A ≈ 80 µmol/l, Pool B ≈ 300 µmol/l) pro srovnání míry interference na různých koncentracích analytů. Pro měření jsme vybrali

Table 3. Clinical trial results

Sample	Creatinine (enzymatic) $\mu\text{mol/l}$	Cholesterol mmol/l	Uric acid $\mu\text{mol/l}$	Triglycerides mmol/l	Glucose (hexokinase) mmol/l	Total protein g/l
1	17.7	3.31	98.9	0.34	6.23	50.8
2	85.4	5.08	511.3	1.14	7.97	67.6
3	87.6	5.19	533.5	1.19	8.07	68.2
4	89.3	5.16	522.7	1.15	7.91	67.9

Sample collection notes

- 1= sample drawn from central venous catheter lumen, where DOBUJECT is administered, without preceding precautions.
- 2 = sample collected from lumen where DOBUJECT is administered, and 5 ml of material was drawn aside before collection.
- 3 = sample drawn from lumen not used for DOBUJECT application. Lumen "rinsed" with 0.9% saline and 5 ml of material drawn aside before sample collection.
- 4= sample drawn from lumen not used for DOBUJECT application, DOBUJECT infusion pump stopped during sample collection.

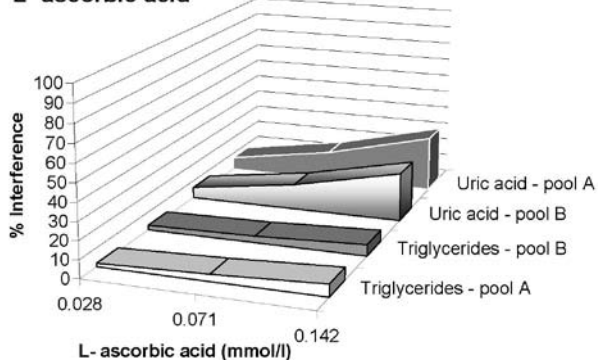
6 parametrů (uvedených výše), využívajících ke stanovení principu Trinderovy reakce, u kterých jsme očekávali možnost interference. Pro kontrolu a vyloučení rozdílného naředění vzorků jsme doplnili 6 parametrů bez uvedeného principu stanovení.

rence patrná jen u stanovení kyseliny močové (Pool A 6 - 27 %, Pool B 7,5 - 31 %) a v menší míře u stanovení triacylglycerolů (Pool A - 6,8 %, Pool B 6,3 %). Porovnání interferujících parametrů pro dobutamin a askorbát je uvedeno na obr. 3a, 3b. U dalších parametrů, které byly součástí pokusu, interference zaznamenána nebyla.

Výsledky – kyselina L-askorbová

Při testovaných koncentracích askorbátu (0,028; 0,071 a 0,142 mmol/l) je klinicky relevantní míra interfe-

L- ascorbic acid



Dobutamine

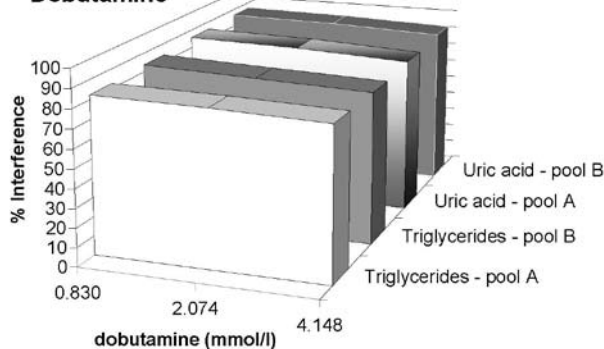
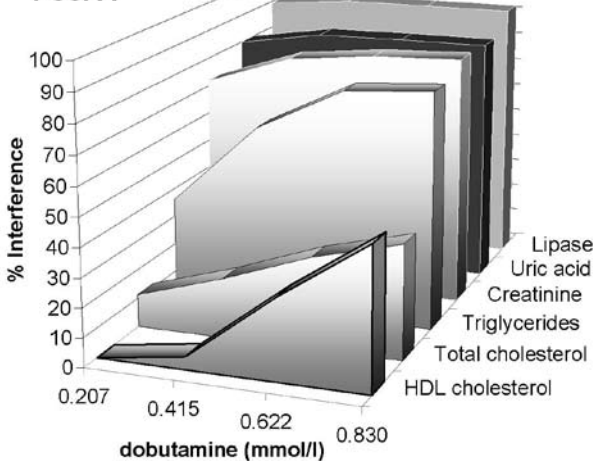


Fig. 3a, 3b. Degree of interference shown as a percentual decrease against initial concentration (measured in drug-free specimen). Comparison of dobutamine and L-ascorbic acid interference when using same dobutamine : L-ascorbic acid concentration ratio as in DOBUJECT. Tested range: 0.830 – 4.148 mmol/l of dobutamine; 0.028 – 0.142 mmol/l of L-ascorbic acid.

Pool A



Pool B

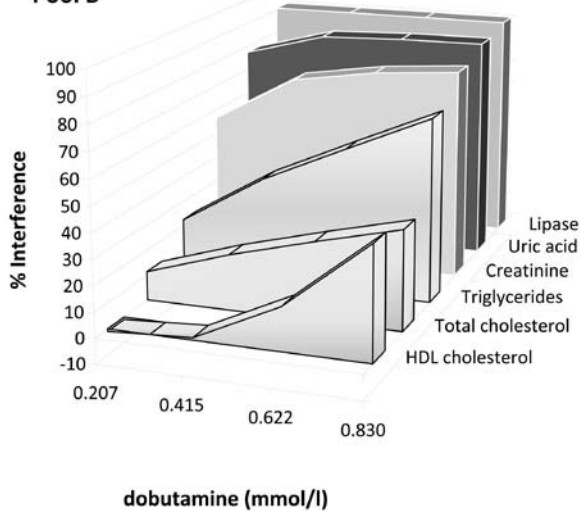


Fig. 4 and 5. Degree of interference shown as a percentual decrease against initial concentration (measured in drug-free specimen). Fig. 5 – Pool A results, Fig. 6 – Pool B results. Tested range 0.207 – 0.830 mmol/l of dobutamine.

Table 4. In vitro trial results (absolute concentrations, analytes with interference marked grey)

dobutamine (mmol/l)		0	0.207	0.415	0.622	0.83
Pool A						
Creatinine	μmol/l	75.3	21.2	13.5	11.1	10.3
Uric acid	μmol/l	285.9	57.1	43.4	42.4	42.4
Cholesterol	mmol/l	4.76	4.22	3.78	3.26	2.89
Triglycerides	mmol/l	1.44	0.92	0.51	0.29	0.26
HDL	mmol/l	1.35	1.35	1.29	0.97	0.69
Lipase	μkat/l	0.76	0.08	<0.07	<0.07	<0.07
Na	mmol/l	139.9	140.8	140	139.4	140.5
K	mmol/l	4.2	4.22	4.21	4.19	4.23
Cl	mmol/l	106.4	106.8	106.7	106.6	107.4
Urea	mmol/l	5.6	5.6	5.6	5.4	5.6
Total protein	g/l	68.1	67.8	67.8	67.8	68.2
Glucose	mmol/l	6.87	6.82	6.85	6.85	6.85
Albumin	g/l	37.8	37.7	38	37.5	37.7
Pool B						
Creatinine	μmol/l	352.6	153.2	87.2	68.5	58.9
Uric acid	μmol/l	413.4	92.8	55.4	50.7	49.1
Cholesterol	mmol/l	4.72	4.18	3.68	3.26	2.87
Triglycerides	mmol/l	2.49	1.93	1.43	1.05	0.68
HDL	mmol/l	1.06	1.07	1.05	0.88	0.59
Lipase	μkat/l	0.66	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07
Na	mmol/l	139.4	139.1	139.5	138.9	138.2
K	mmol/l	4.7	4.69	4.7	4.68	4.67
Cl	mmol/l	107.9	107.8	108.3	107.9	107.9
Urea	mmol/l	16.9	17.1	16.9	16.9	17.2
Total protein	g/l	62.4	62.3	62.3	62.2	62.2
Glucose	mmol/l	6.67	6.66	6.68	6.68	6.72
Albumin	g/l	34.9	34.8	34.6	34.8	34.8

Výsledky – dobutamin

Všechna zkoumaná stanovení založená na principu Trinderovy peroxidázové reakce se vyznačují klinicky relevantní mírou interference s dobutaminem (Tabulka 4, obr. 4, 5). Nejvyšší interference byla zjištěna u stanovení kreatininu (pool A 72 – 86 %, pool B 57 – 83 %), dále kyseliny močové (pool A 80 – 85 %, pool B 78 – 88 %), triacylglycerolů (pool A 36 – 82 %, pool B 22 – 73 %) a lipázy (90 % pro oba pooly) (obr. 5). Nižší, ale stále nezanedbatelná je interference u stanovení celkového cholesterolu a HDL cholesterolu. U stanovení nevyužívajících Trinderovu reakci se interference neprojevila (Tabulka 4).

Diskuse

Z výsledků uvedených v tabulce 3 lze usuzovat, že výrazný dopad na naměřené koncentrace má především odběr z lumen pro farmakoterapii, bez odsátí 5 ml materiálu mimo odběrovou zkumavku - vzorek 1. Při odběru z lumen pro farmakoterapii, navzdory odsátí 5 ml mimo, je patrná určitá zbytková interference - vzorek 2 (nižší koncentrace kyseliny močové). Na druhé

straně, pokud je zastavena aplikace léčiva a odběr je proveden z distálního lumen bez dalších opatření, dopad na stanovení je minimální - vzorek 4.

Jak je patrné z obr. 6, jednotlivá lumina se spojují do společného na různých místech. Při nevhodně zvoleném lumen pro odběr se míra kontaminace vzorku jedním z kontinuálně aplikovaných léčiv zvyšuje. Odběr by měl být prováděn vždy z lumen ústícím „blíže pacientovi“ vůči luminu pro farmakoterapii, zároveň po

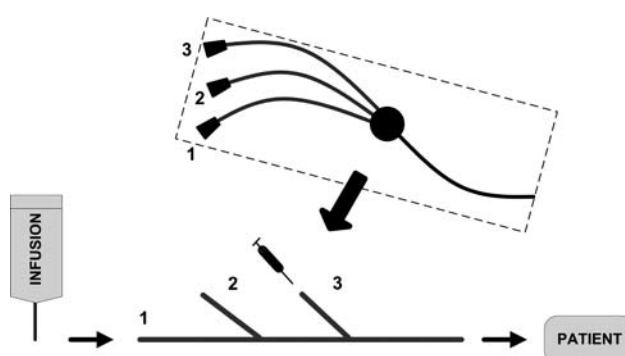


Fig. 6. Central venous catheter scheme. Lumina 1, 2 and 3 are depicted. Only lumen 3 should be used for sampling.

dobu odběru by měla být pozastavena aplikace medikamentů (pokud to dovoluje klinický stav pacienta). Před vlastním odběrem je vhodné odsát určité množství krve (5-7 ml) mimo odběrovou zkumavku. Při ideálním provedení je míra kontaminace minimální a nemá žádný vliv na laboratorní vyšetření.

Z uvedeného tedy vyplývá, že pro odběr není vhodné využívat lumen, kam je aplikována farmakoterapie. Pokud je možné u pacienta přerušit aplikaci léčiva po dobu odběru, za minimální dostačující opatření je možné považovat pozastavení infuze a pro odběr využít lumen ústící „nejblíže pacientovi“ (lumen 3 na obr. 6). Nicméně odsátí 5-7 ml mimo odběrovou nádobu riziko kontaminace dále výrazně snižuje. V případě, že klinický stav pacienta vylučuje přerušování aplikace, je nutno využít lumen ústící „blíže pacientovi“ a zároveň odsát 5-7 ml mimo odběrovou zkumavku. Ideálním řešením problému by jistě bylo získat vzorky venepunkcí z periferní krve. Plošná praktická aplikace je však obtížně dosažitelná zejména kvůli často špatné kvalitě periferního krevního řečiště u pacientů JIP.

V in-vitro pokusu jsme prokázali analytickou interferenci dobutaminu u metod využívajících Trinderovu reakci. Naše pozorování je v souladu s daty uváděnými v literatuře [1, 2, 3]. Míra interference u dobutaminu je nejvíce vyjádřena u stanovení kreatininu, kyseliny močové, triacylglycerolů, cholesterolu a lipázy. Interference kyseliny L-askorbové, která je pomocnou látkou přípravku DOBUJECT, by přicházela v úvahu u stanovení kyseliny močové a triacylglycerolů. Nejedná se ale o významnou interferenci vzhledem k tomu, že její látková koncentrace v preparátu je přibližně 30krát nižší než koncentrace dobutaminu.

Závěr

U pacientů v intenzivní péči je často pro odběr biologického materiálu využíván centrální žilní katetr. Při simultánní aplikaci farmakoterapie je důležité myslet

na možnost kontaminace odebíraného vzorku léčivem a následnou interferenci při stanovení některých analytů. Při podávání dobutaminu se jedná zejména o metody založené na principu Trinderovy reakce – kreatinin, kyselina močová, cholesterol, triacylglyceroly, lipáza, kde interference vede ke snížení koncentrací o 80 % a více podle kontaminace. Tato interference se ale projevuje pouze při hrubém porušení zásad správného odběru biologického materiálu z centrálního žilního katétru.

Literatura

1. **Karon, B. S., Daly, T. M., Scott, M. G.** Mechanisms of dopamine and dobutamine interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore. *Clin. Chem.*, 44, 1998, č. 1, s. 155–160.
2. **Saenger, A. K., Lockwood, C., Snozek, C. L., Milz, T. C., Karon, B. S., Scott, M. G., Jaffe, A. S.** Catecholamine interference in enzymatic creatinine assays. *Clin. Chem.*, 55, 2009, č. 9, s. 1732–1736.
3. **Weber, J. A., van Zanten, A. P.** Interferences in current methods for measurements of creatinine. *Clin. Chem.*, 37, 1991, č. 5, s. 695–700.
4. **Martinello, F., Luiz da Silva, E.** Mechanism of ascorbic acid interference in biochemical tests that use peroxide and peroxidase to generate chromophore. *Clin. Chim. Acta*, 373, 2006, č. 1-2, s. 108–116.
5. Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, Second Edition, Clinical Laboratory and Standards Institute, 2005.

Do redakce došlo 21. 11. 2011

Adresa pro korespondenci
MUDr. Peter Sečnik, Jr.
Pracoviště laboratorních metod
Institut klinické a experimentální medicíny
Václavská 1958/9
140 21 Praha
e-mail: peter.secnik@ikem.cz