

ARTICLE ORIGINAL

INTERFÉRENCE DE L'HÉMOLYSE SUR LE DOSAGE DE TREIZE PARAMÈTRES BIOCHIMIQUES RÉALISÉS SUR AUTOMATE ARCHITECT™ CI8200**INTERFERENCE OF HEMOLYSIS ON THE DETERMINATION OF THIRTEEN BIOCHEMICAL PARAMETERS PERFORMED ON ARCHITECT™ CI8200.**

Zoubir TRIKI a (1), Sara BENSAD (1,2), Karima BENMEBAREK (1,2) tzm2002@hotmail.fr a

1. Laboratoire de biochimie clinique et biologie moléculaire centre hospitalo-universitaire Dr Benbadis de Constantine.

2. Laboratoire de recherche de biologie et de génétique moléculaire de la faculté de médecine université salah boubnider

Résumé Introduction : Notre travail visait à déterminer de façon expérimentale l'indice d'hémolyse acceptable pour chacun des paramètres étudiés et de le comparer aux données des fabricants afin de s'assurer que les indices fournis sont applicables sur le terrain. **Matériels et méthodes :** Cent cinquante prélèvements sanguins ont été choisis pour effectuer ce travail. L'hémolyse a été provoquée par agitation mécanique en présence des billes inertes et à différentes durées. Le total change limit ou TCL a été calculé. Les niveaux d'hémoglobine plasmatiques ont été estimés au moyen de l'équation de régression linéaire entre l'écart potassique après et avant hémolyse (ΔK) et la concentration d'hémoglobine [HGB]. **Résultats :** La LDH, le K^+ et l'ASAT sont les plus affectés par l'hémolyse. Les indices d'hémolyse acceptables pour ces trois paramètres ont été déterminés à l'aide des graphiques de régression linéaire entre les coefficients de variation lié à cette interférence ($CV_H\%$) et les taux d'hémoglobine : la LDH (28 mg/dL), le K^+ (40 mg/dL) et l'ASAT (64 mg/dL). Ces calculs étaient justifiés par la corrélation parfaite constatée entre le $CV_H\%$ et l'hémoglobine. Les valeurs seuils pour l'hémolyse ont été déterminées en extrapolant les moyennes des $CV_H\%$ aux moyennes des [HGB] sur les graphiques à la base desquelles l'interférence devient biologiquement inacceptable et qui correspond à $|CV_H| = |TCL|$. Les seuils retenus sont les suivants : le Na^+ : >600 mg/dL, l'ALAT : >800 mg/dL, les TRIG : >1050 mg/dL, le CHOL : >1140 mg/dL et la LIP : >1160 mg/dL. **Conclusion :** L'incidence de l'hémolyse sur les paramètres cliniquement pertinents et en présence d'une insuffisance de données de la part des fabricants, exige les biologistes à établir leurs propres indices d'hémolyse expérimentaux, pour mieux traiter et commenter les résultats des échantillons hémolysés. **Mots clés :** hémolyse, interférence, hémoglobine, indice de l'hémolyse.

Abstract Introduction : The purpose of our work was to test the acceptable hemolysis index for each of the parameters studied and to compare it with manufacturer data to ensure that the indices provided are applicable in the field. **Materials and methods :** One hundred and fifty blood samples were selected to perform this work. Hemolysis was caused by mechanical agitation in the presence of inert balls and at different times. The total exchange limit or TCL was calculated. Plasma hemoglobin levels were estimated using the linear regression equation between the potassium gap after and before hemolysis (ΔK) and the hemoglobin concentration [HGB]. **Results :** LDH, K^+ and ASAT are most affected by hemolysis. Acceptable hemolysis indices for these three parameters were determined using linear regression graphs between the coefficients of variation related to this interference ($CV_H\%$) and hemoglobin levels : LDH (28 mg/dL), K^+ (40 mg/dL) and ASAT (64 mg/dL). These calculations were justified by the perfect correlation between $CV_H\%$ and hemoglobin. The threshold values for hemolysis were determined by extrapolating the $CV_H\%$ averages to the [HGB] averages on the charts on which the interference becomes biologically unacceptable and which corresponds to $|HVC| = |TCL|$. The thresholds are as follows : Na^+ : >600 mg/dL, ALT : >800 mg/dL, TRIG : >1050 mg/dL, CHOL : >1140 mg/dL and LIP : >1160 mg/dL. **Conclusion :** The impact of hemolysis on clinically relevant parameters and in the presence of insufficient data from manufacturers, requires biologists to establish their own experimental hemolysis indexes, to better treat and comment on hemolysed sample results. **Key words :** hemolysis, interference, hemoglobin, hemolysis index

Introduction :

L'hémolyse se définit par la destruction des érythrocytes qui se produit in vivo mais le plus souvent in vitro par anomalies de prélèvement ou de centrifugation, et ayant comme conséquence le passage des constituants des cellules sanguines dans le plasma et/ou sérum [1,2]. L'hémolyse aboutit à des interférences qui peuvent être dues : à une augmentation des constituants intracellulaires dans le liquide extracellulaire (interférences d'apport), à la couleur pourpre de l'hémoglobine (interférence optique) et aux constituants intracellulaires qui interfèrent avec le mécanisme de la réaction d'analyse (interférences chimiques) [3]. L'hémolyse est la cause la plus fréquente d'interférences détectées de façon routinière ; dans la phase pré analytique la lyse in vitro des globules rouges qui implique une relocalisation de l'hémoglobine et d'autres

éléments intra érythrocytaires est la principale cause d'interférence et de rejet des résultats d'analyse biochimique à l'échelle mondiale [4,5]. Les données fournies par les fabricants sur l'incidence de l'hémolyse sont généralement incomplètes et difficiles à interpréter, d'autre part les méthodes de détermination de l'interférence varient et la formulation des résultats n'est pas homogène, de ce fait l'hémolyse présente à la fois une hétérogénéité de détection de l'interférence, de son expression par le biologiste ainsi que sa compréhension par le clinicien [6]. Les perturbations dues à l'hémolyse ne seront pas d'autant plus problématiques que la différence de concentration ou de l'activité intra-érythrocytaire et extra-érythrocytaire de l'analyte sont importantes [7-8]. Depuis quelques années, les fournisseurs d'automates et de réactifs biochimiques ont

fourni des indices d'hémolyse, d'ictère et de lactescence au-delà desquels les résultats ne sont plus fiables [9-11]. Ce travail avait comme principal objectif de déterminer le seuil d'hémolyse acceptable pour des valeurs normales de chacun des paramètres étudiés, et de le comparer vis-à-vis des données des fabricants, afin de veiller à ce que ces indices fournis soient applicables sur train.

Matériels et méthodes : Il s'agit d'une étude analytique expérimentale, dans le but d'évaluer et de quantifier l'ampleur de l'influence de l'hémolyse sur la mesure de treize paramètres biochimique, basée sur un protocole de lyse par agitation mécanique et la comparaison par la suite des taux des différents paramètres dosés avant et après hémolyse. L'étude s'est déroulée au niveau du Laboratoire Central de biochimie du centre Hospitalo-universitaire Dr Benbadis de Constantine, au cours de la période allant de Janvier à mars 2022, sur le système intégré de Abbott ARCHITECT PLUS™ ci8200. Dans la littérature L'indice de l'hémolyse est déterminé être la plus forte concentration d'hémoglobine présente dans l'échantillon donnant un résultat entre plus ou moins 10 % par rapport au même échantillon non hémolysé, cet index est toutefois défini pour une seule valeur généralement normale [11], cette définition s'applique aux protocoles basés sur le recours à des standards évitant les variations biologiques intra et interindividuelle (des contrôles, des pools de sérum ou plasma, des gammes d'hémolysât...). Dans notre expérience on a choisi un protocole de provocation mécanique de l'hémolyse dans les échantillons des patients eux-mêmes, cela nécessite que l'on tienne compte des variations biologiques dans la détermination des pourcentages associés à cette interférence, c'est pourquoi le total change limit (TCL) ou variation limite totale acceptable (VLTA) a été calculé [12]. L'interférence peut être considérée comme biologiquement inacceptable si elle excède la combinaison de la variabilité analytique selon la norme ISO 5725-6 [16] et de la variabilité biologique soit la VLTA ou le TCL [17].

Paramètres étudiés L'interférence de l'hémolyse a été étudiée sur les paramètres suivants : la lactate déshydrogénase (LDH) dosée par la méthode enzymatique cinétique : lactate/pyruvate à 340 nm, le potassium (K^+) et le sodium (Na^+) dosé par la potentiométrie indirecte, les transaminases (l'aspartate aminotransférase ou l'ASAT et l'alanine aminotransférase ou l'ALAT) dosées par la méthode enzymatique cinétique sans phosphate de pyridoxal à 340 nm, le cholestérol (CHOL) dosé par la méthode enzymatique : cholestérol oxydase/peroxydase en présence d'un chromogène à 500 nm, les triglycérides (TRIG) dosés par la méthode enzymatique : glycérol oxydase/peroxydase en présence d'un chromogène à 500 nm, la créatinine (CREA) dosée par la cinétique de Jaffé à 500 nm, la lipase (LIP) dosée par une méthode

colorimétrique à 548 nm, la bilirubine totale (BiliT) dosée par la méthode colorimétrique de diazotation à 548 nm, la phosphatase alcaline (PAL) dosée par une méthode colorimétrique à 404 nm, la gamma glutamyl transférase (GGT) dosée par une méthode colorimétrique à 412 nm et le glucose (GLU) dosé par la méthode enzymatique cinétique : hexokinase/glucose-6-phosphate déshydrogénase à 340 nm (**Tableau 1**).

Population et traitement : Cent cinquante (150) échantillons sanguins de patients hospitalisés dans divers services prélevés dans de l'héparinate de lithium sans gel ont été sélectionnés pour effectuer ce travail, les échantillons en question contiennent une quantité suffisante pour être manipulés avec précision. Avant d'être centrifugé, 1 ml de sang total a été soigneusement pris à l'aide d'une micropipette et versé dans un tube sec, par la suite deux billes inertes ont été ajoutées et suivies d'une étape d'agitation en utilisant un vortex de marque : IKA VIBROFIX VF1 ELECTRONIC à une vitesse de 2500 tr/min, pour des durées spécifiées, ce qui permet la destruction des globules rouges de manière croissante. Les échantillons recueillis ont été répartis en 10 séries de 15 échantillons par série, chaque série a été traitée pour une période déterminée : 15 sec, 30 sec, 45 sec, 60 sec, 75 sec, 90 sec, 105 sec, 120 sec, 135 sec, et 150 sec pour obtenir des hémolyses à des degrés croissant. La concentration d'hémoglobine augmente avec la durée d'agitation de façon à couvrir des taux d'hémoglobine allant de 100 à plus de 1100 mg/dL. Les plages produites en mg/dL d'hémoglobine sont les suivantes : série 1 : [100-250], série 2 :]250-330], série 3 :]330-420], série 4 :]420-520], série 5 :]520-580], série 6 :]580-670], série 7 :]670-770], série 8 :]770-980], série 9 :]980-1100], série 10 : >1100. (**Figure 1**).

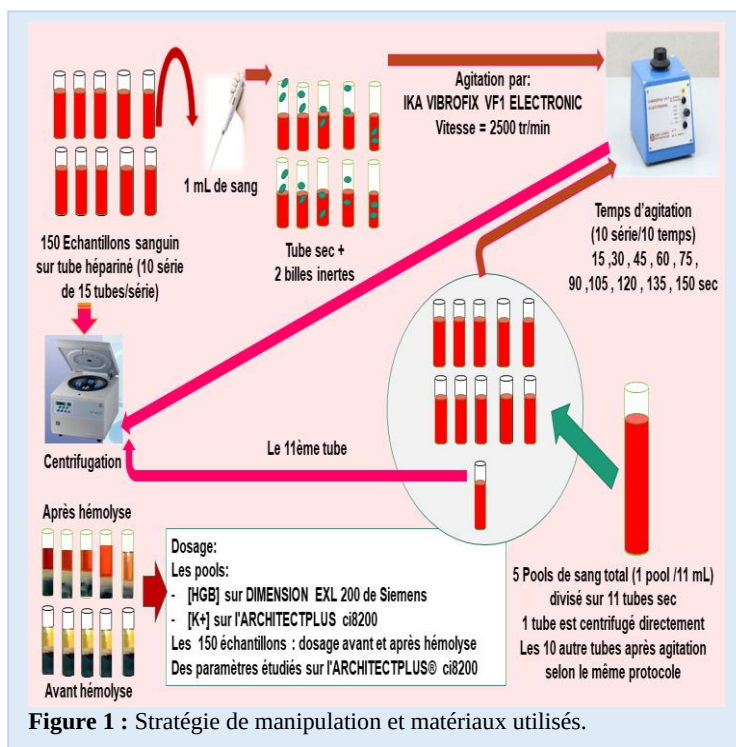


Tableau 1. Paramètres pour lesquels l'influence de l'hémolyse a fait l'objet de l'étude.

Paramètres	Principe De dosage	Méthode	Longueur D'onde de mesure	Domaine De linéarité	Plage De Référence	CV reproductibilité (%)		Imprécision de mesure (%)
						N 1	N 2	
Le glucose (GLU)	Méthode Enzymatique	HK/G6PDH	340 nm	5 -800 mg/dL	70 à 110 mg/dL	2.15	1.51	≤ 5
Le sodium (Na+)	Potentiométrique	ICT indirect	/	100 -200 mmol/L	136 à 145 mmol/L	1,3	0,7	≤ 1,5
Le potassium (K+)	Potentiométrique	ICT indirect	/	1-10 mmol/L	3,5 à 5,1 mmol/L	1,4	1,0	≤ 2,7
La créatinine (CREA)	Méthode colorimétrique	Jaffé cinétique compensée	500 nm	0.20 - 37 mg/dL	0,57 à 1,25 mg/dL	4.95	3.18	≤ 6
La bilirubine total (BiliT)	Méthode colorimétrique	Diazotation	548 nm	0.1 - 25 mg/dL	0,2 à 1,2 mg/dL	2	1	≤ 5
Les triglycérides (TRIG)	Méthode enzymatique	LPL, Glycéro kinase, GPO-POD chromogène	500 nm	0,07 -16.05 mmol/dL	< à 150 mg/dL	1.7	2	≤ 5
Le cholestérol (CHOL)	Méthode enzymatique	CHOL ESTERASE CHOL PO-POD Chromogène	500 nm	0,16 -18,26 mmol/L	< à 239 mg/dL	1,5	1,6	≤ 5
Lactate déshydrogénase (LDH)	Méthode enzymatique	IFCC Lactate/Pyruvate	340 nm	5 - 2000 U/L	125 à 220 UI/L	3.44	1.85	≤ 4.7
Alanine amino transférase (ALAT)	Méthode enzymatique	IFCC sans phosphate de pyridoxal	340 nm	5 - 942 U/L	0 à 55 U/L	5.2	2.0	≤ 5.2
Aspartate amino transférase (ASAT)	Méthode enzymatique	IFCC sans phosphate de pyridoxal	340 nm	2 - 913 U/L	5 à 34 U/L	2.1	0.7	≤ 4.6
Phosphatase alcaline (PAL)	Méthode colorimétrique	Para-nitrophényl phosphate	404 nm	5 - 2200 U/L	40 à 150 U/L	5.7	2.2	≤ 6.2
Gamma glutamyl transférase (GGT)	Méthode colorimétrique	GG-3-carboxy-4-nitroaniline	412 nm	3 - 1543 U/L	9 à 64 U/L	2.9	1.2	≤ 4.8
Lipase (LIP)	Méthode colorimétrique	Colorant quinone	548 nm	3 - 1200 U/L	8 à 78 U/L	3.5	4.5	≤ 7.5

La relation entre la durée d'agitation et le taux d'hémoglobine libérée n'est pas assez fidèle pour reproduire à chaque fois la même concentration, ces écarts sont expliqués par les variations interindividuelles (la fragilité des membranes plasmatique, l'hématocrite, le volume plasmatique ...) et les défauts de manipulation (le volume prélevé, la micropipette, la durée d'agitation, l'exclusion des échantillons non conformes au critère d'inclusion...). Afin de compenser cette limite, certains échantillons sont classés dans la série correspondante selon le taux d'hémoglobine produit, tandis que d'autres qui ne remplissent pas les critères d'inclusion sont rejetés.

Une autre étude complémentaire a été menée parallèlement pour estimer les niveaux d'hémoglobine à partir de l'équation du graphe de régression linéaire entre l'écart de potassium après et avant l'hémolyse (ΔK) et le taux d'hémoglobine libérée par rupture des hématies : la méthode de dosage quantitative de l'hémoglobine basée sur le principe AHD-575 [18] a été adaptée sur un canal ouvert d'un automate Dimension® EXL™ 200 de Siemens Healthineers, calibrée et contrôlée par des hémolysats de concentration connue (méthode simple a réalisé avec des réactifs moins cher et non toxique: 0,1 mol/L de NaOH + Triton X100 = 25 g/11 L de NaOH), par la suite, des pools de sang total ont été recueillis, divisés en 5 séries de 11 tubes/série et manipulé de la même façon, mais cette fois-ci le onzième tube de chaque série est centrifugé directement sans provocation de l'hémolyse (tube avant hémolyse). Après agitation et centrifugation, le dosage du potassium avant et après hémolyse est effectuée sur l'ARCHITECT™ ci8200. L'hémoglobine a ensuite été mesurée à l'aide de la méthode AHD-575 installée auparavant sur le système de chimie intégré Dimension® EXL™ 200, les mesures sont comparées vis-à-vis des indices semi-quantitative de l'automate (**Figure 2**). L'étude de la régression linéaire entre l'écart potassique (ΔK) et la concentration d'hémoglobine a mis en évidence une corrélation parfaite justifiant l'estimation des indices de l'hémolyse à partir de l'équation du tracé de régression linéaire entre (ΔK) et l'hémoglobine.

Critères d'exclusion :

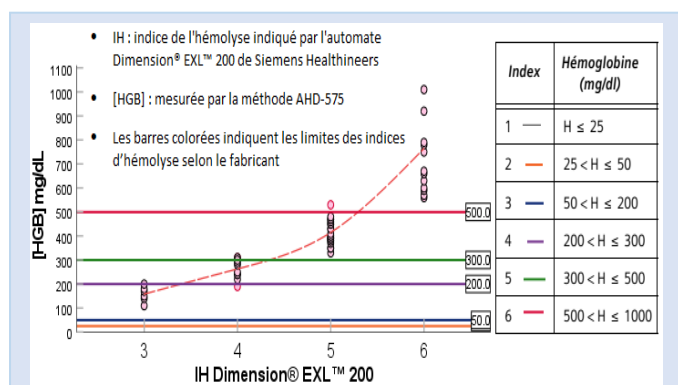


Figure 2 : Relation entre les [HGB] mesurées par la méthode AHD-575 et les indices d'hémolyse indiqués par l'automate Dimension® EXL™ 200.

Les échantillons qui présentent avant provocation de l'hémolyse un aspect ictérique, lipidique ou hémolysée visible à l'œil nu sont rejetés. Les valeurs avant hémolyse au-delà des normes habituelles ne sont pas acceptées.

Dosage et calculs :

Après provocation de l'hémolyse et la centrifugation des échantillons, la mesure des analytes étudiées avant et après hémolyse permet de :

- Calculer l'écart potassique (ΔK) et l'estimation subséquente de la concentration d'hémoglobine tirée de l'équation de la courbe de régression linéaire.

- Déterminer les coefficients de variation en rapport avec l'hémolyse (CV_H %)

CV_H %

$$= \frac{(\text{Taux après hémolyse} - \text{Taux avant hémolyse}) \times 100}{\text{Taux avant hémolyse}} \%$$

- Par la suite le total change limit (TCL) a été établie pour chaque analyte de la présente étude :

$$TCL = \sqrt{(2,77CVa)^2 + (0,5CVw)^2} \quad (\text{Tableau 2}).$$

La variabilité analytique (CVa %) correspond au coefficient de variation de reproductibilité selon les données de la Société Française de biologie clinique (SFBC) et choisi pour le niveau moyen d'analyte [13], alors que la variabilité biologique correspond à la variabilité intra-individuelle indiquée dans les tables de Ricos (CVw) [14]. Pour le cholestérol et les triglycérides le total change limit (TCL) correspond à l'écart type acceptable recommandé par le national cholestérol education program (NCEP) [15].

Tableau 2 : Seuils décisionnels calculés (TCL)

ANALYSE	CVa %	CVw %	TCL (%)	REFERENCE
Na ⁺	1,1	0,7	3,1	SFBC/Ricos
K ⁺	1,6	4,8	5,0	
Créatinine	4,5	6	12,8	
Glucose	2,4	4,5	7,0	
ASAT	6	11,9	17,7	
ALAT	6	18	18,9	
LDH	6	8,6	17,2	
PAL	6	6,4	16,9	
Lipase	6	23,1	20,2	
Bilirubine totale	5,6	23,8	19,6	
GGT	6	13,8	18,0	NCEP
Cholesterol	3,0	/	9,0	
Triglycéride	5,0	/	15,0	

L'analyse statistique

L'analyse statistique a été faite sur le logiciel IBM® SPSS® Statistics version 28.0, de sorte que le test ANOVA post hoc à un facteur à posteriori de faire une comparaison des coefficients de variation liés à l'hémolyse (CV_H %) obtenue pour chaque série par rapport à une série théorique de $CV_H = 0$ % et d'une concentration d'hémoglobine nul qui représente l'état avant hémolyse. Le facteur correspond à l'hémoglobine moyenne de chaque série. Le seuil de significativité statistique était de 0,05. Les graphiques des moyennes des CV_H % en fonction des moyennes des [HGB] nous ont permis de déterminer les seuils de

l'hémolyse à partir desquels l'interférence devient biologiquement inacceptable, et qui correspond à la concentration d'hémoglobine d'où le $|\text{CV}_H| = |\text{TCL}|$. Notre critère d'acceptabilité est représenté sur les graphiques par les barres horizontales ($\pm \text{TCL}$ ou $\text{CV}_H\%$ compris entre $-\text{TCL}$ et $+\text{TCL}$). L'étude de la corrélation linéaire entre l'écart potassique et la concentration d'hémoglobine a été réalisée sur le logiciel Bureau Microsoft® Office Excel version 2019 pour Windows, sur lequel la courbe de régression linéaire a été établie, le test de corrélation de Pearson et de régression (R^2) ont été effectués.

Résultats :

Les indices de l'hémolyse ont été estimés à partir de l'équation du tracé de régression entre ΔK et la concentration d'hémoglobine comme suit : $[\text{HGB}] \text{ mg/dL} = \frac{\Delta K}{0,0052}$. La corrélation était parfaite ce qui justifie les calculs ; le coefficient de détermination $R^2 = 0.9665$ (r de Pearson = 0.9551), la P-value est $< 0,001$ (Figure 3).

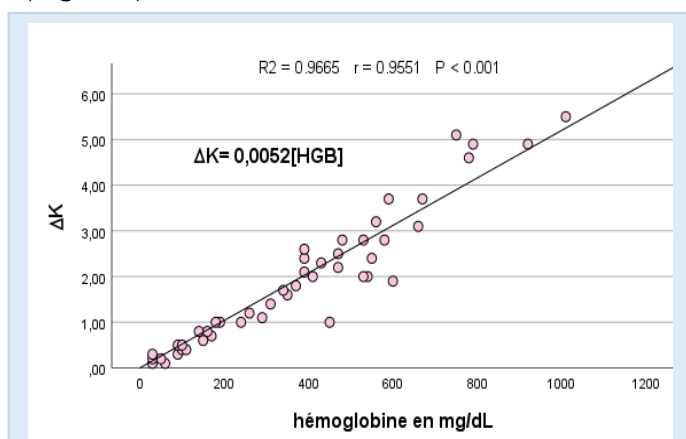


Figure 3 : Courbe de régression linéaire $\Delta K/[HGB]$

Les résultats du test ANOVA et les statistiques descriptives figurent respectivement sur le tableau (3) et le tableau (4). Le tableau (4) récapitule toutes les valeurs moyennes avant et après hémolyse pour les treize paramètres étudiés dans chaque série. Les biais sur les mesures, les $\text{CV}_H\%$ ainsi que les taux moyens d'hémoglobines sont mentionnés.

Les paramètres impactés par l'hémolyse de façon positive et significative sur le plan biologique (LDH, K^+ , ASAT, ALAT, CHOL, TRIG) : (Figure 7)

Lactate déshydrogénase (LDH)

Pour des valeurs LDH normales de moyenne : 194 ± 24 UI/L ($3,23 \pm 0,4$ $\mu\text{kat/L}$), l'impact de l'hémolyse est statistiquement positif et significatif sur l'ensemble de la gamme d'hémoglobine étudiée ; $P < 0.001$ pour la plupart des groupes. Le graphique des moyennes des $\text{CV}_H\%$ en fonction des moyennes d'hémoglobine montre une surestimation importante. La valeur seuil de l'hémolyse calculée par extrapolation sur la courbe est de 28 mg/dL d'hémoglobine, donc bien avant le seuil visuel de détection (figure : 7a). Les biais sur les mesures avant et après hémolyse sont importants : de 330 UI/L pour l'indice

180 mg/dL jusqu'à 950 UI/L pour l'indice 810 mg/dL (tableau 4). La corrélation parfaite entre le $\text{CV}_H\%$ et l'hémoglobine avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.9389$ justifie la détermination de l'indice d'hémolyse acceptable (IHa) par calcul, à partir de l'équation du tracé de régression linéaire, supposant que l'interférence est biologiquement inacceptable si le $\text{CV}_H\%$ se trouve hors intervalle de confiance $\pm \text{TCL}$. Le $\text{TCL}_{LDH} = 17.2\%$ ce qui donne un index expérimental (IHa) de 28 mg/dL (figure 4a).

Le potassium (K^+) :

Pour des valeurs de K^+ normales de moyenne : $4,1 \pm 0,37$ mmol/L, l'hémolyse interfère évidemment de façon positive et importante même à des faibles concentrations d'hémoglobine ($P < 0,001$ tout au long de la plage étudiée). Un impact positif important de l'hémolyse est observé sur le graphique des moyennes des $\text{CV}_H\%$ en fonction des moyennes des [HGB] avec une valeur seuil d'hémolyse qui correspond à 35 mg/dL (figure : 7b). La corrélation est parfaite entre le $\text{CV}_H\%$ et la [HGB] ; $R^2 = 0.992$. L'indice d'hémolyse acceptable (IHa) pour le potassium a été calculé à partir de l'équation de régression linéaire de la même façon que pour la LDH. Le $\text{TCL}_K = 5\%$ d'où un index expérimental IHa soit l'équivalent de 40 mg/dL (figure 4b).

Aspartate amino transférase (ASAT)

L'hémolyse influence de façon positive sur la mesure de l'activité ASAT pour des valeurs normales de moyenne : $21 \pm 7,4$ UI/L ($0,35 \pm 0,12$ $\mu\text{kat/L}$). Statistiquement cette interférence est considérable dans toute la gamme de l'étude ; la P-value est $< 0,05$ pour tous les niveaux d'hémolyse étudiés de 190 mg/dL jusqu'à plus de 1100 mg/dL. Une hausse du $\text{CV}_H\%$ au-delà du TCL de l'ASAT à partir des taux d'hémoglobine de 30 mg/dL est observée (figure : 7c). La corrélation entre le $\text{CV}_H\%$ et l'hémoglobine est bonne ($R^2 = 0,8087$). L'indice d'hémolyse acceptable expérimental (IHa) calculé avec un TCL_{ASAT} de 17,7 % égal à 64 mg/dL (figure 4c).

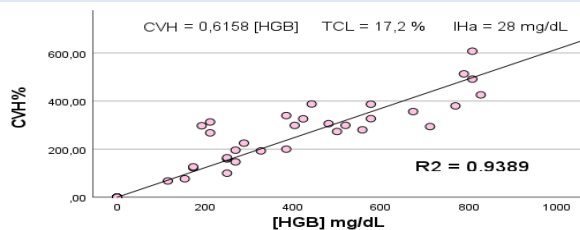


Figure 4a : Index de l'hémolyse acceptable calculé pour des valeurs LDH de moyenne = 194 $\pm$ 24 UI/L

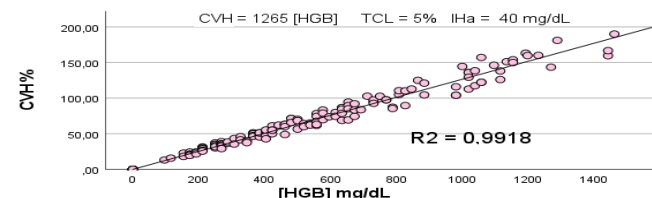


Figure 4b : Index de l'hémolyse acceptable calculé pour des valeurs de potassium de moyenne = 4,1 $\pm$ 0,37 mmol/L

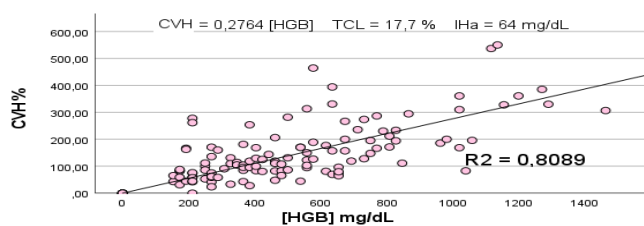
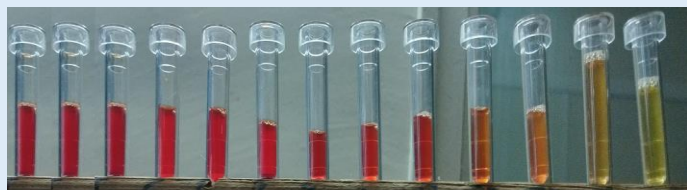


Figure 4c : Index de l'hémolyse acceptable calculé pour des valeurs ASAT de moyenne = 21 $\pm$ 7,4 UI/L

Figure 4 : les IHa pour la LDH, le potassium et l'ASAT sont calculés à partir des équations des tracées de régressions linéaires puis justifié par les bonnes corrélations observées

Pour la LDH, le K^+ et l'ASAT notre observation indique une influence de l'hémolyse positive et significative même à des taux d'hémoglobine difficilement visible à l'œil nu (figure 5).



0 : T. Avant hémolyse (*) : T. Réconstitué = l'IHa de la LDH (**) : T. Réconstitué = IHa de K

Figure 5 : Inspection visuelle de la gamme obtenue par agitation mécanique. (*) et (**) tubes reconstitués pour apprécier l'aspect visuelle des IHa de la LDH et du K

Alanine amino transférase (ALAT)

L'hémolyse a un effet positif sur la mesure de l'activité ALAT. Pour des valeurs normales de moyenne : 20,5 $\pm$ 11,8 UI/L (0,34 $\pm$ 0,20 μ kat/L), l'incidence de l'hémolyse sur l'activité ALAT est positive et significative sur le plan statistique à des concentrations d'hémoglobine > 820 mg/dL ; P = 0,014 pour l'index 820 puis < 0,001.

L'augmentation de l'activité ALAT a dépassé la fourchette de confiance $\pm$ TCL_{ALAT} ou $\pm$ 18,9 % à partir d'une valeur seuil de 800 mg/dL d'hémoglobine (figure : 7d).

Le cholestérol (CHOL)

D'un point de vue statistique et pour des valeurs de cholestérol normales de moyenne : 1,60 $\pm$ 0,31 g/L (4,14 $\pm$ 0,8 mmol/L), une interférence positive et significative de l'hémolyse est observée aux concentrations d'hémoglobine supérieur à 1140 mg/dL ; P < 0,001 à partir de 1140 mg/dL. Le graphique des moyennes des CV_H% en fonction de la [HGB] signifie que ces interférences sont biologiquement inacceptables à partir de cette valeur ; Le CV_H% excède le TCL_{CHOL} soit supérieur à 9 % lorsque la concentration d'hémoglobine est au-delà de 1140 mg/dL (figure : 7e).

Les triglycérides (TRIG)

La mesure des triglycérides est perturbée positivement par l'hémolyse. Pour des valeurs de triglycérides normales de moyenne : 0,93 $\pm$ 0,31 g/L (1,05 $\pm$ 0,35 mmol/L), une interférence de l'hémolyse statistiquement positive et significative est observée lorsque les concentrations d'hémoglobine dépassent 1000 mg/dL ; P = 0,034 pour l'index 1000 et devient par la suite < 0,001. Cette interférence est biologiquement inacceptable en cas d'hémolyse intense ; le coefficient de variation relatif à l'interférence de l'hémolyse (CV_H%) demeure à l'intérieur de l'intervalle de confiance $\pm$ TCL_{TRIG} ou entre -15% et +15% jusqu'à des taux d'hémoglobine supérieurs à 1050 mg/dL (Figure : 7f).

Les paramètres impactés par l'hémolyse de façon positive mais non significative sur le plan biologique (CREA) :

Aucun impact significatif de l'hémolyse n'est observé pour des valeurs de créatinine normales de moyenne : 7,5 $\pm$ 1,6 mg/L (66,0 $\pm$ 14,0 μ mol/L) ; les P sont > 0,05 et Les CV_H% restent dans l'intervalle de confiance $\pm$ TCL_{créa} soit entre - 12,8% et + 12,8% jusqu'au niveau d'hémoglobine excédant les 1100 mg/dL (Figure 6).

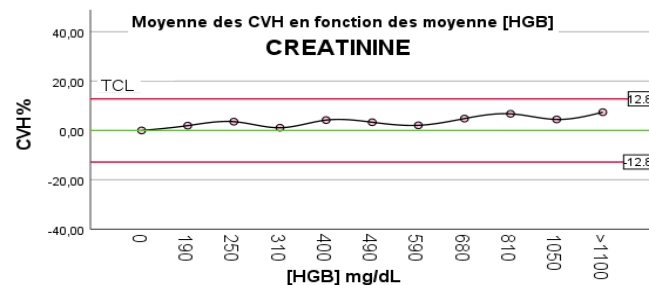


Figure 6 : Le tracé des CV_H% de la créatinine en fonction des [HGB] montre des surestimations cliniquement acceptables, pour des valeurs de créatinine normales sur une plage de 0 à 1100 mg/dL.

Les paramètres impactés par l'hémolyse de façon négative et significative sur le plan biologique (Na⁺, LIP) (figure 8) :

Tableau 3 : Test ANOVA 1 FACTEUR post hoc pour les treize paramètres étudiés, des tests d’homogénéité et de normalité sont effectués en parallèle. Pour certains groupes qui n’ont pas respecté les conditions de normalité ce test est remplacé par le test de kruskal-Wallis, l’équivalent non paramétrique de L’ANOVA.

LDH	+	[HGB] mg/dL	P	K ⁺	+	[HGB] mg/dL	P	ASAT	+	[HGB] mg/dL	P
		180	<0,001*			180	<0,001*			190	0,010*
		250	0,038*			250	<0,001*			250	0,010*
		280	0,002*			310	<0,001*			290	0,045*
		370	<0,001*			400	<0,001*			380	0,012*
		420	<0,001*			490	<0,001*			530	0,002*
		500	<0,001*			590	<0,001*			620	0,001*
		570	<0,001*			690	<0,001*			700	<0,001*
		720	<0,001*			820	<0,001*			860	<0,001*
		810	<0,001*			1030	<0,001*			>1100	<0,001*
ALAT	+	[HGB] mg/dL	P	CHOL	+	[HGB] mg/dL	P	TRIG	+	[HGB] mg/dL	P
		180	1,000			180	1,000			170	1,000
		260	0,983			250	0,052			250	0,996
		350	0,288			310	1,000			320	0,119
		430	0,766			400	0,985			400	0,429
		520	0,407			460	0,996			460	0,128
		610	0,647			570	0,318			540	0,584
		690	0,370			670	0,632			640	0,656
		820	0,014*			1000	0,237			750	0,447
		1000	<0,001*			1140	<0,001*			1000	0,034*
		>1100	<0,001*			>1200	<0,001*			>1100	<0,001*
CREA	+	[HGB] mg/dL	P	Na ⁺	-	[HGB] mg/dL	P	LIP	-	[HGB] mg/dL	P
		190	0,999			190	1,000			140	1,000
		250	0,997			250	1,000			200	1,000
		310	1,000			310	0,391			250	0,988
		400	0,915			400	0,234			320	0,902
		490	0,972			470	0,174			420	0,998
		590	0,999			560	0,038*			480	0,999
		680	0,868			670	<0,001*			680	0,698
		810	0,278			790	<0,001*			790	0,575
		1050	0,862			980	<0,001*			1030	0,999
		>1100	0,183			>1100	<0,001*			>1230	<0,001*
GLU	-	[HGB] mg/dL	P	BILIT	-	[HGB] mg/dL	P	GGT	-	[HGB] mg/dL	P
		170	1,000			190	0,870			150	0,936
		220	1,000			250	0,973			220	0,666
		290	1,000			320	0,994			290	0,999
		380	1,000			410	1,000			360	0,816
		450	1,000			500	0,890			400	0,484
		550	1,000			610	1,000			460	0,778
		650	1,000			700	0,606			530	0,369
		800	0,953			830	0,369			630	0,996
		1030	0,926			1040	0,189			670	0,710
		>1100	0,619			>1100	0,275			800	0,972
PAL	-	[HGB] mg/dL	P								
		190	0,897								
		250	0,680								
		360	0,999								
		410	0,839								
		470	0,976								
		560	1,000								
		700	1,000								
		820	1,000								
		1000	0,999								
		>1100	0,999								

Légendes :

Sous-estimation : la différence moyenne CVH0-CVH est Négative

Surestimation : la différence moyenne CVH0-CVH est positive

*

La différence moyenne est significative au niveau de 0.05

Tableau 4 : les résultats obtenus pour chaque degré d'hémolyse provoquée : les taux avant et après hémolyse, les biais sur les mesures et les coefficients de variation liée à l'interférence de l'hémolyse. Les coefficients hors intervalle de confiance $\pm$ TCL sont mentionnés en rouge.

LDH_av	LDH_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL	K_av	K_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL	ASAT_av	ASAT_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL
Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)				
189	519	330	181,69	180	4,01	4,96	0,94	23,70	180	18,05	31,84	13,79	90,33	190
184	443	258	141,19	250	3,90	5,20	1,30	33,51	250	16,25	30,50	14,25	87,61	250
178	560	382	189,32	280	4,04	5,64	1,60	40,01	310	21,93	38,67	16,73	85,00	290
212	728	516	244,16	370	4,12	6,22	2,10	51,35	400	19,60	40,67	21,07	113,67	380
176	772	596	337,57	420	4,04	6,59	2,55	63,53	490	22,07	48,07	26,00	137,45	530
204	804	600	292,83	500	4,14	7,22	3,08	74,93	590	24,08	58,08	34,00	177,23	620
218	941	723	331,41	570	4,08	7,64	3,57	88,32	690	17,71	51,71	34,00	197,15	700
209	923	715	343,39	720	4,13	8,38	4,25	103,78	820	19,88	62,50	42,63	216,76	860
187	1138	951	509,46	810	4,24	9,57	5,34	127,57	1030	29,11	123,44	94,33	341,79	>1100
					4,14	10,62	6,48	157,15	>1100					

ALAT_av	ALAT_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL	CHOL_av	CHOL_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL	TG_av	TG_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL
Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)				
22	23	1	7,78	180	1,69	1,69	0,00	-0,01	180	0,85	0,86	0,01	1,30	170
19	21	1	6,82	260	1,03	1,06	0,04	3,39	250	0,71	0,74	0,03	5,96	250
16	18	2	10,16	350	1,60	1,61	0,01	0,77	310	0,95	0,97	0,02	3,89	320
18	19	1	10,01	430	1,53	1,55	0,02	1,76	400	0,73	0,79	0,06	9,44	400
22	24	2	9,41	520	1,75	1,77	0,02	1,41	460	0,81	0,83	0,02	5,62	460
17	19	2	11,81	610	1,63	1,68	0,04	3,02	570	0,89	0,95	0,06	7,58	540
14	16	2	13,83	690	1,45	1,49	0,04	2,98	670	0,97	1,03	0,05	7,20	640
20	22	2	20,94	820	1,71	1,78	0,06	3,73	1000	1,02	1,10	0,07	7,89	750
18	21	4	22,20	1000	1,55	1,69	0,14	9,17	1140	1,04	1,15	0,12	12,46	1000
28	33	6	26,53	>1100	1,54	1,75	0,21	13,95	>1200	0,99	1,23	0,24	22,19	>1100

Na_av	Na_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL	LIPASE_av	LIPASE_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL	Crea_av	Crea_ap	Le biale	CVH %	[HGB] mg/dL
Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)				
138	135	-2	-1,75	190	19	19	0	-0,48	140	6,76	6,88	0,12	1,96	190
137	135	-2	-1,64	250	36	36	0	-2,52	200	6,75	7,00	0,25	3,57	250
139	136	-3	-1,97	310	32	35	3	5,63	250	6,83	6,89	0,06	1,11	310
139	136	-3	-2,41	400	30	29	-1	-5,24	320	7,10	7,40	0,30	4,21	400
138	135	-3	-2,31	470	17	16	-1	-4,29	420	7,77	8,00	0,23	3,33	490
139	136	-4	-2,60	560	33	32	-1	-3,55	480	7,21	7,36	0,14	2,08	590
139	133	-6	-4,07	670	24	22	-2	-8,24	680	7,25	7,63	0,38	4,82	680
140	134	-6	-4,19	790	30	28	-2	-8,00	790	7,15	7,62	0,46	6,75	810
140	133	-7	-5,16	980	37	35	-2	-4,57	1030	8,45	8,82	0,36	4,47	1050
140	129	-11	-8,08	>1100	29	19	-10	-42,05	>1230	7,25	7,75	0,50	7,41	>1100

Glu_av	Glu_ap	Le biale	CVH %	HGB mg/dL	BiliT_av	BiliT_ap	Le biale	CVH %	HGB mg/dL	GGT_av	GGT_ap	Le biale	CVH %	HGB mg/dL
Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)					Groupe théorique (etat avant hémolyse)				
0,92	0,93	0,02	1,58	170	4	4	0	-6,33	190	21,67	20,00	-1,67	-9,58	150
0,83	0,84	0,01	0,88	220	6	5	-1	-7,14	250	19,50	17,50	-2,00	-10,39	220
0,81	0,81	0,01	0,79	290	7	6	0	-3,89	320	21,40	20,70	-0,70	-3,68	290
0,81	0,81	0,00	-0,59	380	5	5	0	-3,23	410	20,17	18,33	-1,83	-9,08	360
0,90	0,89	0,00	-0,46	450	7	6	0	-6,14	500	21,33	19,00	-2,33	-11,80	400
0,92	0,90	-0,01	-1,30	550	5	4	0	-2,57	610	19,00	17,43	-1,57	-9,02	460
0,82	0,83	0,01	0,64	650	6	6	-1	-8,62	700	26,25	23,13	-3,13	-11,70	530
0,90	0,87	-0,02	-2,35	800	5	4	-1	-10,08	830	34,22	32,33	-1,89	-4,52	630
0,89	0,90	0,00	-0,03	1030	7	6	-1	-11,09	1040	31,00	26,67	-4,33	-12,80	670
1,01	0,95	-0,06	-5,98	>1100	4	4	-1	-10,76	>1100	23,11	21,11	-2,00	-5,90	800

PAL_av	PAL_ap	Le biale	CVH %	HGB mg/dL	PARAMTERS	UNITE	La moyenne av	La moyenne ap
Groupe théorique (etat avant hémolyse)					LDH		194 $\pm$ 24 UI/L	595,21 $\pm$ 343,88 UI/L
81	78	-3	-4,27	190	ASAT		21 $\pm$ 7,4 UI/L	49,11 $\pm$ 27,60 UI/L
93	86	-7	-8,62	250	ALAT	UI/L	20,5 $\pm$ 11,8 UI/L	22 $\pm$ 11,59 UI/L
67	65	-2	-2,69	360	PAL		80 $\pm$ 24 UI/L	78,88 $\pm$ 25,8 UI/L
76	71	-5	-6,26	410	GGT		26 $\pm$ 12,5 UI/L	24,21 $\pm$ 12,31 UI/L
67	64	-3	-3,96	470	LIP		32 $\pm$ 18 UI/L	30,3 $\pm$ 17,3 UI/L
83	83	0	-1,09	560	K	mmol/L	4,1 $\pm$ 0,37 mmol/L	6,96 $\pm$ 1,90 UI/L
83	80	-2	-2,45	700	Na		139 $\pm$ 2 mmol/L	134,78 $\pm$ 3,55 UI/L
70	68	-2	-1,54	820	Crea	mg/L	7,5 $\pm$ 1,6 mg/L	7,69 $\pm$ 1,66 UI/L
81	83	2	3,21	1000	BILIT		5,7 $\pm$ 2,3 mg/L	5,33 $\pm$ 2,3 UI/L
92	85	-7	-8,26	>1100	GLU	g/L	0,89 $\pm$ 0,11 g/L	0,88 $\pm$ 0,10 UI/L
					CHOL	g/L	1,60 $\pm$ 0,31 g/L	1,64 $\pm$ 0,31 UI/L
					TRIGLYCERIDES		0,93 $\pm$ 0,31 g/L	0,99 $\pm$ 0,33 UI/L

Légendes:

av: mesue avant hémolyse

ap: mesure après hémolyse

CVH: Coefficient de variation lié a l'interférence

HGB: Concentration de l'hémoglobine

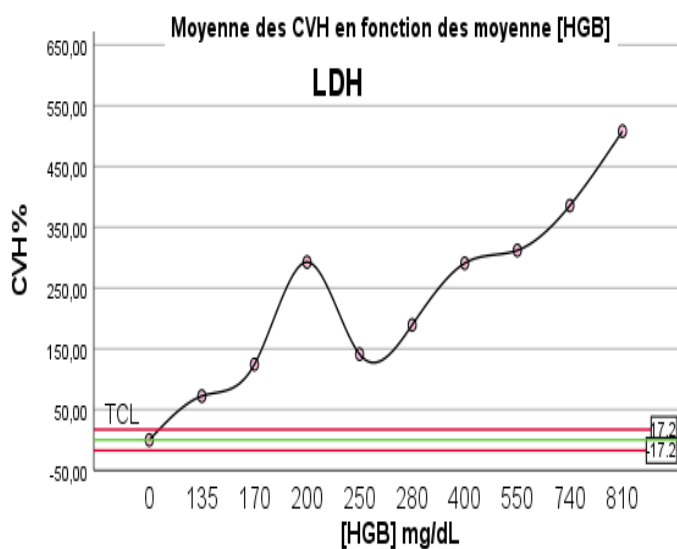


Figure: 7a

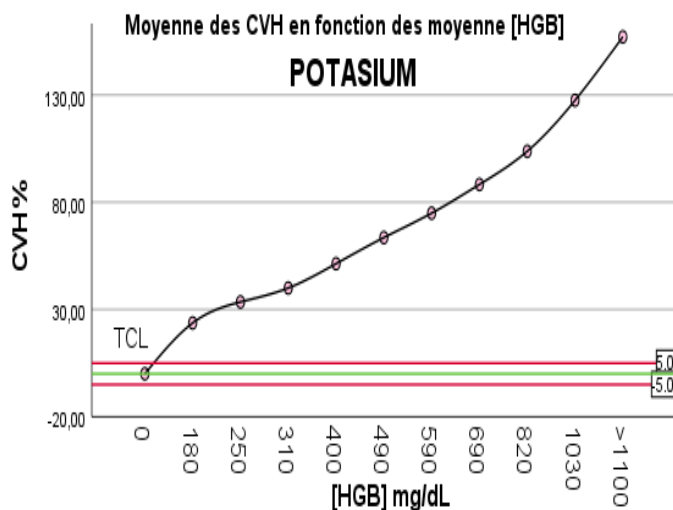


Figure: 7b

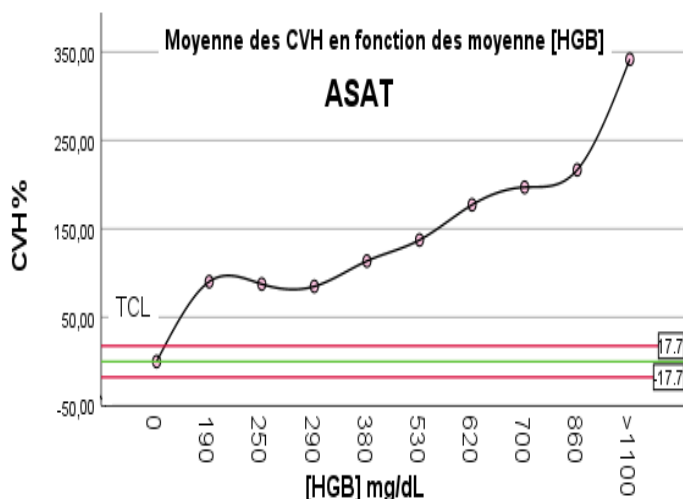


Figure: 7c

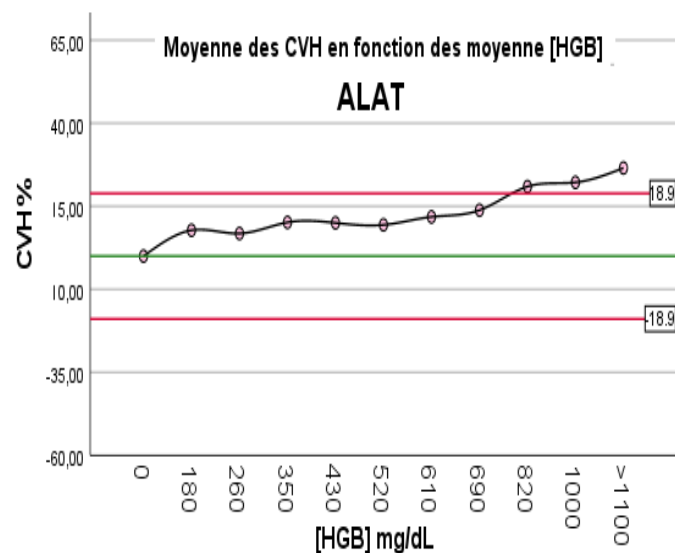


Figure: 7d

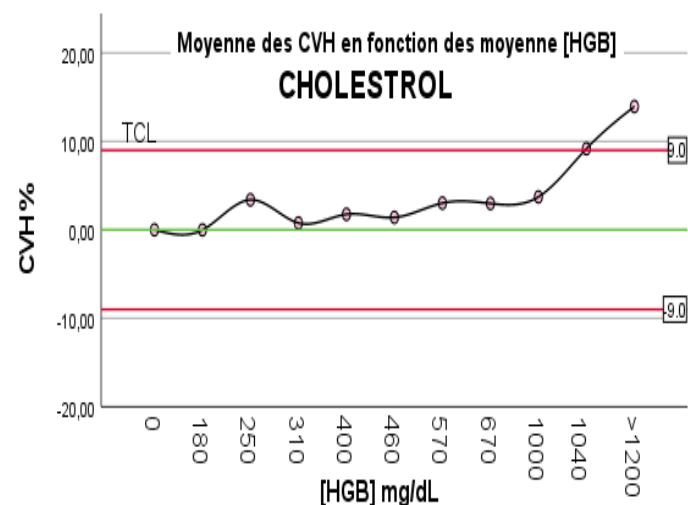


Figure: 7e

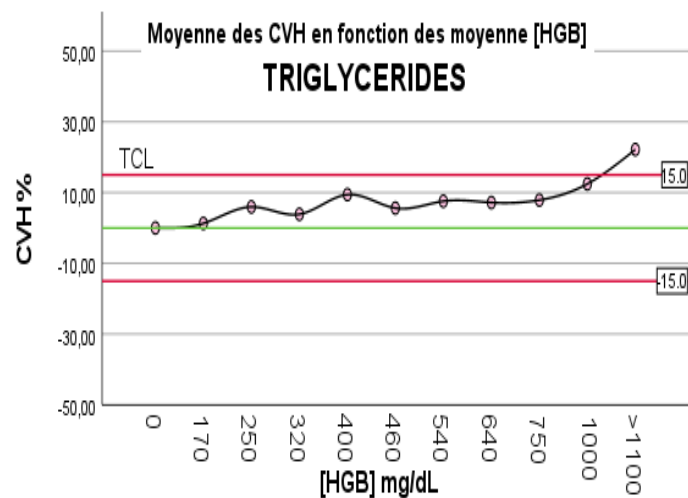


Figure: 7f

Figure 7 : Moyenne des CV_H % en fonction des moyennes [HGB] pour les paramètres impactés par l'hémolyse de façon positive et significative sur le plan biologique (LDH, K⁺, ASAT, ALAT, CHOL, TRIG). L'indice de l'hémolyse qui correspond à |CV_H| = |TCL| représente l'index dont l'interférence est biologiquement inacceptable. Celui-ci est calculé par extrapolation sur la courbe.

Le sodium (Na^+)

Des sous-estimations statistiquement significatives sont observées pour des valeurs de sodium normales de moyenne : 139 ± 2 mmol/L à partir de 560 mg/dL d'hémoglobine ; $P = 0,038$ pour l'indice 560 ensuite devient $< 0,001$. Sur le plan biologique, le $\text{CV}_H\%$ est en dessous du TCL_{Na} ce qui correspond à moins de 3,1 % dans le cas des concentrations d'hémoglobine supérieures à 600 mg/dL. (**Figure : 8a**). Le biais décroît de -2 jusqu'à -11 mmol/L de façon inversement proportionnelle à la concentration de l'hémoglobine.

Lipase (LIP)

Pour des valeurs de lipase normales de moyenne : 32 ± 18 U/L ($0,53 \pm 0,3$ $\mu\text{kat/L}$), l'interférence de l'hémolyse est statistiquement négative et significative à partir d'un indice d'hémoglobine de 1230 mg/dL ($P < 0,001$). Le biais a diminué de façon remarquable : de -2 pour l'index : 1030 mg/dL à -10 UI/L pour des index > 1230 mg/dL. Le graphique des moyennes des CV_H en fonction des moyennes de la [HGB] présente des sous-estimations biologiquement inacceptables, fondées sur une valeur de plus de 1160 mg/dL d'hémoglobine (**Figure : 8b**).

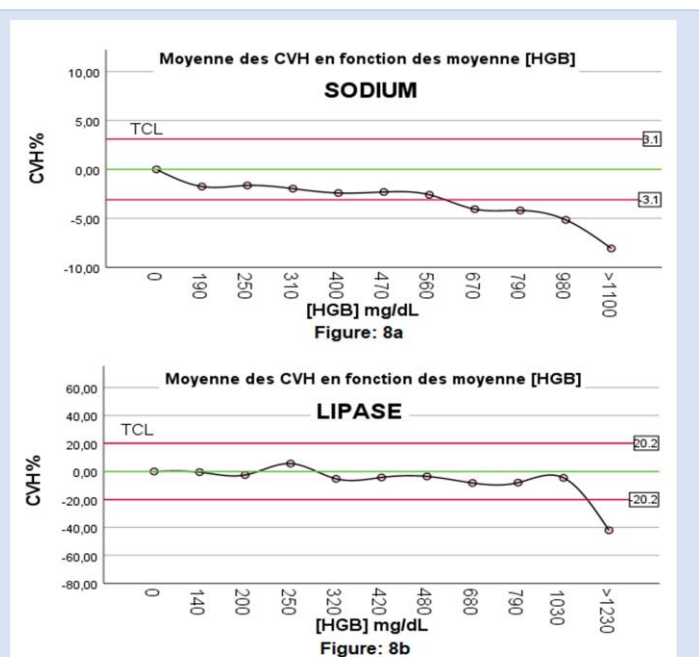


Figure 8 : Moyenne des $\text{CV}_H\%$ en fonction des moyennes des [HGB] pour les paramètres impactés par l'hémolyse de façon négative et significative sur le plan biologique (Na^+ , LIP).

Les paramètres impactés par l'hémolyse de façon négative mais non significative sur le plan biologique (BILIT, PAL, GGT, GLU) (figure 9).

Le glucose (GLU)

L'hémolyse influe négativement sur des taux normaux de glucose. Les valeurs étudiées de $0,89 \pm 0,11$ g/L ($4,93 \pm 0,6$ mmol/L) font l'objet des sous-estimations statistiquement non significatives ; $P = 1,000$ toute au long de la gamme

étudiée. Les biais sur les mesures avant et après hémolyse sont presque nuls (**Tableau 4**). L'interférence de l'hémolyse sur la détermination du glucose est par conséquent acceptable d'un point de vue biologique sur la totalité de la plage d'hémoglobine étudiée, même à des taux d'hémoglobine très élevée. Les $\text{CV}_H\%$ sont dans l'intervalle de confiance $\pm \text{TCL}_{\text{GLU}}$ ou entre $\pm 7\%$ jusqu'à plus de 1100 mg/dL d'hémoglobine (**Figure 9a**).

La bilirubine total (BiliT)

L'hémolyse influence la mesure de la bilirubine totale de façon négative. Sur le plan biologique cette interférence est acceptable ; le $\text{TCL}_{\text{BILIT}} = 19,6\%$ avec des $\text{CV}_H\%$ dans la fourchette de confiance $\pm 19,6\%$ (**Figure : 9b**). Les sous-estimations signalées pour des valeurs normales de moyenne : $5,7 \pm 2,3$ mg/L ($9,8 \pm 4$ $\mu\text{mol/L}$) sont statistiquement non significatives. Le biais est compris entre 0 et -1 mg/L, ce qui n'est pas significatif sur le plan clinique. (**Tableau 4**).

Gamma glutamyl transférase (GGT)

Des sous-estimations déclarées statistiquement insignifiantes et biologiquement acceptables pour des valeurs GGT normales de moyenne : $26 \pm 12,5$ UI/L ($0,43 \pm 0,2$ $\mu\text{kat/L}$). Les $\text{CV}_H\%$ sont dans l'intervalle $\pm \text{TCL}_{\text{GGT}}$ C'est-à-dire entre -18% et +18% (**Figure : 9c**). Le biais est compris entre -0,7 et -4,33 UI/L, ce qui est cliniquement acceptable (**Tableau 4**).

Phosphatase alcaline (PAL)

L'hémolyse a une incidence moindre sur la mesure de l'activité PAL. Les sous-estimations observées pour des valeurs normales de moyenne : 80 ± 24 UI/L ($1,34 \pm 0,42$ $\mu\text{kat/L}$) restent non significatives jusqu'à plus de 1100 mg/dL d'hémoglobine. Biologiquement cette interférence est acceptable avec des CV_H dans la plage de confiance $\pm \text{TCL}_{\text{PAL}}$ ou $\pm 16,9\%$ et un biais entre 0 et -7 UI/L (**Figure : 9d, Tableau 4**).

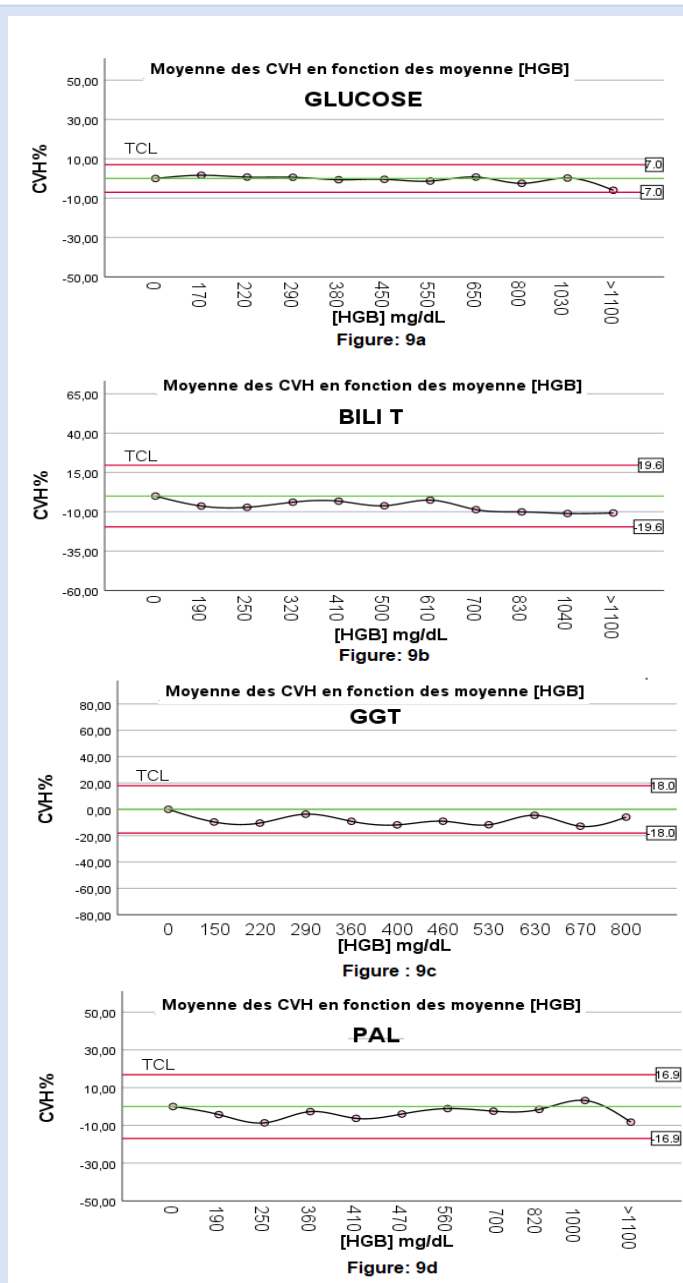


Figure 9 : Moyenne des CVH % en fonction des moyennes des [HGB] pour les paramètres impactés par l'hémolyse de façon négative mais non significative sur le plan biologique (BILIT, PAL, GGT, GLU).

Discussion :

Notre étude a montré que la LDH, le potassium et l'ASAT sont les plus impactés par l'hémolyse et de façon positive et significative du point de vue biologique, du fait de la prédominance de la LDH et du potassium dans les érythrocytes et de la libération du NAD^+/NADH , H^+ globulaire qui explique l'interférence chimique de l'hémolyse sur la détermination de l'activité ASAT dosé par la méthode enzymatique recommandée par l'IFCC, les indices d'hémolyses acceptables calculés pour des valeurs normales de ces trois paramètres sont presque non détectables par inspection visuelle : 28 mg/dL pour la LDH, 40 mg/dL pour le K^+ et 64 mg/dL pour l'ASAT, ce

résultat est concordant avec celui de Koseoglu M et coll [19] et débauche dans le même sens que celui de N Rousseau et coll qui ont trouvé les indices suivants : LDH (14 mg/dL), K^+ (67 mg/dL) ASAT (87 mg/dL) [20]. Dans le cas de K^+ , ce résultat est également conforme à celui d'autres études [2,8 21-24].

L'activité ALAT est moins affectée par l'hémolyse par rapport à l'activité ASAT. Nous avons relevé une interférence de l'hémolyse positive et significative sur la mesure de l'activité ALAT à partir de : 800 mg/dL jusqu'à 1100 mg/dL d'hémoglobine. Ali D et coll [11] ont montré que l'hémolyse influe positivement et significativement sur la mesure de l'activité ALAT pour une valeur normale à des niveaux d'hémoglobine supérieurs à 800 mg/dL, puis négativement depuis 1210 mg/dL d'hémoglobine que nous n'avons pas atteint lors de notre expérience.

Dans une moindre mesure, l'hémolyse a une incidence positive sur la mesure des triglycérides et du cholestérol, en effet la détermination de ces deux paramètres est basée sur la réaction finale de Trinder qui est fortement influencée par les propriétés chromogéniques et peroxydasiques de l'hémoglobine. Notre expérience a montré des surestimations significatives pour des valeurs de cholestérol et des triglycérides normaux à partir de 1050 mg/dL d'hémoglobine pour les TRIG et 1140 mg/dL pour le CHOL. Ali D et coll ont confirmé que plus la valeur de cholestérol est basse, plus l'interférence apparaît pour des seuils faibles d'hémoglobine et l'inverse est juste : ils ont testé deux valeurs de cholestérol inférieures à notre moyenne et ils ont trouvé les résultats suivants : 810 mg/dL pour une valeur de 3,7 mmol/L et 320 mg/dL pour une valeur de 2,17 mmol/L. Le contraire pour les triglycérides, ils ont trouvé un indice de 650 mg/dL tandis que notre observation pour celui-ci a indiqué un indice d'hémolyse biologiquement acceptable qui dépasse 1050 mg/dL d'hémoglobine.

Notre étude a révélé qu'aucune influence cliniquement significative n'est observée pour des valeurs normales de créatinine mesurées par la cinétique de Jaffé, ce résultat est non cohérent avec celui de Ali D et coll, alors que certains auteurs [1,25] ont montrés que l'hémoglobine influe positivement sur le dosage enzymatique de la créatinine sans pour autant agir sur la méthode colorimétrique de Jaffé. Notre observation concernant la créatinine est également en accord avec celle de S. Ben Mohammed et Coll [26] et de L. Benchekroun et coll [8].

Nous avons aussi constaté une interférence négative et significative avec des valeurs normales de sodium et de la lipase à partir de : 600 mg/dL pour le sodium et 1160 mg/dL pour la lipase. Ali D et coll ont déclaré une interférence négative pour des valeurs normales de la lipase provenant d'une concentration d'hémoglobine supérieure à 1370 mg/dL. L'hémolyse est connue pour interférer négativement sur la mesure de sodium par l'effet de dilution, car la concentration intra-érythrocytaire est nettement plus faible que la concentration sérique ou

plasmatique [27, 28], l'étude de Delgado JA et coll [29] a confirmé cet effet négatif de l'hémolyse sur la mesure du sodium ; la Valeur seuil obtenue pour une concentration en sodium de 140 mmol/L lors de cette dernière étude, au moyen d'une stratégie semblable à notre protocole basé sur la provocation de l'hémolyse par congélation sans ajout d'hémolysât, était de 930 mg/dL pour un intervalle de confiance de 3%.

Notre expérience a également mis en évidence une influence négative cliniquement acceptable de l'hémolyse sur la détermination du glucose, de la bilirubine totale, de la GGT et de la PAL, résultat cohérent avec celui de Fremont et Coll [22] pour la bilirubine totale, et avec celui de L. Benckroun et coll [8] pour la GGT. Une autre étude de JAY et Coll [23] a aussi confirmé cet effet négatif de l'hémolyse sur la détermination de l'activité PAL et GGT.

Les données des fabricants sont encore inadéquates et difficilement interprétables (**Tableau 5**) ; selon notre expérience l'étude de l'interférence de l'hémolyse est recommandée sur des taux d'hémoglobine allant de 0 à plus de 1000 mg/dL et non pas sur des points précis comme indiquent les fabricants, il n'y a pas de consensus chez ces derniers sur le mode d'obtention de l'interfèrent (hémolysât/ surcharge en hémoglobine) ou sur le choix des longueurs d'onde pour estimer l'index de l'hémolyse (mono, bi ou multi chromatisme) ainsi que sur l'algorithme de calcul de l'indice et sur le mode d'expression de l'importance de l'hémolyse, les fabricants devraient donc préciser comment le niveau d'hémolyse est déterminé et comment les indices et les intervalles de confiance sont traduits. [6]. Dans notre expérience nous avons adapté une technique de détermination quantitative de l'hémoglobine facile à effectuer, non toxique, et moins cher (AHD-575) qui peut remplacer les algorithmes et les mesures spectrales moins fiables pour évaluer l'indice de l'hémolyse.

Tableau 5 : les données des fabricants

PARAMETRES	[HGB] En mg/dL	N	CIBLE	% DE VARITION
K	125/250	4	4,7 mmol/L	108,9/117,9
ASAT	62/125	4	64,5 U/L	105,7/111,6
ALAT	750/1000	4	47,4 UI/L	7,9 /11
BILIT	1000/2000	4	10,7 mg/l	5/1
	1000/2000	4	140,8 mg/l	0/0
CREA	1000/2000	4	14,0 g/l	5/9
GGT	250/500	4	47,5 UI/L	-8,4/-17,4
GLU	1000/2000	4	0,782 g/L	-4,41/-8,26
LIP	1000/2000	4	215,7 U/L	3,1/-0,9
PAL	750/1000	4	150 U/L	95,3/94,3
TRIG	750/1000	4	193,1 mg/dL	109,6/111,3
Na	1000/2000	4	108,3 mmol/L	102,1/104,5
CHOL	750/1000	4	241,1 mg/dL	109,5/111,9
LDH	Le fabricant annonce le rejet automatique des échantillons hémolysés car l'activité LDH est 150 fois plus importante dans les érythrocytes			

Malgré les difficultés de mise en œuvre de ce protocole de provocation mécanique de l'hémolyse, dues à l'existence de variations intra et interindividuel importantes, mais elle représente toujours l'une des stratégies qui simulent la réalité, en expliquant le rôle des mécanismes in vitro de lyse des hématies dans les perturbations affectant la mesure de la plupart des grandeurs cliniquement pertinente, ce protocole n'inclut pas de phase de dilution et de destruction totale des globules rouges comme dans le cas des stratégies basées sur l'ajout d'hémolysât, évitant ainsi la modification de ce lien entre l'indice de l'hémolyse et les concentrations de certains paramètres en particulier pour le sodium [29]. Les dis-concordances avec notre résultat concernant le sodium par rapport aux autres études utilisant la stratégie d'ajout d'hémolysât [30 - 32] sont expliqués par cet effet de dilution ou par le manque des globules rouges dans l'hémolysât. Outre les variations biologiques la principale limitation de notre étude réside dans la difficulté de maîtriser les manipulations (la quantité recueillie, la durée d'agitation, l'exclusion des échantillons qui ne satisfont pas aux critères d'inclusion...). Ce travail a échoué à couvrir quelques gammes intéressantes d'hémoglobine, le cas pour la LDH, le K et l'ASAT dont l'interférence est importante à faible taux d'hémoglobine alors que le degré d'hémolyse obtenus a dépassé 100 mg/dL, c'est pourquoi la comparaison des résultats est effectuée par rapport à une série théorique qui représente le zéro ou l'état avant l'hémolyse.

Conclusion :

Les laboratoires de biologie clinique ont pour principal objectif de rendre les résultats aussi fiables que possibles. L'impact de l'hémolyse sur les paramètres les plus cliniquement pertinents y compris les paramètres d'urgence et surtout la LDH, le potassium et l'ASAT et de façon moindre : le Na⁺, l'ALAT, les TRIG, le CHOL et la LIP, et avec en plus des données des fabricants insuffisantes, exigent les biologistes à mettre en place leurs propres indices expérimentaux d'hémolyse, pour mieux traiter et formuler des commentaires informatifs sur les résultats des échantillons hémolysés, dans le but d'aviser le clinicien et d'éviter ainsi le rejet inapproprié des échantillons hémolysés, et/ou la reprise de l'analyse à cause de l'hémolyse.

Bibliographie

1. Kroll M H, Elin R J. Interference with clinical laboratory analyses. Clin. Chem 1994 ; 40 : 1996 – 2005.
2. Kroll MH, Ruddel M, Blank DW, Elin RJ. A model for assessing interference. Clinical Chemistry [Internet]. 1 juill 1987 ;33(7) :1121-3. Disponible sur : <https://academic.oup.com/clinchem/article/33/7/1121/5653404>
3. Grafmeyer D, Bondon M, Manchon M, Levillain P. The Influence of Bilirubin, Haemolysis and Turbidity on 20 Analytical Tests Performed on Automatic Analysers. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [Internet]. 1995 ;33(1). Disponible sur : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm.1995.33.1.31/html>

4. 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. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [Internet]. 1 janv 2008 ;46(6). Disponible sur : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2008.170/html>
5. Howanitz PJ, Lehman CM, Jones BA, Meier FA, Horowitz GL. Practices for Identifying and Rejecting Hemolyzed Specimens Are Highly Variable in Clinical Laboratories. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* [Internet]. 1 août 2015 ;139(8) :1014-9. Disponible sur : <http://meridian.allenpress.com/aplm/article/139/8/1014/65608/Practices-for-Identifying-and-Rejecting-Hemolyzed>
6. Poupon C, Lefèvre G, Ngo-François S, Alibeu C, Barbé F, Bourbonneux V, et al. Hemolysis interferences on frequently required stat analysis : à French multicentric study. *Annales de biologie clinique* [Internet]. Nov 2015 ;73(6) :705-16. Disponible sur : <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/abc.2015.1090>
7. Lefevre G, Bousquet C. L'assurance de qualité en biologie : du prélèvement à l'interprétation du résultat. *XXXIe Dimanche biologique de l'arboisier* 1991 ; 49 – 64
8. Bencheikroun L, Rtabi, Guedira A, Soussi Tanani D, Abouqal G. Interférence de l'hémolyse sur la détermination des paramètres de biochimie clinique. *Maroc Médical*, tome 29 n°4, décembre 2007.
9. 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. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* [Internet]. 1 janv 2009 ;47(8). Disponible sur : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2009.218/html>
10. Zumoffen C, Gerrard G, Ensink A, D'Arrigo M. Hemolysis interference in routine clinical chemistry assays. *M154. Clin Chem Lab Med* 2008 ; 46 : S307.
11. Ali D, Sacchetto É, Dumontet E, Le Carrer D, Orsonneau JL, Delaroche O, et al. Hemolysis influence on twenty-two biochemical parameters measurement. *Annales de biologie clinique* [Internet]. Mai 2014 ;72(3) :297-311. Disponible sur : <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/abc.2014.0952>
12. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical Biochemistry* [Internet]. Avr 2012 ;45(6) :464-9. Disponible sur : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912012000197>
13. Vassault A, Grafmeyer D, de Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Biennu J. Analyses de biologie médicale : spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999 ; 57 : 685-95
14. C. Ricós, V. Alvarez, F. Cava, J. V. Current databases on biological variation : pros, cons and progress. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* [Internet]. Janv 1999 ;59(7) :491-500. Disponible sur : <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365519950185229>
15. Warnick GR, Myers GL, Cooper GR, Rifai N. Impact of the Third Cholesterol Report from the Adult Treatment Panel of the National Cholesterol Education Program on the Clinical Laboratory. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1 janv 2002 ;48(1) :11-7. Disponible sur : <https://academic.oup.com/clinchem/article/48/1/11/5641567>
16. ISO 5725-6. Accuracy (trueness and precision) of measurements methods and results Part 6 use in practice of accuracy values 1994.
17. Nishiyama K, Tsutamoto T, Yamaji M, Kawahara C, Fujii M, Yamamoto T, et al. Biological Variation of Brain Natriuretic Peptide and Cardiac Events in Stable Outpatients With Nonischemic Chronic Heart Failure. *Circ J* [Internet]. 2011 ;75(2) : 341-7. Disponible sur : http://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/75/2/75_CJ-10-0368/article
18. Van Eijkeren MA, Scholten PC, Christiaens GCML, Alsbach GPJ, Haspels AA. The alkaline hematin method for measuring menstrual blood loss — a modification and its clinical use in menorrhagia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* [Internet]. Sept 1986 [cité 19 juill 2022] ;22(5-6) :345-51.
19. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Çuhadar S. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. *Ataturk Training and Research Hospital, Department of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Izmir, Turkey. Biochemia Medica* 2011 ;21(1) :79–85
20. Rousseau N, Pige R, Cohen R, Pecquet M. What is the acceptable hemolysis index for the measurements of plasma potassium, LDH and AST ? *Annales de biologie clinique* [Internet]. Mai 2016 ;74(3) :323-8. Disponible sur : <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/abc.2016.1134>
21. Yücel D, Dalva K. Effect of in Vitro Hemolysis on 25 Common Biochemical Tests. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1 avr 1992 ;38(4) :575-7. Disponible sur : <https://academic.oup.com/clinchem/article/38/4/575/5650144>
22. Frémont S, Combe A, Mecrin M, Tronel H, Galland AV, Scholl CS, et al. Influence of visible interferences on biochemical assays realised on Au 5231, AU 5223 (Olympus) and CL 7200 (Shimadzu). *Annales de biologie clinique*. 1996 ;54 8-9 :309-20.
23. Jay DW, Provasek D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1 sept 1993 ;39(9) :1804-10. Disponible sur : <https://academic.oup.com/clinchem/article/39/9/1804/5647161>
24. Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1 nov 1978 ;24(11) :1966-70. Disponible sur : <https://doi.org/10.1093/clinchem/24.11.1966>
25. Weber JA, van Zanten AP. Interferences in current methods for measurements of creatinine. *Clinical Chemistry* [Internet]. 1 mai 1991 ;37(5) :695-700. Disponible sur : <https://academic.oup.com/clinchem/article/37/5/695/5649418>
26. Ben Mohammed S, Ben amor A, Najjar M F. Etude de l'interférence de l'hémolyse sur la détermination de 22 paramètres biochimiques courants. *Eurobiologiste* 2003 ; 263 : 13 – 22.

-
27. Lippi G, Fontana R, Avanzini P, Sandei F, Ippolito L. Influence of spurious hemolysis on blood gas analysis. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [Internet]. 1 août 2013 ;51(8) :1651-4. Disponible sur : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/cclm-2012-0802/html>
 28. Dimeski G. Interference Testing. *Clin Biochem Rev* [Internet]. Août 2008 ;29(Suppl 1) : S43-8. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2556582/>
 29. Delgado, J. A., Morell-Garcia, D., & Bauça, J. M. Études d'interférence hémolyse : le cas particulier de l'ion sodium. *L'EJFCC*. Mars 2019 ; 30(1), 25–34.
 30. Saldaña O. ÍM. Interferencia causada por hemólisis en la determinación de 25 constituyentes bioquímicos en el autoanalizador ADVIA 1800. *An Fac Med (Perú)* [Internet]. 2015 ; 377-84. Disponible sur : <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/11407/10307>
 31. 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. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [Internet]. 1 janv 2006 ;44(4). Disponible sur : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2006.067/html>
 32. Lippi G, Luca Salvagno G, Montagnana M, Brocco G, Cesare Guidi G. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [Internet]. 1 janv 2006 [cité 22 juill 2022] ;44(3). Disponible sur : <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/CCLM.2006.054/html>