

Hämoglobin-Bestimmung bei Blutspendern mit dem Reflotron® System

D. Weißhaar¹, A. Hubbuch², C. Carstensen²

¹ Institut Kassel BSD Hessen des DRK

² Boehringer Mannheim GmbH

Zusammenfassung:

Reflotron® Hämoglobin wurde auf seine Eignung zum Einsatz in einem Blutspendedienst getestet. Mit frischem EDTA-Blut wurden im Konzentrationsbereich von 5–15 g/dl Hämoglobin Variationskoeffizienten in der Serie von 1,5–1,7% erzielt. In Methodenvergleichen mit der Cyanhämoglobin-Methode wurde unter Verwendung von venösen und kapillären Blutproben eine hohe Übereinstimmung der Analysenergebnisse festgestellt. Fehldosierungen der Probe haben bis zu $\pm 13\%$ keinen Einfluß auf das Analysenergebnis. Gleiches gilt für Blutproben mit Hämatokritwerten zwischen 15 und 55%. Aufgrund der analytischen Zuverlässigkeit und der einfachen Handhabung kann dieses Analysensystem für den Blutspendedienst empfohlen werden. Für den rationellen Einsatz im Blutspendedienst wird ein stufenweises Vorgehen empfohlen, das die bisherigen Erfahrungen mit der „Kupfersulfat-Methode“ berücksichtigt und eine kostengünstige sowie sichere Erkennung ungeeigneter Blutspender erlaubt.

Schlüsselwörter:

Reflotron® Hämoglobin – Blutspender – Präzision – Richtigkeit – Volumenabhängigkeit – Hämatokrit

Summary:

The suitability of Reflotron® Hemoglobin for screening blood donors was investigated. In the concentration range 5–15 g/dl haemoglobin, within-series CVs of 1.5–1.7% were achieved using fresh EDTA-blood. In method comparisons with the cyanmethaemoglobin method using venous and capillary blood samples a high degree of agreement between the analytical results was found. Sample dispensing errors of $\pm 13\%$ have no effect on the analytical results obtained with Reflotron® Hemoglobin. The same applies to variations in the PVC (haematocrit) of blood samples in the range 15 to 55%. As a result of its analytical reliability and ease of use, this analysis system is well suited for screening blood donors.

For rational use in the blood donor screening a stepwise procedure is proposed which takes into account experience gained with the "copper sulphate method" and permits the economical and certain detection of unsuitable blood donors.

Keywords:

Reflotron® Hemoglobin – blood donors – precision – accuracy – volume-dependence – packed cell volume (haematocrit)

Einleitung

Nach den Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (1) ist vor jeder Blutspende eine Hämoglobinbestimmung durchzuführen. Bei Hämoglobinkonzentrationen unter 12,5 g/dl darf keine Blutspende erfolgen. An Methoden zur Bestimmung des Hämoglobins werden in diesem Zusammenhang folgende Anforderungen gestellt:

- mobile und dezentralisierte Einsatzmöglichkeit
- einfache Handhabung/keine Notwendigkeit von klinisch-chemisch ausgebildetem Personal
- rasche und eindeutige Ergebnisse
- geringe Störanfälligkeit des Systems
- Möglichkeit der Qualitätskontrolle
- niedrige Kosten

Zur Zeit wird in der Bundesrepublik Deutschland bei der Mehrzahl der Blutspenden die kostengünstige Kupfersul-

fat-Methode* (2, 3) eingesetzt, die aber lediglich eine ja-nein-Entscheidung im Grenzbereich erlaubt. Fehl-Interpretationen sind bei dieser qualitativen Methode vor allem im mobilen Einsatz leicht möglich, da Temperaturschwankungen und Handlungsfehler (Luftblase im Blut-tropfen) das Ergebnis deutlich beeinflussen können.

Mit Reflotron® Hämoglobin steht seit 1985 ein Reagenzträger zur Verfügung, der in Verbindung mit dem Reflexionsphotometer Reflotron® (4, 5) speziell für die dezentrale, patientennahe Analytik entwickelt wurde. Wir haben deshalb dieses Analysensystem im mobilen und stationären Einsatz geprüft und zur Bewertung der analytischen Zuverlässigkeit mit der Referenzmethode verglichen.

* Dabei wird ein Tropfen Blut in eine Kupfersulfat-Lösung aus ca. 3–5 cm Höhe fallen gelassen. Die Dichte der Kupfersulfat-Lösung entspricht der Dichte von Blut mit einer bestimmten Hämoglobinkonzentration (z. B. 12,5 g/dl). Bleibt der Tropfen in der Schwebelage, dann sollte die Hämoglobinkonzentration unter dem Entscheidungswert liegen, sinkt er nach unten, sollte sie über diesem Wert liegen.

Material und Methoden

Zur Untersuchung wurden eingesetzt: Reflotron® Hämoglobin (Art.-Nr. 744964, Boehringer Mannheim) und das Reflexionsphotometer Reflotron® (Art.-Nr. 747432, Boehringer Mannheim); die Test-Combination Hämoglobin (Art.-Nr. 125729, Boehringer Mannheim) an den Photometern 1101 M und Vitatron MPS; Kontrollblut von Merz und Dade (Hb-Control 1, Cat.-No. 130217; Hb-Control 2, Cat.-No. 130218 und Hb-Control 3, Cat.-No. 130219).

Der schematische Aufbau des Reagenzträgers Reflotron® Hämoglobin ist Abb.1 zu entnehmen. Testprinzip: die Erythrozyten werden durch Saponin hämolysiert, das freigesetzte Hämoglobin mittels $K_3 [Fe (CN)_6]$ oxidiert und anschließend durch $Hg (CN)_2$ in Cyanhämoglobin überführt.

Die Kalibration des Reagenzträgers erfolgt durch den Hersteller mit 6 Cyanhämoglobin-Standards mit Konzentrationen von 5–20 g/dl (6). Ein Magnetcode auf der Rückseite des Reagenzträgers enthält testspezifische Informationen (Erkennung des Parameters, Umrechnungsvorschrift von Remissionswerten in Hämoglobinkonzentrationen, Steuerung der Meßzeiten u.a.), die von Reflotron® beim Einführen des Reagenzträgers gelesen und von einem Mikroprozessor verarbeitet werden.

Durchführung der Analyse

30 µl Blut werden zentral auf den roten Teil des Testfeldes appliziert. Innerhalb von 15 sec wird der Reagenzträger in das Gerät eingeführt. Der Meßwert wird nach einer Reaktionszeit von 120 sec in g/dl (oder mmol/l) digital angezeigt.

Versuchsaufbau

1. Die Präzision in der Serie wurde mit EDTA-stabilisiertem venösem Humanblut und dem Kontrollblut von Merz und Dade geprüft (n = 10), die Tag-zu-Tag-Präzision in Dreifachbestimmungen an 5 Tagen mit dem o. g. Kontrollblut.
2. Die Richtigkeit des neuen Analysenverfahrens wurde durch Methodenvergleiche mit der Cyanhämoglobin-Methode (7, 8) in 214 kapillären und 298 venösen EDTA-

Tab. 1: Präzision von Reflotron® Hämoglobin und Wiederfindung von Sollwerten im Kontrollblut

Serie (n = 10)						
	Kontrollblut			EDTA-Blut		
\bar{x} [g/dl]	7,0	13,0	18,3	5,0	11,8	17,0
VK (%)	1,7	2,0	2,0	1,7	1,5	1,6
Tag zu Tag (n = 15)						
\bar{x} [g/dl]	7,1	13,2	18,5			
VK (%)	2,2	3,6	2,9			
Wiederfindung der Sollwerte						
Sollwert [g/dl]	7,35	13,8	18,2			
\bar{x} [g/dl]	7,1	13,2	18,5			
% Abweichung vom Sollwert	-3,5	-4,5	+1,62			

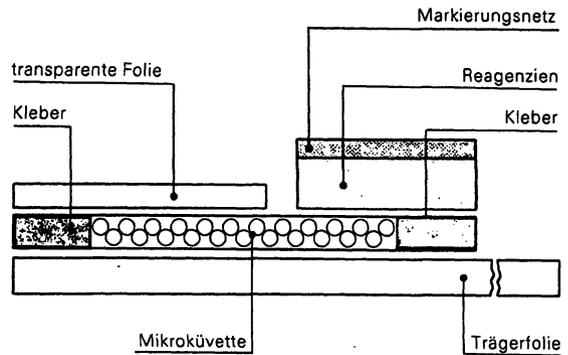


Abb. 1: Schematischer Aufbau des Testfeldes von Reflotron® Hämoglobin

Blutproben überprüft. Die Methodenvergleiche wurden nach dem nicht-parametrischen Verfahren von Bablok und Passing ausgewertet (9).

3. Der Einfluß des Pipettierolumens auf die Hämoglobinwerte wurde zwischen 26 µl und 34 µl mit 3 Proben unterschiedlicher Hämoglobinkonzentration in 5fach-Bestimmungen untersucht, der Einfluß des Hämatokrit bis 55% durch Methodenvergleiche mit der Referenzmethode in 45 Blutproben.

Ergebnisse und Diskussion

Tab.1 enthält die Ergebnisse der Präzisionsuntersuchungen sowie die dabei ebenfalls ermittelten Wiederfindungen der Sollwerte in den drei Kontrollblut-Proben. Im Bereich von 5–15 g/dl Hämoglobin wurden mit EDTA-Blut Variationskoeffizienten von 1,5–1,7% (in der Serie) ermittelt. Im Vergleich zu den Serien-Impräzisionen wurden von Tag zu Tag mit Variationskoeffizienten von 2,2–3,6% im Kontrollblut höhere Streuungen beobachtet. Dies ist ungewöhnlich für das Reflotron® System, denn aufgrund der Konstruktion des Reflexionsphotometers und der Kalibration der Reagenzträger durch den Hersteller sind innerhalb einer Meßserie und von Tag zu Tag praktisch identische Streuungen zu erwarten. Diese Eigenschaft des Analysensystems wurde in der Zwischenzeit auch in mehreren Untersuchungen experimentell bestätigt (10–12). Möglicherweise führten kleinere Agglomerate im Kontrollblut, die bei Anwendung der üblichen absorptionsphotometrischen Methoden aufgelöst, bei Reflotron® jedoch am Reagenzträger filtriert werden, zu der erhöhten Tag-zu-Tag-Varianz.

In den Kontrollbluten wurden Abweichungen zwischen -4,5% und +1,6% von den Sollwerten beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden mit der Referenzmethode erhalten: -3,5% (bei Kontrollblut 1), bis +1,2% (bei Kontrollblut 2) Abweichung vom jeweiligen Sollwert.

Gezielte Untersuchungen zu den Verfahrensgrenzen wurden nicht durchgeführt, da aufgrund des Kalibrationsverfahrens ein Meßbereich von 5–20 g/dl Hämoglobin zu erwarten ist, was die Anforderungen in einem Blutspendendienst weit übersteigt.

Die Methodenvergleiche in kapillären und venösen Blutproben sind in Abb.2 dargestellt. Im venösen Blut wurde eine ausgezeichnete Übereinstimmung ($y = 0,00 + 1,00 x$) mit der Referenzmethode und eine geringe Streu-

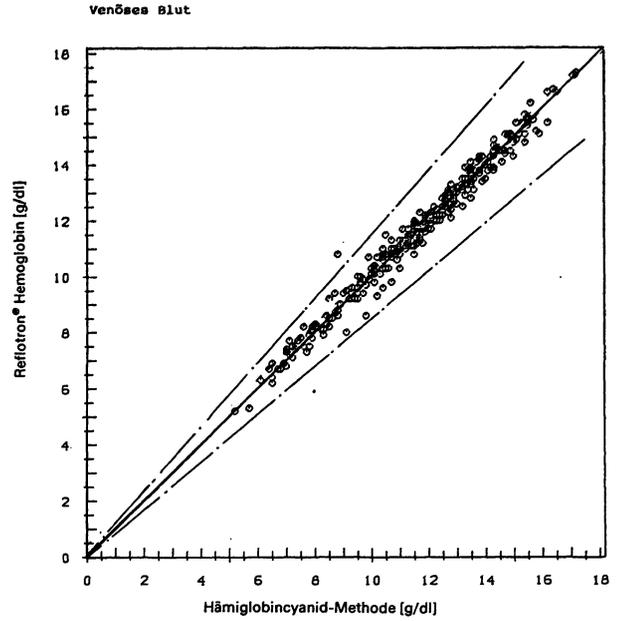
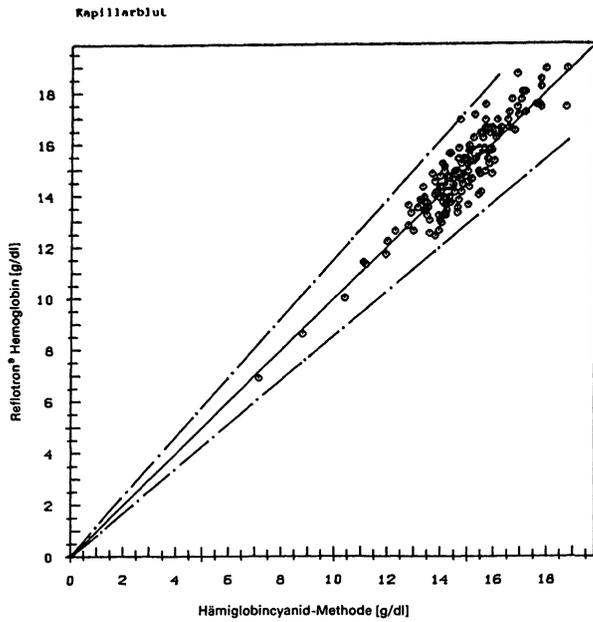


Abb. 2: Vergleich von Reflotron® Hemoglobin mit der Referenzmethode in 214 Kapillarblut-Proben und 298 venösen Blutproben ($y = 0,00 + 1,00 x$). —: Winkelhalbierende; - - - : $\pm 15\%$ -Bereich

ung der Wertepaare um die Winkelhalbierende erhalten. Im Kapillarblut ist die Streuung um die Winkelhalbierende aufgrund der kritischeren Probenahme etwas größer. Alle 214 Wertepaare liegen aber im $\pm 15\%$ -Bereich. Aufgrund der ungleichen Verteilung der Meßwerte (Häufung zwischen 13 und 16 mg/dl) ist eine Berechnung der Regressionsgeraden nicht sinnvoll.

Abb. 3 zeigt, daß Fehler bei der Probendosierung von diesem trockenchemischen Analysensystem innerhalb eines Bereiches von 26–34 μl toleriert werden.

Bei Hämatokritwerten zwischen 15 und 55% wurde keine Beeinflussung der Meßwerte von Reflotron® Hemoglobin beobachtet (Abb. 4).

Die Handhabung des Reflotron® Systems ist ähnlich einfach wie die der Kupfersulfat-Methode. Nach kurzer

Einarbeitung kann somit eine quantitative Hämoglobin-Bestimmung auch von analytisch ungeschultem Personal bei den Blutspendeterminen außerhalb der Zentrale zuverlässig durchgeführt werden. Dies ist insbesondere deshalb möglich, weil bei diesem Analysensystem eine Vielzahl von Fehlerquellen der klassischen photometrischen Analyse entfallen:

Reflotron® Hemoglobin ist relativ robust gegen Pipettierfehler und Temperatureinflüsse (+15°C bis +32°C Umgebungstemperatur). Thermostatisierung, Inkubation, Kalibration und Ergebnisberechnung werden von dem Analysensystem selbständig durchgeführt und kontrolliert. Zur Kontrolle des optischen Systems von Reflotron® sind Kontrollstreifen verfügbar (Reflotron® Check), eine Gesamtkontrolle des Systems ist mit Kontrollblut möglich.

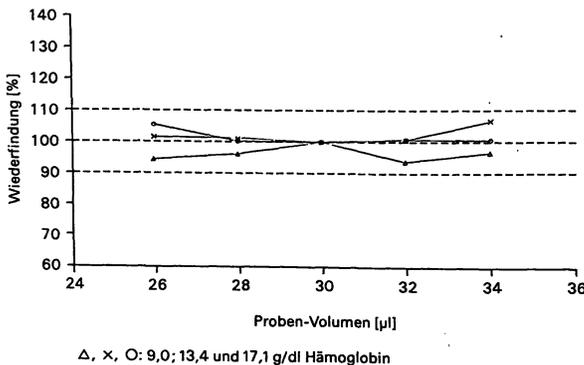
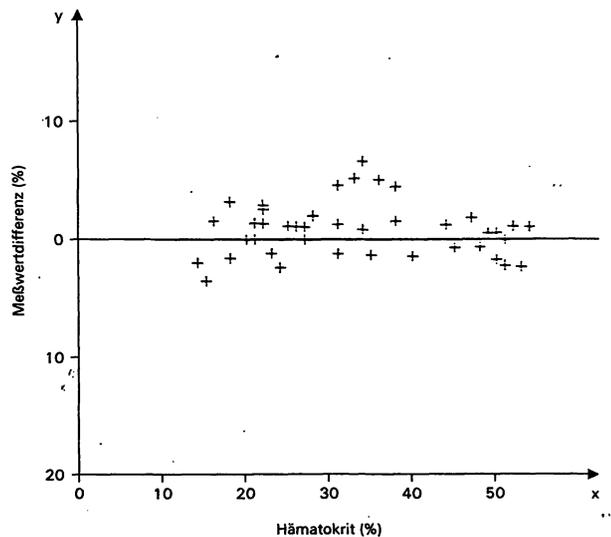


Abb. 3: Einfluß unterschiedlicher Probenvolumina auf die Wiederfindung von Hämoglobin bei Reflotron® Hemoglobin

Abb. 4: Prozentuale Differenzen zwischen Reflotron® Hemoglobin und der Referenzmethode bei 45 Blutproben (y) in Abhängigkeit vom Hämatokrit (x)



Im Vergleich zur Kupfersulfat-Methode liegen die Kosten des Reagenzträgers (DM 1,20/Reagenzträger in 1987) höher, die Analysenzeit beträgt 2 min. Als Alternative zum generellen Einsatz von Reflotron® Hemoglobin wird deshalb in Anlehnung an Hyams (13) ein Vorgehen empfohlen, das die Vorteile beider Analysensysteme (Zuverlässigkeit von Reflotron® Hemoglobin; Schnelligkeit und niedrige Kosten der Kupfersulfat-Methode) miteinander vereint:

Alle Blutproben werden mit einer Kupfersulfat-Lösung geprüft, deren Dichte 13,5 g/dl Hämoglobin entspricht. Bei Werten unter 13,5 g/dl bzw. grenzwertigem Ergebnis wird die Untersuchung mit Reflotron® Hemoglobin wiederholt. Dieses stufenweise Vorgehen ist kostengünstig, schnell und berücksichtigt die analytische Unschärfe der Kupfersulfat-Methode. Der Einsatz des Reflotron® Systems im Blutspendedienst ist darüberhinaus auch vor allem im Hinblick auf die GPT-Bestimmung zu empfehlen, mit der positive Erfahrungen im Blutspendedienst des BRK vorliegen (14).

Schrifttum:

1. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion, S.32. Dt. Ärzte Verlag Köln, 1. Auflage 1980.
2. PHILLIPS, R. A., VAN SLYKE, D. D., HAMILTON, P. B., DOLE, V. P., EMERSON jr., K., ARCHIBALD, R. M.: Measurement of specific gravities of whole blood and plasma by standard copper sulfate solutions. J. Biol. Chem. 183, 305-330 (1950).
3. VAN SLYKE, D. D., PHILLIPS, R. A., Dole, V. P., HAMILTON, P. B., ARCHIBALD, R. M., PLAZIN, J.: Calculation of hemoglobin from blood specific gravities. J. Biol. Chem. 183, 349-360 (1950).
4. STEINHAUSEN, R. L., PRICE, C. P.: Principles and Practice of Dry Chemistry Systems. In: PRICE, C. P., ALBERTI, K. G. M. N., Hrsg. "Recent Advances in Clinical Biochemistry," Vol.3. Edinburgh, Churchill Livingstone, 273-296 (1985).
5. HÄNDLER, E., KNOLL, D., RIJKEVORSEL, R. v.: The Optical System of Reflotron® for the Precise Reflectance Measurement without any Calibration by the Operator (Abstract). Clin. Chem. 30, 953 (1984).
6. HUBBUCH, A., BOLDUAN, F., DENEKE, U.: Das Reflotron® System: Analysengerät, Reagenzträger und deren Kalibration. (Publikation in Vorbereitung.)
7. ZIJLSTRA, W. G., KAMPEN, E. J. VAN: Standardization of hemoglobinometry. I. The extinction coefficient of hemoglobincyanide. Clinica chim. Acta 5, 719-729 (1960).
8. ZIJLSTRA, W. G., KAMPEN, E. J. VAN: Standardization of hemoglobinometry. III. Preparation and use of a stable hemoglobincyanide standard. Clinica chim. Acta 7, 96-99 (1962).
9. PASSING, H., BABLOK, W.: A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 21, 709-720 (1983).
10. KOLLER, P.: Workshop Report Reflotron® System, Boehringer Mannheim GmbH, S.26 (1985).
11. JAMES, D. R., PRICE, C. P.: Reflotron® Assay of Alanine Aminotransferase and γ -Glutamyltransferase in Whole Blood Samples Evaluated. Clin. Chem. 33, 826-829 (1987).
12. SCHMIDT, K., SCHMIDT, H., KOHLER, M., KELLER, H. E.: Serumaminotransferasenbestimmung mit trägergebundenen Reagenzien. Lab. med. 10, 163-164 (1987).
13. HYAMS, L.: Hemoglobin Evaluation and Donor Acceptance: The Error. Transfusion 7, 432-435 (1967).
14. STROBEL, E., HOWE, J., BÄCKER, U.: Trockenchemische SGPT-Messung im Blutspendewesen. (Publikation in Vorbereitung.)

Anschriften der Verfasser:

Priv.-Doz. Dr. med. D. Weißhaar
 Institut Kassel BSD Hessen des DRK
 Möncheberger-Straße 48 E
 3500 Kassel

Dr. rer. nat. A. Hubbuch und C. Carstensen
 Boehringer Mannheim GmbH
 Sandhoferstraße 116
 6800 Mannheim 31

Lab.med. 12: 11 (1988)

11

Am Ursprung der Infektion

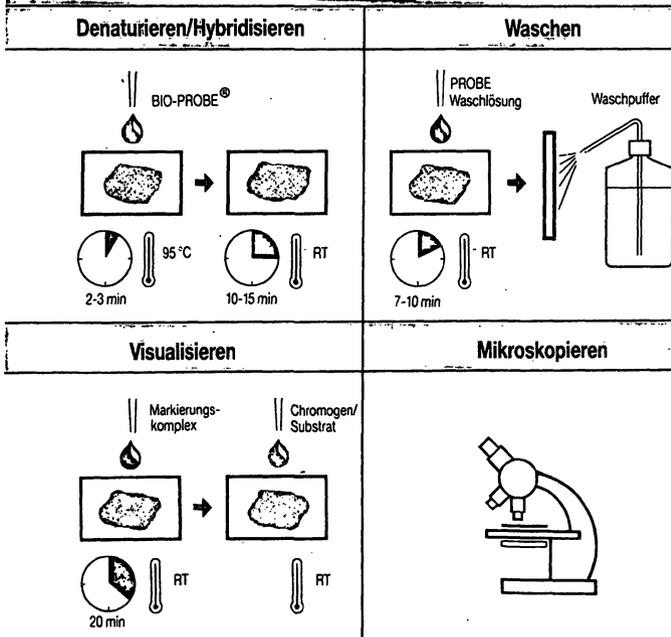
PATHO-GENE™ biotinylierte DNA-Sonden

Direkter Erregernachweis durch In-situ-DNA-Hybridisierung für zytologische und histologische Laboruntersuchungen

ADV5	CMV	EBV
HBV	HSV	Chlamydia

- ⊕ Hochspezifisch
- ⊕ Umweltfreundlich
- ⊕ Einfach und schnell
- ⊕ Sichtbarmachung durch Enzymreaktion
- ⊕ Eindeutige Ergebnisse
- ⊕ Komplettes Kit für 20 Tests

Methode



HI-TECH DIAGNOSTIK

Resultat kreativer Forschung



Ortho Diagnostic Systems GmbH

Karl-Landsteiner-Str. 1 · D-6903 Neckargemünd · ☎ (06223) 77-0
 Bestellruf ☎ 0130/5050 · Bundesweit zum Ortstarif

© ORS 1987