

Vals-positieve paracetamolspiegels in icterisch serum: een casus

L. de Jong ^{a*}, T.F. Veneman ^b, T.H. Oude Munnink ^c,
D.G. Knapen ^b en M.J. Henstra ^a

^a Afdeling Klinische Farmacie, Ziekenhuisgroep Twente.

^b Afdeling Intensive Care, Ziekenhuisgroep Twente.

^c Afdeling Klinische Farmacie, Medisch Spectrum Twente.

* Thans: Apotheek/Klinische Farmacie, Martini Ziekenhuis, Groningen.

Correspondentie: l.dejong@mzh.nl.

Deze casus wordt tevens gepubliceerd in: de Jong L, Knapen DG, Oude Munnink TH, Henstra MJ, Veneman TF. False positive acetaminophen concentrations in icteric serum. *Pract Lab Med.* 2016 apr;4:38-40.

Geen belangenverstrengeling gemeld.

Citeer als: de Jong L, Veneman TF, Oude Munnink TH, Knapen DG, Henstra MJ. Vals-positieve paracetamolspiegels in icterisch serum: een casus. *Nederlands Platform voor Farmaceutisch Onderzoek.* 2016;1:a1608.

Kernpunten

- Verhoogde serumbilirubinespiegels kunnen het resultaat beïnvloeden van een enzymatisch-colorimetrische analyse van de paracetamolspiegel.
- Een bilirubinebepaling wordt aanbevolen wanneer de paracetamolspiegel wordt bepaald met een enzymatisch-colorimetrische methode.
- In icterisch serum – bij een bilirubineconcentratie boven de waarde waarbij interferentie optreedt, zoals vermeld in de productinformatie – zou een alternatieve methode moeten worden gebruikt om de gevonden paracetamolspiegel te bevestigen.

Inleiding

Het metabolisme van paracetamol in therapeutische doseringen vindt hoofdzakelijk in de lever plaats via glucuronide- en sulfaatconjugatie. Via een derde route (< 5%) wordt paracetamol omgezet door cytochroom P450 (vooral CYP2E1) waardoor het reactieve radicaal *N*-acetyl-*p*-benzochinonimine (NAPQI) wordt gevormd [1]. NAPQI wordt onschadelijk gemaakt door glutathion en na conjugatie met cysteïne en mercaptuurzuur uitgescheiden met de urine. Wanneer bij een overdosering van paracetamol de sulfatering- en glucuronidatieroutes verzadigd raken, wordt meer paracetamol omgezet via cytochroom P450 waardoor meer NAPQI wordt gevormd. Door de toename van NAPQI raakt de voorraad

ABSTRACT

False positive paracetamol concentrations in icteric serum: a case study

INTRODUCTION

Serum concentrations of paracetamol are measured to predict the risk of hepatotoxicity in cases of paracetamol overdose and to identify paracetamol use in patients with acute liver injury and no known cause. The paracetamol concentration determines if treatment with acetylcysteine, the antidote for paracetamol poisoning, is necessary.

DESCRIPTION

A 49-year-old woman was admitted to our hospital with a hepatic coma and a total serum bilirubin concentration of 442 $\mu\text{mol/L}$. The paracetamol concentration of 11.5 mg/L was measured with an enzymatic-colorimetric assay, and treatment with acetylcysteine was started. However, the paracetamol concentration did not decline but remained unchanged (11.5-12.3 mg/L) during a period of four consecutive days. In contrast, the paracetamol concentration measured by HPLC, a chromatographic technique, remained undetectable.

DISCUSSION

In the presented case, elevated bilirubin was the most likely candidate to interfere with paracetamol assay causing false positive results. Bilirubin has intense absorbance in the ultraviolet and visible regions of the electromagnetic spectrum and for that reason it causes interference in an enzymatic-colorimetric assay.

CONCLUSION

False positive paracetamol laboratory test results may be found in icteric serum, when enzymatic-colorimetric assays are used for determination of paracetamol concentrations. Questionable paracetamol results in icteric serum should be confirmed by a non-enzymatic method, by means of ultrafiltration of the serum, or by dilution studies.

glutathion uitgeput [2]. Dan kan NAPQI zich binden aan hepatocyten, waardoor levercelnecrose ontstaat [3]. Behandeling van een overdosering paracetamol met de glutathionprecursor acetylcysteïne kan hepatocellulaire schade voorkomen of minimaliseren [4].

Paracetamolspiegels worden routinematig bepaald bij een vermoeden op een overdosering paracetamol en bij patiënten met een acute leverbeschadiging waarvan

Tabel 1 Concentraties bilirubine en paracetamol

Analysemethode	Test	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5
	bilirubine totaal ($\mu\text{mol/L}$)	357	380	354	388	429
Cobas 6000	paracetamol (mg/L)	11,5	12,3	11,6	12,2	13,0
Architect C8000	paracetamol (mg/L)	-	-	-	7,5	-
HPLC	paracetamol (mg/L)	-	-	-	< 1,0	-

de oorzaak onduidelijk is [5]. Bij een volwassene met een acute paracetamolintoxicatie kan met de paracetamolspiegel en het vermoedelijke innametijdstip de potentiële hepatotoxiciteit worden bepaald door gebruik te maken van het Rumack-Matthew-nomogram [6]. Aan de hand van de gemeten paracetamolspiegel wordt bepaald of behandeling met acetylcysteïne noodzakelijk is. Bij patiënten met acuut leverfalen kan aan de hand van de paracetamolspiegel een paracetamolintoxicatie als mogelijke oorzaak van leverfalen worden uitgesloten.

Chromatografische technieken, immunoassays en spectrofotometrische technieken worden in Nederland gebruikt voor het bepalen van een paracetamolspiegel. Chromatografische methoden, zoals hogedrukvlloeistofchromatografie (HPLC), zijn bewezen betrouwbaar en nauwkeurig voor de bioanalyse van paracetamol [7]. Een nadeel van deze methoden is de lange analysetijd. Naast chromatografische methoden zijn er verschillende soorten immunoassays waarmee de paracetamolspiegel kan worden bepaald. In de praktijk wordt echter de enzymatisch-colorimetrische methode het meest gebruikt. Dit is een spectrofotometrische techniek die onder andere de Cobas (Roche) en de Architect (Abbott) gebruiken voor het bepalen van een paracetamolspiegel.

Casus

Een 49-jarige vrouw werd in comateuze toestand binnengebracht op de spoedeisende hulp en opgenomen op de intensive care van ons ziekenhuis. Heteroanamnestisch bleek patiënte al vier dagen niet aanspreekbaar op bed te hebben gelegen. Haar voorgeschiedenis was behoudens alcoholmisbruik negatief. Lichamelijk onderzoek toonde een EMV-score van 1-1-1, de bloeddruk bedroeg 75/55 mmHg, de pols was 92/min en de lichaamstemperatuur was 35,8°C. Opvallend waren de ernstige icterus en de versterkte vaattekening van de buikwand.

Aanvullend onderzoek, waaronder laboratoriumonderzoek, toonde leverproefstoornissen waarbij patiënte een hepatisch coma had ontwikkeld (ammoniak 81 $\mu\text{mol/L}$; referentie 10-45 $\mu\text{mol/L}$). De verminderde leverfunctie werd gekenmerkt door een verlengde protrombintijd (30,7 s; referentie 11-14 s), verhoogd lactaatgehalte (3,9 mmol/L; referentie 0,5-1,7 mmol/L) en verlaagd albuminegehalte (15 g/L; referentie 29-49 g/L). Ook de verhoogde totale bilirubineconcentratie (442 $\mu\text{mol/L}$;

referentie < 17 $\mu\text{mol/L}$) was een teken van leverschade. Daarnaast bleek sprake van een acute nierfunctiestoornis met serumcreatinine 562 $\mu\text{mol/L}$ (referentie 45-80 $\mu\text{mol/L}$), waarschijnlijk prerenaal als gevolg van dehydratie en/of als onderdeel van het hepatorenaal syndroom.

Tevens was er aanvankelijk sprake van een verdenking van een paracetamolintoxicatie die dagen eerder zou hebben plaatsgevonden. Er werd een paracetamolspiegel van 11,5 mg/L gemeten op de Cobas 6000, op grond waarvan behandeling met acetylcysteïne werd gestart. Gedurende de daaropvolgende dagen nam de paracetamolspiegel echter niet af, maar bleef in hetzelfde bereik (tabel 1). Na vier dagen werd besloten om als controle de paracetamolspiegel ook te bepalen met een Architect C8000 en met een HPLC-methode. De Cobas 6000 en de Architect C8000 vonden beide een aantoonbare paracetamolconcentratie (tabel 1). Met HPLC was paracetamol echter niet detecteerbaar (< 1,0 mg/L), wat het vermoeden bevestigde dat de gemeten paracetamolconcentraties vals-positieve waarden waren.

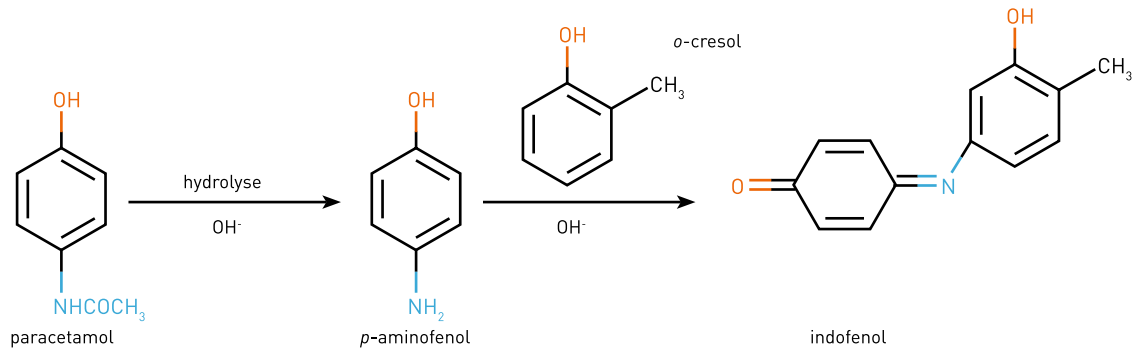
De patiënte is uiteindelijk overleden bij een absterend beleid aangezien er geen behandelingsmogelijkheden waren en zij vanwege haar alcoholmisbruik niet in aanmerking kwam voor een levertransplantatie.

Beschouwing

De enzymatisch-colorimetrische analysemethode is gebaseerd op een enzymatische hydrolyse van paracetamol tot *p*-aminofenol. Bij de Cobas vindt vervolgens een reactie plaats met *o*-cresol en de katalysator perjodaat, waardoor het blauwgekleurde indofenol wordt gevormd (figuur 1). Bij de Architect zal *p*-aminofenol reageren met 8-hydroxy-chinoline-5-sulfonzuur in aanwezigheid van mangaanionen waardoor de gekleurde verbinding 5-(4-iminofenol)-8-chinolon ontstaat. De toenemende hoeveelheden indofenol en 5-(4-iminofenol)-8-chinolon worden colorimetrisch gemeten bij golflengten van respectievelijk 600 nm en 604 nm. Ook vindt een correctie plaats voor eventuele storingen die gemeten worden bij een golflengte van 800 nm (Cobas) en 700 nm (Architect). De verandering in absorptie is recht evenredig met de paracetamolconcentratie in het monster.

Door toename van achtergrondabsorptie kan een foutief verhoogde paracetamolconcentratie worden gemeten [7, 8]. In het geval van deze casus was bilirubine het meest waarschijnlijke molecuul dat interferentie zou kunnen

Figuur 1 Principe van de reactie voor de paracetamolbepaling op de Cobas



veroorzaken. Van bilirubine is immers bekend dat het licht kan absorberen in het ultraviolette en zichtbare gebied. Zowel ongeconjugeerd als geconjugeerd bilirubine hebben een absorptiepiek tussen 390 en 460 nm [9]. Aangezien bij deze analysemethode de absorptie gemeten wordt bij een aanzienlijk hogere golflengte, is het mogelijk dat niet bilirubine zelf, maar nevenproducten van bilirubine de oorzaak zijn van de toegenomen paracetamolspiegels. De nevenproducten zouden kunnen worden gevormd uit een reactie van bilirubine met componenten van het reagens [5, 8].

Eerder is aangetoond dat bij drie van de vier onderzochte enzymatisch-colorimetrische methoden vals-positieve waarden worden gemeten in monsters van patiënten met acuut leverfalen [5]. Daarnaast is er een onderzoek dat bij de paracetamolbepaling op de Beckman Coulter AU5822 analyzer juist een negatieve interferentie door bilirubine vindt [10]. Bij de twee onderzochte immunoassays (*enzyme multiplied immunoassay technique* [EMIT] en fluorescentie-polarisatie-immunoassay [FPIA]) worden in dezelfde monsters geen detecteerbare paracetamolspiegels gevonden [5].

De impact van de interferentie is daarnaast afhankelijk van de bilirubinespiegel en de hoogte van de paracetamolspiegel. Wanneer de bilirubinespiegel hoger is dan 50 mg/L (85,5 $\mu\text{mol/L}$) kan die interferentie veroorzaken [8]. De mate van interferentie kan echter per apparaat verschillen, waardoor geen algemene afkapwaarde gegeven kan worden. De productinformatie zal hier uitsluitend over moeten geven. In de productinformatie van de Architect staat bijvoorbeeld beschreven dat bij een paracetamolspiegel van 33 mg/L er geen klinisch relevante interferentie plaatsvindt voor een bilirubinespiegel van 240 mg/L (410 $\mu\text{mol/L}$) [11]. De productinformatie van de Cobas geeft voor een paracetamolspiegel van 30 mg/L aan dat er geen klinisch relevante interferentie is tot een bilirubinespiegel van 140 mg/L (239 $\mu\text{mol/L}$). Daarnaast geeft de productinformatie van de Cobas expliciet aan dat bij paracetamolspiegels tot 50 mg/L de invloed van bilirubine een rol kan spelen, waardoor hiermee rekening moet worden gehouden bij de interpretatie van de waarde [12].

Zoals in deze casus ook is beschreven, zou de gevonden spiegel zelfs een vals-positieve waarde kunnen geven,

met als consequentie dat ten onrechte gestart wordt met acetylcysteïne. Bij behandeling met acetylcysteïne komen gastro-intestinale klachten voor en bij 64% van de patiënten worden anafylactoïde reacties gezien [13]. Aangezien deze anafylactoïde reacties ernstig kunnen zijn, is het wenselijk onnodige behandeling met acetylcysteïne te voorkomen. Daarnaast kan door de vals-positieve paracetamolspiegel gedacht worden dat de oorzaak van het leverfalen is gevonden, zodat niet verder wordt gezocht. Hierdoor zou de patiënt een noodzakelijke behandeling kunnen missen. Het is daarom verstandig om bij icterische patiënten de gevonden paracetamolspiegel te laten bevestigen indien de analysemethode hiervoor niet gevalideerd is.

Er zijn verschillende manieren om de gemeten waarde van een paracetamolspiegel te bevestigen. Dit kan door de spiegel opnieuw te bepalen met behulp van een niet-enzymatisch-colorimetrische analysemethode, zoals de HPLC-bepaling die bij deze casus is gebruikt [8]. Een andere methode is om storende stoffen uit het serum te verwijderen voordat de paracetamolspiegel wordt gemeten. Dit kan worden gedaan door ultrafiltratie van het serum. In het ultrafiltraat bevinden zich nog kleine moleculen, maar het filtraat is vrij van eiwitten zoals eiwitgebonden bilirubine, hemoglobine en lipoproteïnen [7, 14]. Ten slotte is het mogelijk een verdunningsstudie uit te voeren om op deze manier de impact van bilirubine te achterhalen [8].

Conclusie

Deze casus illustreert dat het zinvol kan zijn een bilirubinebepaling uit te voeren indien een paracetamolspiegel wordt gemeten met een enzymatisch-colorimetrische techniek. Voorzichtigheid is geboden bij de interpretatie van gevonden lage paracetamolspiegels bij icterische patiënten. Bij icterisch serum – bij een bilirubineconcentratie groter dan de waarde waarbij interferentie optreedt, zoals vermeld in de productinformatie – zou een alternatieve methode moeten worden gebruikt om de bepaalde paracetamolspiegel te bevestigen. Dit kan door gebruik te maken van een niet-enzymatisch-colorimetrische methode, door middel van ultrafiltratie van het serum voorafgaand aan de analyse of door het uitvoeren van een verdunningsstudie. ■

Literatuur

- 1 Manyike PT, Kharasch ED, Kalthorn TF, Slattery JT. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation. *Clin Pharmacol Ther.* 2000 mrt;67(3):275-82.
- 2 Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973 okt;187(1):211-7.
- 3 Kelly JH, Koussayer T, He DE, et al. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology.* 1992 feb;15(2):329-35.
- 4 Prescott LF, Illingworth RN, Critchley JA, Stewart MJ, Adam RD, Proudfoot AT. Intravenous N-acetylcysteine: the treatment of choice for paracetamol poisoning. *Br Med J.* 1979 nov 3;2(6198):1097-100.
- 5 Polson J, Wians FH Jr, Orsulak P, et al. False positive acetaminophen concentrations in patients with liver injury. *Clin Chim Acta.* 2008 mei;391(1-2):24-30.
- 6 Rumack BH, Matthew H. Acetaminophen poisoning and toxicity. *Pediatrics.* 1975 jun;55(6):871-6.
- 7 Fong BM, Siu TS, Tam S. Persistently increased acetaminophen concentrations in a patient with acute liver failure. *Clin Chem.* 2011 jan;57(1):9-11.
- 8 Bertholf RL, Johannsen LM, Bazooband A, Mansouri V. False-positive acetaminophen results in a hyperbilirubinemic patient. *Clin Chem.* 2003 apr;49(4):695-8.
- 9 Baldini F, Bechi P, Cianchi F, Falai A, Fiorillo C, Nassi P. Analysis of the optical properties of bile. *J Biomed Opt.* 2000 jul;5(3):321-9.
- 10 Chong YK, Mak CM, Lam HL, Lau MH, Leung DC. Bi-variate approach to negative interference of bilirubin towards an acetaminophen assay. *Clin Biochem.* 2015 feb;48(3):186-8.
- 11 Product information: Acetaminophen assay 2K99-20 for use with Architect, version 12-2012. West Malling: Sekisui Diagnostics/Abbott; 2012.
- 12 Product information: Acetaminophen assay ACETA 20767174 322 for use with Roche/Hitachi cobas c 311 and cobas c 501/502, version 8.0 (04-2014). Mannheim: Roche Diagnostics; 2014.
- 13 Bateman DN, Dear JW, Thanacoody HK, et al. Reduction of adverse effects from intravenous acetylcysteine treatment for paracetamol poisoning: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2014 feb 22;383(9918):697-704.
- 14 da Fonseca-Wollheim F, Heinze KG, Lomsky K, Schreiner H. Serum ultrafiltration for the elimination of endogenous interfering substances in creatinine determination. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1988 aug;26(8):523-5.