

Quantitative Hämoglobinbestimmung in Blutproben mit einem trockenchemischen Verfahren

L. Thomas

Krankenhaus Nordwest, Zentrallabor, Frankfurt

Zusammenfassung:

Die quantitative Bestimmung von Hämoglobin in Blutproben auf trockenem Reagenzträger (Seralyzer®) wurde einer klinischen Erprobung unterzogen. Die Präzision der trockenchemischen Hämoglobinbestimmung ist vergleichbar der manuellen Hämoglobincyanid-Methode.

Im geprüften Bereich (5–21 g Hämoglobin/dl) ist die Hämoglobinbestimmung mit dem Seralyzer linear und korreliert gut zur Coulter S-Methode. Neonatale Blutproben zeigen im Vergleich zur Hämoglobincyanid-Methode eine mittlere Abweichung von ±6,1%.

Schlüsselwörter:

Hämoglobinbestimmung – Trockenchemie

Summary:

In a clinical trial the quantitative determination of Hemoglobin in blood specimens was determined using dry reagent carriers. The precision of the dry reagent hemoglobin determination is comparable to the manual Hemoglobincyanide method.

In the range tested (5–21 g hemoglobin/dl) the hemoglobin determination is linear and correlates well with the manual method.

Neonatal blood specimens in comparison to the Hemoglobincyanide method show an average deviation of ±6.1%.

Keywords:

Hemoglobin determination – dry chemistry

Einleitung

Zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration wird die Hämoglobincyanid-Methode verwandt (1, 2).

Seit der Einführung dieses Verfahrens wurde eine beachtliche Verbesserung der Präzision und Richtigkeit von Hämoglobinbestimmungen verzeichnet (3).

Diese Entwicklung schlägt sich in einer vorläufigen deutschen DIN-Norm nieder (4), in der angemerkt wird, daß andere Verfahren nur dann angewendet werden dürfen, wenn das Verhältnis der damit erzielten Ergebnisse zum Ergebnis der Referenzmethode bekannt ist.

Seit etwa 2 Jahren besteht die Möglichkeit der Bestimmung von Blutbestandteilen auf trockenen Reagenzträgern (5–8). Das Spektrum der Bestimmungsmethoden umfaßt die Blutbestandteile Glucose, Harnstoff, Harnsäure, Bilirubin, LDH, Cholesterin, Creatinin und neuerdings auch Hämoglobin. Das Ziel der folgenden Arbeit war die Erprobung der trockenchemischen Hämoglobinbestimmung am Seralyzer® im Vergleich zur Hämoglobincyanid-Methode am Coulter S.

Material und Methoden

Beschreibung des Seralyzers

Der Seralyzer besteht aus drei Hauptkomponenten:

- dem Reagenzträger für die jeweilige Bestimmungsmethode,
- dem Seralyzer®-Reflektionsphotometer und den entsprechenden Kalibrationslösungen (5).

Zur Bestimmung von Blutbestandteilen werden 30 µl einer Serumprobe bzw. Vollblutprobe auf die Testzone des Reagenzträgers aufgetragen. Die sich anschließende Reaktion des zu bestimmenden Bestandteils mit den in der Testzone imprägnierten Reagenzien wird mit Hilfe des Reflektionsphotometers quantifiziert (5).

Bestimmung des Hämoglobins mit dem Seralyzer

Prinzip des Hämoglobinnachweises: der Seralyzer-Reagenzträgertest beruht auf dem Nachweis von Methämoglobin (9).

Hämoglobin wird durch Lyse der Zellmembran von den Erythrozyten freigesetzt und das zweiwertige Eisen des Hämoglobins mittels Kaliumferricyanid in den dreiwertigen Zustand überführt. Die ablaufende Farbentwicklung ist proportional zur Konzentration des Hämoglobins in der Vollblutprobe. Innerhalb einer Reaktionszeit von 45 bis 180 Sek. bei einer Temperatur von 37°C wird die Reflektion der Testzone bei 553 nm gemessen. Mit Hilfe einer zuvor erstellten Kalibrationskurve, die im Gerät abgespeichert wird, berechnet der Seralyzer die entsprechende Hämoglobinkonzentration und zeigt den Wert digital an. Der Endpunkt der Reaktion wird durch das Seralyzer-System selbst ermittelt.

Probenvorbereitung: 10 µl kapillär entnommenes Blut werden zu 800 µl A. bidest. gegeben und 30 µl dieser Verdünnung auf das Reaktionsfeld des Reagenzträgers aufgetragen. Bei Hämoglobinkonzentrationen über 20 g/dl muß zusätzlich eine 1:3-Verdünnung mit A. bidest durchgeführt werden.

Kalibrierung: erfolgt mit 2 Standardlösungen, deren Reaktivität Vollblutproben entspricht, die 7,2 g/dl Hämoglobin bzw. 16,6 g/dl Hämoglobin enthalten. Die angegebenen Kalibrationswerte der roten Farblösungen werden anhand einer Arbeitskurve ermittelt, in der die Reflektion von Blutproben mit bekannter Hämoglobinkonzentration gegen die mit der Hämiglobincyanid-Methode ermittelten Werte aufgetragen werden.

Die Kalibrierung mit den beiden Lösungen erfolgt wie die Messung einer unbekannten Probe, außer, daß dem Gerät vor dem Auftrag der Probe der Kalibrierungswert über die Tastatur eingegeben wird. Für die Bestimmung kann entweder Vollblut oder mit EDTA bzw. Heparin versetztes Vollblut verwendet werden.

Bestimmung des Hämoglobins am Coulter S

Die Bestimmung am Coulter S wurde wie vom Hersteller angegeben durchgeführt. Die Verdünnung der Blutproben erfolgte dabei mit manueller Verdünnerausgabe (44,7 µl Blut

Tab. 1: Präzision in der Serie

10fach-Bestimmung von Blutproben mit unterschiedlicher Hämoglobinkonzentration

Probe	I	II	III	IV
Hämoglobinkonzentration				
̄ (g/dl)	6,22	10,93	11,49	17,46
s (g/dl)	0,13	0,23	0,30	0,23
VK %	2,1	2,1	2,6	1,3

Tab. 2: Präzision von Tag zu Tag

An 20 aufeinanderfolgenden Tagen wurden 3fach-Bestimmungen der Kontrollblute Level I – III vorgenommen. Die statistischen Kenngrößen stellen Mittelwerte der aus den jeweils 2. und 3. Wiederholungen berechneten Werte dar.

Blutkontrolle	Seralyzer			Coulter S		
	̄	s (g/dl)	VK %	̄	s (g/dl)	VK %
Merz & Dade						
Level I	7,75	0,17	2,1	7,95	0,12	1,5
Level II	14,45	0,44	3,0	14,5	0,16	1,1
Level III	19,20	0,65	3,4	18,95	0,21	1,1

plus 10 ml Isoton). Die entstandene Lösung wurde dann vom Sekundäransauger aufgenommen. Die Richtigkeitskontrolle wurde mit 4-C-Referenzblut der Firma Coulter Electronics vorgenommen. Weiterhin wurden zur Qualitätssicherung die Blutkontrollen Level 1 bis Level 3 der Firma Merz ± Dade, München, verwendet.

Patientenproben

Kapillär entnommene und venös entnommene EDTA-Vollblutproben von stationären und ambulanten Patienten des Nordwestkrankenhauses, Frankfurt.

Ergebnisse

Präzision in der Serie

Zur Ermittlung der Präzision in der Serie wurden Vollblutproben bzw. Blutkonserven verschiedener Hämoglobinkonzentrationen 10fach bestimmt. Die statistischen Kenngrößen sind aus Tabelle 1 zu ersehen, wobei die Variationskoeffizienten für Hämoglobinkonzentrationen von 6,22 g/dl bis 17,46 g/dl zwischen 1,3% und 2,6% lagen.

Präzision von Tag zu Tag

An 20 aufeinanderfolgenden Tagen wurden je 3 Bestimmungen der Kontrollblute Level 1, Level 2 und Level 3 vorgenommen. An jedem Arbeitstag erfolgte vorab eine Kalibrierung des Seralyzers. Die Berechnung der statistischen Kenngrößen erfolgte getrennt für die 2. und 3. täglichen Wiederholungen. Aus diesen Werten wurden die arithmetischen Mittel gebildet, die in Tabelle 2 angegeben sind.

Die gleichen Messungen wurden am Coulter S durchgeführt, um die Präzision dieser Vergleichsmethode in unseren Händen abschätzen zu können. Die Daten der Tabelle 2 zeigen, daß die erreichte Präzision am Coulter S in der gleichen Größenordnung liegt, wie schon von anderen Autoren berichtet (10, 11).

Präzision von Doppelbestimmungen an Patientenproben

Innerhalb des Methodenvergleichs erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung aller EDTA-Vollblutproben mit der Seralyzer-Bestimmungsmethode. Mit Hilfe dieser Daten konnte die Präzision für Wiederholungsbestimmungen in der Serie für eine große Zahl von Patienten ermittelt werden. Aus allen gemessenen Doppelwerten wurde der Mittelwert der Varianzen berechnet. Die Standardabweichung, die die Quadratwurzel dieses Mittelwertes darstellt, wurde durch die mittlere Hämoglobinkonzentration aller Werte dividiert, um den Variationskoeffizienten zu erhalten. In Abbildung 1 sind die Werte der 2. Wiederholung in Abhängigkeit der ersten Wiederholung dargestellt. Der Variationskoeffizient für Doppelbestimmungen an Patientenproben beträgt 2,1% bei einer Standardabweichung von 0,28 g/dl.

Richtigkeit der Seralyzer-Hämoglobinbestimmung

a) Verwendung von Kontrollblut

In Tabelle 3 sind den Zielwerten der Merz & Dade-Blutkontrollen die Mittelwerte der gemessenen Seralyzer- bzw. Coul-

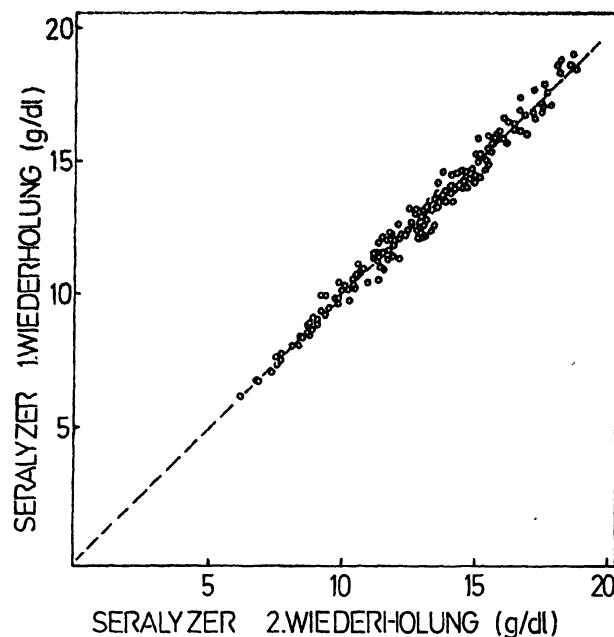


Abb. 1: Präzision von Wiederholungsbestimmungen. Die Ergebnisse der 2. Seralyzer-Hämoglobinbestimmung von 198 Patientenproben sind in Abhängigkeit der 1. Bestimmung dargestellt. Die Standardabweichung und der Variationskoeffizient wurden wie im Text angegeben ermittelt.

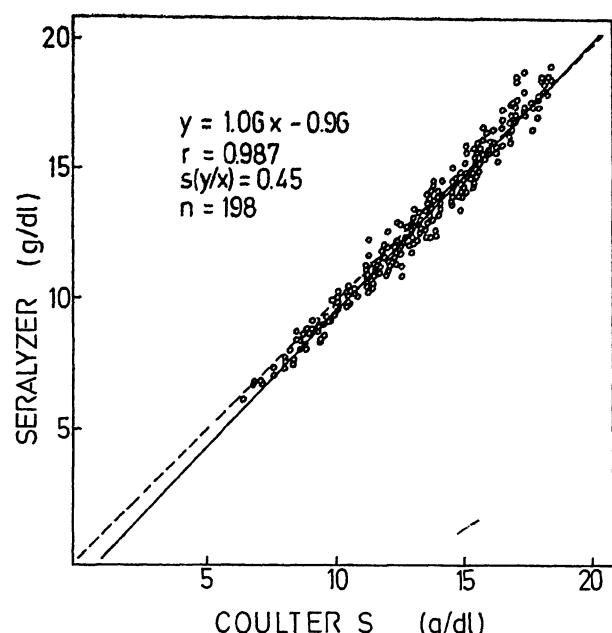


Abb. 2: Methodenvergleich. Übereinstimmung der Coulter S-Hämoglobinbestimmung mit der Seralyzer-Hämoglobinbestimmung. Die gestrichelte Linie ist die Winkelhalbierende. Die durchgehende Linie stellt die Regressionsgerade dar. Die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse sind angegeben. Jeder Meßpunkt stellt den Mittelwert einer Doppelbestimmung dar.

ter S-Bestimmungen gegenübergestellt. Die Abweichungen von den Zielwerten sind für beide Methoden minimal.

b) Verwendung von Patientenproben

An 20 aufeinanderfolgenden Tagen wurden jeweils 10 EDTA-Vollblutproben mit der Seralyzer-Hämoglobinbestimmung und der Coulter S-Methode analysiert. An jedem/dieser Tage erfolgte eine Kalibrierung des Seralyzers und eine interne Qualitätskontrolle beider Verfahren mit Kontrollseren. Zwei Werte der insgesamt 200 Vergleichswerte zeigten einen Wert von <5 g/dl. Diese beiden Ergebnisse wurden aus der Berechnung eliminiert, da der untere Meßbereich des Seralyzers nur bis 5 g/dl geht.

Die gute Übereinstimmung beider Methoden wird durch die Steigung der Regressionsgeraden von 1,06 und dem Korrelationskoeffizienten von 0,99 bestätigt. Die Streuung der Werte $S(y/x)$ von 0,45 g/dl liegt in der gleichen Größenordnung wie

die entsprechenden Methodenvergleiche für die Hämoglobinbestimmung (10). Die Meßwerte sind aus Abbildung 2 zu ersehen.

Der mittlere Bias in den einzelnen Konzentrationsbereichen liegt zwischen 0,1 g/dl und 0,37 g/dl (Tab. 4). Blutproben, die eine Hämoglobinkonzentration unter 16 g/dl aufweisen, ergeben mit der Seralyzer-Methode niedrigere Werte, während bei Konzentrationen über 16 g/dl der Seralyzer höhere Werte liefert als die Coulter S-Methode. Die leichte Überschätzung im Konzentrationsbereich über 16 g/dl ist aber nicht signifikant. Bei einer angenommenen Hämoglobinkonzentration von 10,5 g/dl, die Barnett (12) als medizinischen Entscheidungspunkt bezeichnet, sollte die Standardabweichung nicht größer als 0,5 g/dl sein. Die Seralyzer-Hämoglobinbestimmung weist bei dieser Konzentration eine Standardabweichung von 0,29 g/dl auf. Die Berechnung dieses Wertes erfolgte nach Westgard et al. (13).

Tab. 3: Richtigkeit der Seralyzer- und Coulter S-Hämoglobinbestimmung anhand von Kontrollseren

Die Zielwerte sind aus der Packungsbeilage des Herstellers entnommen. Die Seralyzer- und Coulter S-Analysenwerte wurden in einer 20tägigen Analysenperiode ermittelt (siehe Tabelle 2).

Blutkontrolle Merz & Dade	Seralyzer			Coulter S		
	Zielwert (g/dl)	Analysenwert (g/dl)	% Abw.	Zielwert (g/dl)	Analysenwert (g/dl)	% Abw.
Level I	7,7	7,78	+1,0	7,8	7,93	+1,7
Level II	14,3	14,49	+1,3	14,4	14,42	+0,1
Level III	18,7	19,18	+2,56	18,8	18,90	+0,5

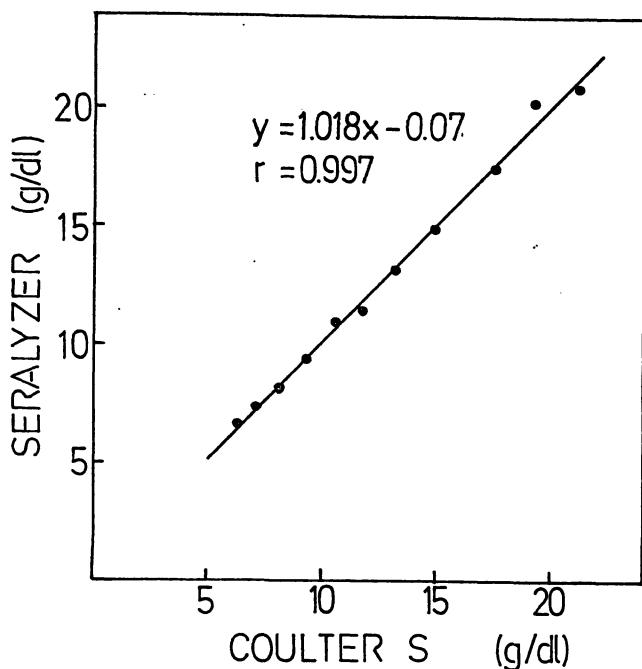


Abb. 3: Linearität der Seralyzer-Hämoglobinbestimmung

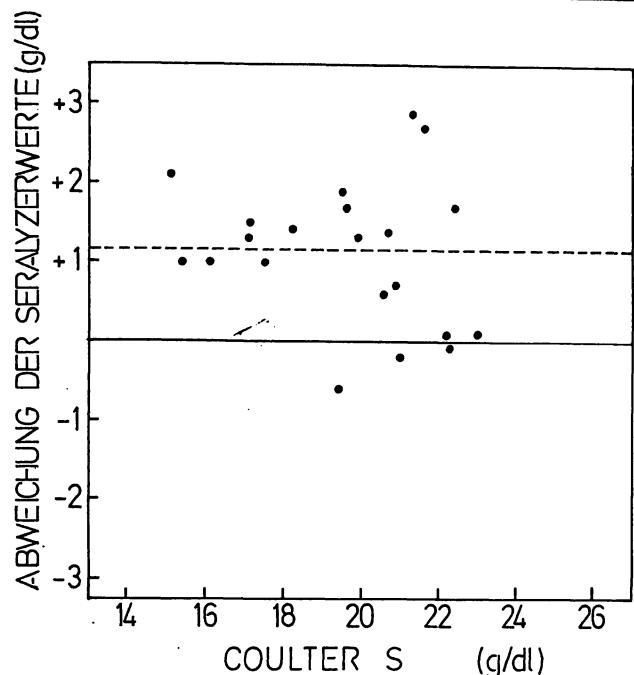


Abb. 4: Bestimmung des Hämoglobingehaltes von neonatalen Blutproben. Abweichung der Seralyzer-Werte von den Coulter S-Werten (y-Achse) in Abhängigkeit der Coulter S-Analysen-Werte. Die gestrichelte Linie zeigt den mittleren Bias der Seralyzer-Werte.

Linearität

Die Linearität der Seralyzer-Hämoglobinbestimmung wurde ausgehend von einem Erythrozytenkonzentrat bestimmt. Dieses Erythrozytenkonzentrat wurde mit Serum verdünnt, wodurch sich Proben mit Hämoglobinkonzentrationen im Bereich von 6,3 bis 21,0 g/dl herstellen ließen. Die Abschätzung der Linearität erfolgte im Vergleich zur Methode am Coulter S. Für jede Verdünnungsstufe wurden je 3 Bestimmungen mit beiden Methoden durchgeführt. Die in Abbildung 3 angegebenen Werte stellen Mittelwerte dieser 3 Bestimmungen dar. Für die erhaltenen Werte wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt, die mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,997 und einer Steigung von 1,018 belegt, daß die Seralyzer-Hämoglobinbestimmung linear ist. Um die Linearität im Meßbereich über 20,0 g/dl abklären zu können, wurde ein Methodenvergleich für neonatale Blutproben durchgeführt.

Bestimmung der Hämoglobinkonzentration von neonatalen Blutproben

Fersenblut von Neugeborenen wurde sowohl mit dem Seralyzer als auch mit dem Coulter S, wie unter „Material und Methoden“ beschrieben, analysiert. Die Seralyzer-Bestimmung erfolgte zusätzlich noch mit einer weiter verdünnten Probe. Die 1:81 verdünnte Blutprobe wurde dabei mit A. bidest. zusätzlich 1:3 verdünnt und nochmals doppelt mit der Seralyzer-Hämoglobinbestimmung analysiert. Zur Aufdeckung von Abweichungen zwischen Seralyzer- und Coulter S-Bestimmung wurde in Abbildung 4 die Abweichung beider Methoden voneinander in Abhängigkeit der Coulter S-Hämoglobinkonzentrationen dargestellt. Es ist zu erkennen, daß die Abweichungen im Mittel $\pm 6,1\%$ betragen, wobei die Seralyzer-Technik zu höheren Werten tendiert. Trotz dieser Abwei-

Tab. 4: Methodenvergleich

Bias der Seralyzer-Hämoglobinbestimmung in bezug auf die Coulter S-Hämoglobinbestimmung.
Die Berechnung erfolgte anhand der Patientenproben.

Konzentrationsbereich (g/dl)	Anzahl der Proben	Bias (g/dl)
<8	4	-0,26
8-12	60	-0,37
12-14	56	-0,29
14-16	48	-0,21
16-18	26	+0,10
18-20	4	+0,35

Tab. 5: Trübungseinfluß auf die Seralyzer-Hämoglobinbestimmung

10 Blutproben wurden mit Leukozyten aufgestockt. Danach wurde die Hämoglobinkonzentration mit der Seralyzer- und Coulter S-Methode bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Probe	Leukozytenzahl pro nl	Seralyzer-wert g/dl	Hämoglobin Coulter S-Wert g/dl	Abweichung (g/dl)
1	50,9	10,5	11,1	-0,6
2	58,8	11,7	12,2	-0,5
3	61,2	13,3	13,9	-0,6
4	100,0	11,8	12,8	-1,0
5	100,0	10,1	10,7	-0,6
6	54,3	10,6	10,9	-0,3
7	36,3	12,4	12,7	-0,3
8	43,2	10,9	11,2	-0,3
9	52,5	10,3	10,8	-0,5
10	68,5	8,9	9,6	-0,7

chung kann die Seralyzer-Hämoglobinbestimmung auch zur Analyse von neonatalen Blutproben verwendet werden.

Trübungseinfluß auf die Hämoglobinbestimmung am Seralyzer

Bekanntlich können in seltenen Fällen bei pathologischen Blutproben falsche Hb-Bestimmungen sowohl am Coulter S (14, 15) als auch bei der manuellen Hämoglobinbestimmung infolge von Plasmatrübungen bzw. Eiweißfällungen auftreten. Um den Effekt der Trübung auf die Seralyzer-Hämoglobinbestimmung ersehen zu können, wurden Blutproben mit Leukozyten aufgestockt und danach sowohl mit der Seralyzer- als auch mit der Coulter S-Bestimmung analysiert. Alle 10 getesteten Blutproben (Tab. 5) wiesen Leukozytenzahlen größer als 30 pro nl auf. Alle Coulter S-Werte waren signifikant höher als die Seralyzer-Bestimmungen. Die Seralyzer-Hämoglobinbestimmung ist also hinsichtlich der durch Leukozyten verursachten Probentrübung weniger empfindlich als die Coulter S-Methode. Ähnliches wurde schon für die Hämoglobinbestimmung am ACA-Dupont berichtet (11).

Diskussion

Die Hämoglobincyanid-Methode ist die empfohlene Referenzmethode zur Bestimmung des Hämoglobin gehaltes im Blut. Mit mechanisierten Analysensystemen wie z. B. dem Coulter S werden bei normalen Leukozytenzahlen im Mittel etwas niedrigere Werte erhalten als mit den manuellen Methoden, wenn die manuellen Ansätze vor der photometrischen Messung nicht zentrifugiert werden. Der Variationskoeffizient serieller Messungen liegt für die manuellen Methoden bei etwa 2,5% für die mechanisierten Analysensysteme bei 0,5% (10, 11).

Das trockenchemische Verfahren der Hämoglobinbestimmung entspricht nicht der empfohlenen Referenzmethode (5), und nach der Vornorm DIN 58931 soll ein solches Verfahren nur angewendet werden, wenn das Verhältnis der damit erzielten Ergebnisse zum Ergebnis der Referenzmethode bekannt ist. In dem geprüften Bereich von 6–19 g Hb/dl hat die Hämoglobinbestimmung mit dem Seralyzer eine der manuellen Hämoglobincyanid-Methode vergleichbare Präzision (11), sie ist jedoch schlechter als die der mechanisierten Analysensysteme. Ursache ist die Probennahme mit einer 10 µl Kapillare und die nachfolgende Hämolyse in 80fachem Volumen A. bidest.

Bezugnehmend auf die Richtigkeit ist die trockenchemische Hämoglobinbestimmung der Coulter S-Methode vergleichbar, obwohl die Werte bei Hämoglobinkonzentrationen unter 16 g/dl tendenziell etwas niedriger und bei höheren Werten tendenziell etwas höher sind. Bei Leukozytenwerten über 30/nl ist die Trübungsempfindlichkeit geringer als die der Coulter S-Methode.

Über mögliche störende Einflüsse von Medikamenten und anderen Metaboliten liegen bisher noch keine Ergebnisse vor, jedoch ist zu erwarten, daß sie aufgrund der hohen Vorverdünnung des Blutes keinen erheblichen Einfluß auf die Meßergebnisse haben sollten.

Trotz der in dieser Studie positiven Erfahrungen mit der Hämoglobinbestimmung auf trockenen Reagenzträgern, müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob diese Bestim-

mungstechnik ein der manuellen Referenzmethode und den mechanisierten Methoden (z. B. Coulter) gleichwertiges Verfahren für die Routinediagnostik darstellt.

Der Autor dankt Herrn Dr. G. Storz und Herrn Dr. W. Plischke von der Wissenschaftlichen Abteilung Miles für die gewährte technische Unterstützung.

Schriftum:

1. ZIJLSTRA, W. G., VAN KAMPEN, E. J.: Spectrophotometry of Hemoglobin. The Standard Hämoglobincyanide method and after. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 520–523 (1981).
2. International Committee for Standardization in Haematology. *J. Clin. Pathol.* 31, 139–143 (1979).
3. VAN KAMPEN, E. J., ZIJLSTRA, W. G.: Hämoglobinometry: From Estimation to Reference Method. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 517–519 (1981).
4. DIN Vornorm 58931. Bestimmung des Hämoglobin gehaltes im Blut.
5. ZIPP, A.: Development of Dry Reagent Chemistry for the Clinical Laboratory. *J. Autom. Chem.* 3, 71–75 (1981).
6. THOMAS, L., APPEL, W., STORZ, G., PLISCHKE, W.: Bestimmung von Blutbestandteilen auf trockenen Reagenzträgern. *Dtsch. med. Wschr.* 106, 1091–1094 (1981).
7. THOMAS, L., PLISCHKE, W., STORZ, G.: Evaluation of a quantitative Solid Phase Reagent System for Determination of Blood Analytes. *Ann. Clin. Biochem.* 19, 214–223 (1982).
8. KARMEN, A., LEUT, R.: Clinical Chemistry Testing with the Ames Seralyzer Dry Reagent System. *J. Clin. Lab. Autom.* 2, 284–296 (1982).
9. VAN ASSENDELFT, O. W.: Spectrophotometry of Hemoglobin Derivates. Royal van Goren Ltd., Assen, The Netherlands, 1970; Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1970.
10. SALVATI, A. M., SAMOGGIA, P., TAGGI, F.: Hemoglobinometry: A comparison between the Hämoglobincyanide method and the Coulter S Counter. *Clin. Chem. Acta* 77, 13–20 (1977).
11. AUSLÄNDER, W., SAUER, C., SÖKER, M.: Hämoglobinbestimmung im Vollblut am ACA II und ACA III. *Lab.med.* 5, A+B 127–134 (1981).
12. BARNETT, R.: Medical Significance of laboratory results. *Am. J. Clin. Path.*, 50, 671–677 (1968).
13. WESTGARD, J. O. et al.: Concepts and Practices in the Evaluation of Clinical Chemistry Methods. III. Statistics. *Am. J. Med. Technol.* 44, 552–571 (1978).
14. NICHOLS, P. D.: The erroneous haemoglobin-hyperlipidaemia relationship. *J. Clin. Path.*, 30, 638–640 (1977).
15. GALLUSKY, P., BRAUN, H. J., BOHNER, J., SCHOELER, M.: Hämoglobin-Fehlbestimmung bei Kranken mit siapotiver Makroglobulinämie Waldenström. *Dtsch. med. Wschr.* 99, 283–286 (1974).
16. VAN ASSENDELFT, O. W., VAN KAMPEN, G. J.: Errors in Hemoglobinometry. In: Standardization in Hematology and Clinical Pathology (Astaldi, G. and Teutoni, L., eds.) pp. 17–25. Arch Casa solleiro della sofferenza, S. Giovanni. Retoudo — Foggia.

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. med. L. Thomas
Krankenhaus Nordwest
Zentrallabor
Steinbacher Hohl 2–26
D-6000 Frankfurt

