

Zur Verwendung von Primärgefäßen in Analysenautomaten

P. R. Gentner, K. Rowe

St.-Markus-Krankenhaus, Zentrallabor, Frankfurt/M.

Zusammenfassung:

Wir erprobten die Verwendung von Primärgefäßen in einem voll selektiven, patientenorientiert arbeitenden Analysensystem. Unter Routinebedingungen wurden die Veränderungen von 18 Blutbestandteilen (Enzyme, Substrate, Elektrolyte) in Serumproben untersucht, die im Probennahmegefäß nach Zentrifugation längere Zeit über dem Blutkuchen aufbewahrt wurden. Innerhalb von 5 Std. waren nur geringfügige und kaum klinisch relevante Differenzen zu beobachten. Um auch im Einzelfall hämolyse- bzw. diffusionsbedingte Veränderungen von Serumbestandteilen auszuschließen, bemühten wir uns um die Entwicklung eines Ventilfilters, der hinsichtlich seiner Handhabung und Funktionalität Routine-Anforderungen genügt und die Geometrie des Primärgefäßes nicht verändert.

Schlüsselwörter:

Trennhilfe – Probenidentifikation – Labororganisation

Summary:

We tested the use of sampling tubes in a fully selective patient-oriented analytical system. Under routine conditions the changes of 18 parameters (enzymes, substrates, electrolytes) in serum samples stored over clotted blood for several hours were studied. Within 5 hours after centrifugation we hardly found any differences of clinical relevance. In order to avoid changes of parameters in individual samples due to hemolysis or diffusion we could achieve the development of an easy-to-handle serum separator which does not affect the inner or outer shape of the sampling tube.

Keywords:

Serum separator – sample identification – laboratory organization

Einleitung

Die Verteilstrategie im Labor wurde bisher in starkem Maße durch eine parameter-orientierte, serielle Analysenbearbeitung an verschiedenen Arbeitsplätzen bestimmt. Eine „Verteilung“ des Untersuchungsmaterials auf den Stationen durch die Entnahme mehrerer Blutproben in spezifischen Primärgefäßen für verschiedene Arbeitsplätze verlagert das Problem des „Splittings“ aus dem Labor in die Peripherie und bedeutet eine Mehrbelastung von Patienten, Pflegepersonal und Ärzten. Der Aufwand für EDV-gesteuerte Probenverteilstationen ist am ehesten als Unterstützung einer „batch“-orientierten Analysenbearbeitung in Großlaboratorien zu rechtfertigen.

Voraussetzungen für die Verwendung von Primärgefäßen in Analysensystemen und damit für den weitgehenden Verzicht auf eine Probenverteilung im Labor waren

– die Entwicklung von Geräten, welche die Bestimmung einer genügend großen Zahl verschiedener Parameter der klinisch-chemischen Routine-Analytik vollselektiv und patientenorientiert aus einem einzigen Probengefäß mit möglichst geringem Probenbedarf erlauben.

– der Einsatz von Pipettiersystemen mit Sensoren, die sich der Füllhöhe der Probengefäße individuell anpassen und nur wenige Millimeter in das Serum eintauchen,

– die Möglichkeit, den Probenteller des Analysengerätes für die Aufnahme von Primärgefäßen in geeigneter Weise modifizieren zu können, sofern er nicht serienmäßig dafür vorgesehen ist.

Wesentliche Vorteile der Verwendung von Primärgefäßen in solchen Analysengeräten sind in dem zwischen Blutentnahme und Arbeitsplatz im Labor konsequent beibehaltenen Identifikationsprinzip (1) und in der Vermeidung personeller Mehrbelastung sowie zusätzlichen Materialaufwandes zu sehen.

Erste Untersuchungen sollten klären, welche Veränderungen von Konzentrationen bzw. Aktivitäten verschiedener Parameter bei unserem Probennahmesystem zu erwarten sind, wenn das Probennahmegefäß direkt zur Analyse eingesetzt und das Serum bis zu seiner Verwendung ohne zusätzliche Trennhilfe längere Zeit über dem Blutkuchen aufbewahrt wird. Da die statistische Beurteilung dieser Fragestellung den klinisch allein interessierenden Einzelfall nicht ausreichend berücksichtigen kann, bemühten wir uns gleichzeitig um die Entwicklung einer geeigneten Trennhilfe, welche Veränderungen von Serumparametern während der im Rahmen der Routine-Analytik nicht zu vermeidenden Wartezeiten weitestgehend ausschließt. Die Verwendung bisher erhältlicher Trennhilfen war wegen der durch sie veränderten Geometrie des Probengefäßes nicht möglich oder wegen zu hoher Kosten bzw. unbefriedigender Praktikabilität nicht vertretbar.

Material und Methoden

In einer Reihe von Studien untersuchten wir den zeitlichen Verlauf von Blutentnahme, Eintreffen der Proben im Labor und Durchführung der angeforderten Analysen, um die im Rahmen der Routine-Analytik für einzelne Proben denkbaren Wartezeiten abschätzen zu können.

Die Auswahl der auf mögliche Veränderungen während der Lagerung über dem Blutkuchen untersuchten Serumparame-ter erfolgte unter dem Gesichtspunkt einer möglichst vollständigen Abdeckung des bei Neuaufnahmen sowie Ver-laufskontrollen von den Kliniken angeforderten Unter-suchungsspektrums und umfaßt auch Lactat-Dehydrogena-se, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Kalium-Ionen als empfindliche Indikatoren hämolyse- bzw. diffusionsbedingter Effekte.

An 16 Tagen wurden Blutproben von Patienten der internisti-schen und nephrologischen Klinik unseres Krankenhauses in 5 ml-Sicherheitsmonovetten mit gerinnungsförderndem Granu-lat (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) im Rahmen der medizinisch erforderlichen Laboruntersuchungen an das Zentrallabor eingesandt. Nach ihrem Eintreffen wurden die Proben zentrifugiert (10 min; 800 g) und unmittelbar anschließend zur Analyse eingesetzt (Ausgangswert). Die weitere Aufbewahrung des Serums erfolgte ohne Einführung einer zusätz-lichen Trennhilfe bei Raumtemperatur über dem Blutkuchen in den abgedeckten Primärgefäßen. Nach 5 Std. erfolgte eine 2. Analyse der unmittelbar nach Zentrifugation bestimmten Parameter.

In 14 Fällen wurden die LDH-Aktivitäten und K⁺-Konzentrationen nach 1 Std., 3 Std., und 5 Std. sowie in einer zweiten, bei denselben Patienten gleichzeitig abgenommenen Probe unmittelbar nach Zentrifugation bestimmt.

Die Bestimmung von Na⁺ und K⁺ erfolgte mittels ionenselek-tiver Elektroden am Analysenautomaten Hitachi 705 E (Fa. Boehringer Mannheim). α -Amylase bestimmten wir unter Verwendung von Maltotetraose als Substrat (Fa. Human). Die Analyse aller übrigen Parameter wurde mit Reagenzien der Fa. Boehringer Mannheim ebenfalls am Analysenautomaten Hitachi 705 E durchgeführt.

Der statistische Vergleich der nach 5 Std. ermittelten Analy-sendaten mit den Ausgangswerten erfolgte nach der von Haeckel und Schneider (2) vorgeschlagenen Methode der standardisierten Hauptkomponente.

Für den Einsatz von 5 ml-Serummonovetten (Höhe: 56 mm; innerer Durchmesser: 14,5 mm; äußerer Durchmesser: 16,5 mm) am Hitachi 705 wurde der Probeneller durch Vergrößerung der Bohrungen und Anbringen eines die Pro-bengefäße tragenden Bodens abgeändert.

Die Funktionalität der auf der Basis des Ventilfilters (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) weiterentwickelten Trennhilfe wurde in Modellversuchen überprüft: In 10 ml-Sicherheitsmonovetten (Fa. Sarstedt, innerer Durchmesser identisch mit dem der 5 ml-Serummonovette) wurden je 6 ml einer KCl-Lösung vorgelegt (Konzentrationen: 1 mmol/l, 10 mmol/l, 100 mmol/l und 1000 mmol/l), die Ventilfilter aufgesetzt und auf ein Niveau von 5 ml abgesenkt. Die übertretende KCl-

Tab. 1: Veränderung von Serumparametern in nicht vom Blutkuchen abgetrennten Proben. \bar{x}_0 : Mittelwert unmittelbar nach Zentrifugation; \bar{x}_5 : Mittelwert nach weiteren 5 Stunden; SD_{intra} : Standardabweichung in der Serie zum Zeitpunkt der Untersuchung bei vergleichbarem \bar{x} ; Δx_{max} bzw. Δx_{min} : maximal beobachtete Zu- bzw. Abnahme bei Einzelproben; $SD_{\Delta x}$: Standardabweichung der beobachteten Veränderungen; r: Korrelationskoeffizient; a bzw. b: Steigung bzw. Achsenabschnitt der Regressionsgeraden (Methode der standardisierten Hauptkomponente)

Bestandteil	n	\bar{x}_0	\bar{x}_5	bias	SD_{intra}	Δx_{max}	Δx_{min}	$SD_{\Delta x}$	r	a	b
Bilirubin (mg/dl)	97	0,991	0,995	0,004	0,05	0,12	- 0,30	0,06	0,9999	1,0055	-0,002
GOT (U/l)	98	13,11	13,29	0,18	0,2	2	- 3	0,75	0,9993	1,0149	-0,014
GPT (U/l)	98	13,24	12,96	-0,28	0,6	2	- 2	0,70	0,9989	1,0052	-0,350
Alk. Phosph. (U/l)	99	142,3	145,5	3,2	1,7	19	-12	3,9	0,9990	1,0216	0,161
γ -GT (U/l)	99	31,40	32,36	0,96	0,7	5	- 1	1,2	0,9998	1,0177	-0,602
CK-NAC (U/l)	97	43,59	43,41	-0,18	1,7	8	-11	2,4	0,9996	0,9945	0,049
LDH (U/l)	113	224,1	230,6	6,5	3,1	56	-39	10,2	0,9981	0,9869	9,47
α -HBDH (U/l)	98	124,1	126,2	2,1	4,0	33	- 5	5,5	0,9978	1,0071	1,17
CHE (kU/l)	99	4,19	4,27	0,08	0,07	0,31	- 0,17	0,08	0,9986	1,0165	0,008
GLDH (U/l)	85	3,70	3,43	-0,27	0,30	0,8	- 3,3	0,65	0,9939	1,0156	-0,329
α -Amylase (U/l)	86	23,1	24,0	0,86	1,0	2,9	- 2,5	1,4	0,9835	1,0072	0,69
Lipase (U/l)	76	203,2	203,3	0,1	10	26	-35	11,5	0,9986	0,9914	1,8
Na ⁺ (mmol/l)	77	137,5	138,3	0,8	1,4	7	- 4	1,8	0,9012	0,9970	1,22
K ⁺ (mmol/l)	77	4,23	4,29	0,06	0,08	0,26	- 0,11	0,08	0,9891	1,0031	0,05
Ca (mmol/l)	103	2,18	2,22	0,04	0,05	0,19	-0,32	0,08	0,9733	1,0529	-0,03
Creatinin (mg/dl)	108	3,32	3,36	0,04	0,08	0,5	- 0,5	0,12	0,9971	1,0093	0,01
Harnstoff (mg/dl)	111	91,9	95,1	3,2	0,9	12	- 3	3,5	0,9980	1,0029	2,94
Ges.-Eiweiß (g/dl)	78	6,52	6,62	0,10	0,07	0,23	- 0,06	0,07	0,9912	1,0109	0,026

Lösung wurde durch wiederholtes Waschen mit destilliertem Wasser entfernt. Anschließend wurden die Ventilfilter mit 5 ml destilliertem Wasser überschichtet. Sofort sowie nach 1 Std., 4 Std., 24 Std. und 48 Std. wurden nach vorangehendem Durchmischen jeweils 0,5 ml der überstehenden Lösung abpipettiert und einer K^+ -Bestimmung zugeführt.

Ergebnisse

In Abb. 1 sind die in Zeitstudien ermittelten Prüfgrößen (Probennahme, Eintreffen der Proben im Labor und Analysenbearbeitung gegen die Uhrzeit) in Prozent des Gesamtaufkommens dargestellt. Bei einer Spitzenbelastung von 1800 Analysen aus dem mit unseren Geräten Hitachi 705 E abgedeckten Spektrum und einer Rate von 360 Analysen/Std. nach Vorbereitung der Geräte (9.00 Uhr) ist in unserem Labor mit einer maximalen Zeitdifferenz von 4 Std. zwischen Blutentnahme und Durchführung der Routineanalysen zu rechnen. Um denkbare Verzögerungen im Arbeitsablauf mit abzudecken, haben wir bei den Untersuchungen über mögliche Konzentrationsveränderungen von Serumbestandteilen in nicht vom Blutkuchen abgetrennten Proben einen Zeitraum von 5 Std. nach Zentrifugation gewählt.

In Tab. 1 sind die Ergebnisse der Bestimmung von 18 Serumbestandteilen unmittelbar nach Zentrifugation sowie nach weiteren 5 Std. Aufbewahrung über dem Blutkuchen einander gegenübergestellt. Die beobachteten Veränderungen sind im Mittel insbesondere auch für LDH, GOT und K^+ geringer als zunächst erwartet (3–6). Sie liegen nahezu ausnahmslos in der Größenordnung der Standardabweichung der betreffenden Analysenmethode bei vergleichbarem \bar{x} zum Zeitpunkt der Untersuchung. Der statistische Vergleich nach der Methode der standardisierten Hauptkomponente liefert in allen Fällen Ergebnisse, die im Rahmen eines Methodenvergleiches zufriedenstellend interpretiert würden. In einem der untersuchten Fälle wurde jedoch für LDH mit $+56 \text{ U/l}$ ($x_0 = 311 \text{ U/l}$) eine als klinisch relevant zu betrachtende Veränderung der Serumaktivität gefunden. In derselben Probe war ein proportionaler Anstieg der α -HBDH-Aktivität zu beobachten.

Tab. 2 gibt die Veränderungen von LDH und K^+ während der mehrstündigen Lagerung des Serums über dem Blutkuchen in Prozent des Ausgangswertes wieder ($n = 14$). In derselben Tabelle sind die in einer zweiten, gleichzeitig abgenommenen Blutprobe derselben Patienten – gegenüber dem Ausgangswert der ersten – beobachteten Differenzen angegeben. Wohl abhängig von der aktuellen Abnahmetechnik sind die Abweichungen zwischen zwei unmittelbar nacheinander abgenommenen Blutproben z. T. größer als sie bei bis zu 5stündiger Lagerung des Serums über dem Blutkuchen gegenüber dem Ausgangswert festzustellen waren.

In Abb. 2 sind die beiden Ausführungen des Ventilfilters dargestellt. Durch die Entwicklung einer Bajonettverschluss-

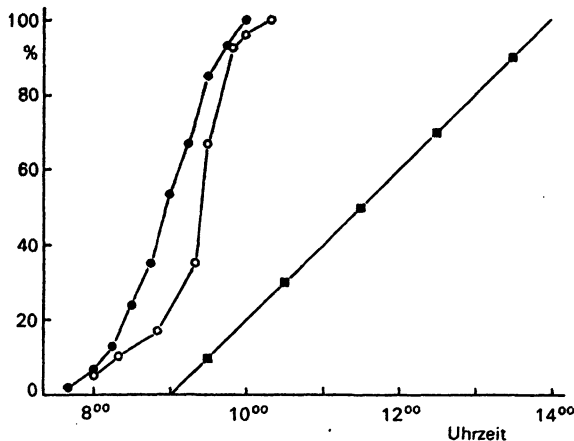


Abb. 1: Integrale Häufigkeitsverteilung von Blutentnahme, Probeneingang und Analysenbearbeitung in Prozent des Gesamtaufkommens. —●—: Blutentnahme; —○—: Probeneingang; —■—: Analysenbearbeitung

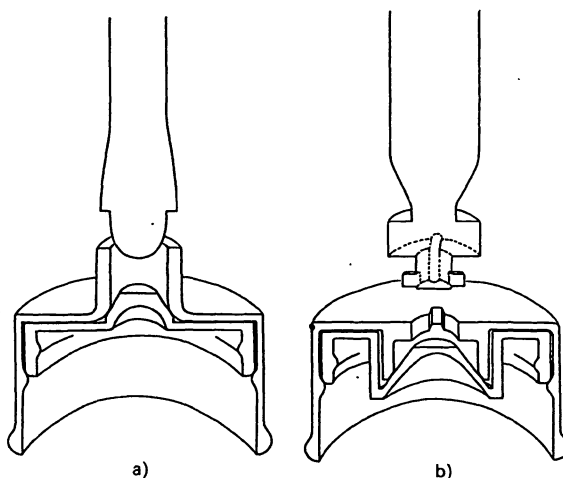


Abb. 2: Bisherige (a) und modifizierte (b) Ausführung des Ventilfilters. Durch Einführen des Stößels wird das Ventil des Serumfilters geöffnet. Durch die feste Koppelung zwischen Stößel und Ventilfilter ist bei der hier vorgestellten, neueren Version das nochmalige Entfernen aus dem Probengefäß bei geöffnetem Ventil und damit ohne Serumverlust möglich

Tab. 2: Für LDH und K^+ gefundene Differenzen im Verlauf der Lagerung von Serum über dem Blutkuchen sowie zwischen zwei gleichzeitig abgenommenen Blutproben derselben Patienten in Prozent des Ausgangswertes der für die Verlaufsbeobachtung bestimmten Probe. Angegeben sind die maximalen positiven und negativen Abweichungen; Mittelwerte in Klammern ($n = 14$)

Bestandteil	Abweichungen in % des Ausgangswertes			
	nach 1 Stunde	nach 3 Stunden	nach 5 Stunden	zweite Probe
Kalium	-1,1 bis +1,3 (+0,3)	-2,3 bis +3,3 (+0,5)	-2,5 bis +5,8 (+1,1)	-3,2 bis +23,1 (+2,9)
LDH	-1,2 bis +6,8 (+2,0)	-1,1 bis +4,0 (+1,6)	-1,7 bis +9,1 (+3,8)	-16,7 bis +12,4 (-1,8)

artigen Koppelung von Ventilfilter und Stößel sowie den dadurch möglichen Verzicht auf einen über die Oberfläche des Filters hinausragenden Führungsschaft wurde erreicht, daß das Ventilfilter – sofern erforderlich – aus dem Probengefäß ohne Serumverlust nochmals entfernt werden kann.

In unseren Modellversuchen zur Funktionalität des modifizierten Ventilfilters wurde innerhalb von 48 Std. eine maximale Zunahme der K^+ -Konzentration in der überstehenden Lösung von 5% der ursprünglichen Konzentrationsdifferenz beobachtet ($n = 40$). Im Mittel lag die Zunahme nach 1 Std., 4 Std., 24 Std. und 48 Std. bei 0,17%, 0,3%, 1,0% bzw. 2,0% der vorgegebenen Konzentrationsdifferenz. Damit erweist sich das neu entwickelte Ventilfilter – wie wohl auch sein Vorgänger – zwar nicht als absolute, für die im Rahmen der Routine-Analytik in Frage kommenden Wartezeiten und möglicherweise auftretenden Konzentrationsdifferenzen aber ausreichend effektive Diffusionsbarriere.

Schlußbetrachtung

Eine neue Generation von Analysengeräten macht es möglich, eine große Zahl von Blutbestandteilen voll selektiv aus maximal 500 μ l Serum oder Plasma eines Patienten zu bestimmen und damit den größten Teil der klinisch-chemischen Routine-Diagnostik aus nicht mehr als 5 ml Blut zu bestreiten. Die patientenorientierte Arbeitsweise dieser Geräte erlaubt es, im Labor eintreffende Proben jederzeit dem Gerät zuzuführen und die angeforderten Untersuchungen aus dem zur Verfügung stehenden Spektrum durchzuführen. Durch Modifikation der serienmäßig verfügbaren Probensteller wurde an unserem Analysengerät Hitachi 705 E auch der direkte Einsatz von Primärgefäßen möglich. Infolge der Belastungsspitzen am Vormittag ist jedoch im Rahmen der Routine-Analytik mit z. T. nicht unerheblichen Wartezeiten der Einzelprobe bis zu ihrer Bearbeitung zu rechnen. Eine Lagerung des Serums über dem Blutkuchen von bis zu 4 Std. würde in jedem Fall allen Bemühungen um eine Standardisierung der prä-analytischen Phase klinisch-chemischer Diagnostik (6–8) zuwider laufen, auch wenn der statistische Vergleich unserer Analysendaten im nicht vom Blutkuchen abgetrennten Serum unmittelbar nach Zentrifugation und nach weiteren 5 Std. die Verwendung von Primärgefäßen ohne zusätzlich eingeführte Trennhilfe durchaus akzeptabel erscheinen läßt. Lediglich im Notfall-Labor ist der Verzicht auf eine sichere Diffusionsbarriere zwischen Blutkuchen und Serum aufgrund der durch die Dringlichkeit der Untersuchung gesicherten zeitnahen Analysenbearbeitung vertretbar. Durch die Entwicklung des neuen

Ventilfilters ist es nun möglich, auch im Rahmen der Routine-Analytik am Analysengerät Hitachi 705 E Primärgefäße einzusetzen und damit die Verwendung von Sekundärgefäßen für einen großen Teil der Untersuchungen zu vermeiden. Die Gefahr von nicht mehr nachvollziehbaren Probenverwechslungen im Labor wird dadurch wesentlich reduziert. Gegenüber Trenngelen auf Silicon-Basis zeichnet sich der Ventilfilter dadurch aus, daß er beim Absenken die Gefäßwand von anhaftenden Blutbestandteilen befreit und beim Einsatz mechanisierter Pipettiersysteme das zu untersuchende Material eindeutig begrenzt.

Schließlich bedeutet der Einsatz des neuen Ventilfilters bei guter Praktikabilität keine Veränderung der Geometrie des Primärgefäßes, wie sie bei anderen Trennhilfen – aufgrund unterschiedlicher Füllhöhen der Probengefäße in z. T. nicht reproduzierbarer Weise – auftreten. Bemühungen um eine Anpassung von Analysengeräten an die Verwendung von Primärgefäßen werden dadurch wesentlich vereinfacht und so auch für andere Systeme eher realisierbar.

Besonderen Dank möchten wir Herrn Hanschke und Herrn Vollmer, Fa. Sarstedt, für die Modifikation der Probensteller unseres Analysengerätes und die sachgerechte Realisierung unserer Änderungsvorschläge aussprechen.

Schrifttum:

1. HAECKEL, R.: Zur Probenverwechslung bei Laboruntersuchungen. *Prakt. Arzt* 2, 323–326 (1976).
2. HAECKEL, R., SCHNEIDER, B.: Statistische Modelle und Verfahren beim Vergleich von Analysenmethoden. *GIT-Labor-Medizin* 2, 97–104 (1980).
3. KELLER, H.: Lagerungsbedingte Fehler bei der Bestimmung von 11 Parametern in heparinisiertem Vollblut und Plasma. *Z. Klin. Chem. Biochem.* 13/6, 217–224 (1975).
4. LAESSIG, R. H., INDRIKSONS, A. A., HASSEMER, D. J., PASKEY, Th. A., SCHWARTZ, Th. H.: Changes in Serum Chemical Values as a Result of Prolonged Contact with the Clot. *Am. J. Clin. Pathol.* 66, 598–604 (1976).
5. LAESSIG, R. H., HASSEMER, D. J., PASKEY, Th. A., SCHWARTZ, Th. H.: The Effects of 0.1 and 1.0 Per Cent Erythrocytes and Hemolysis on Serum Chemistry Values. *Am. J. Clin. Pathol.* 66, 639–644 (1976).
6. GUDER, W. G.: Einflußgrößen und Störfaktoren bei klinisch-chemischen Untersuchungen. *Internist* 21, 533–542 (1980).
7. GUDER, W. G.: Ärztliche und technische Leistungen im medizinischen Laboratorium. XIV. Standardisierung von Verfahren der Probenahme und Probenvorbereitung bei Enzymaktivitätsbestimmungen im Blut. *Lab.med.* 5, 233–235 (1981).
8. JUNGE, B., HOFFMEISTER, H., FEDDERSEN, H.-M., RÖCKER, L.: Standardisierung der Blutentnahme. Einfluß der Stauung auf 33 Blut- und Serumbestandteile. *Dtsch. med. Wschr.* 103, 260–265 (1978).

Anschrift der Verfasser:

Dr. rer. nat. Peter R. Gentner
Dr. med. Klaus Röwe
Zentrallabor des St. Markus-Krankenhauses
Wilhelm-Epstein-Straße 2
D-6000 Frankfurt 50