

Hämolyse als Einflußgröße und Störfaktor

Prof. Dr. L. Thomas, Kirschbaumweg 8, 60489 Frankfurt, Deutschland

E-mail: th-books@t-online.de

Einleitung

Die Hämolyse ist eine nicht zu vernachlässigende Einflußgröße und ein wichtiger Störfaktor mit Bedeutung auf den Laborbefund. Aufgrund der mechanisierten Analytik und nun auch der zunehmenden Automatisierung der präanalytischen Phase gerät die Prüfung des Untersuchungsmaterials auf Hämolyse zunehmend in Vergessenheit. Insbesondere im ambulanten Bereich gehen Vollblutproben aufgrund der zunehmenden Konzentrierung der Laboratoriumsdiagnostik auf eine immer längere Reise. Die Folge ist eine Zunahme hämolytischer Proben, bei denen, auch wenn sie visuell nicht hämolytisch sind, schon ein Austritt intrazellulärer Bestandteile in das Plasma/Serum erfolgt sein kann.

Handelt es sich dabei um Proben von Patienten mit hämolytischem Syndrom (in vivo-Hämolyse) ist im Labor kaum noch eine Abgrenzung von der in vitro-Hämolyse, die meist aus einer unsachgemäßen Blutentnahme resultiert, möglich.

Die Folge sind meist falsch hohe, weniger falsch niedrige Analysenergebnisse oder unvermutet pathologische Werte von z. B. Kalium, LDH, AST, saurer Phosphatase, Neuronspezifischer Enolase.

Zielsetzung dieses Beitrages ist es, auf das Ausmaß hämolytischer Störungen auf den Laborbefund hinzuweisen und somit die Anzahl unsachgemäßer Blutentnahmen zu vermindern.

Hämolyse

Hämolyse ist die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile aus Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten in die extrazelluläre Flüssigkeit, z. B. in das Plasma oder Serum /1/. Visuell wird die Hämolyse nach Zentrifugation der Probe an einer Rotfärbung von Plasma oder Serum erkannt. Die Angaben ab welcher Konzentration freies Hämoglobin als Rotfärbung von Plasma oder Serum erkennbar ist, schwanken in der Literatur zwischen 100 und 300 mg/l.

Hämolyse kann zu Veränderungen einer bestimmten Meßgröße im Untersuchungsgut führen. Sie ist eine Einflußgröße, wenn die Freisetzung der Blutzellbestandteile in vivo, als intravasal erfolgte. Die Hämolyse ist ein Störfaktor, wenn sie nach der Probennahme geschieht und das Untersuchungsergebnis verändert /2/.

Thrombozytolyse und Granulozytolyse können auch ohne visuelle Hämolyse das Untersuchungsergebnis beeinflussen /3/. So ist die Thrombozytolyse beim Gerinnungsvorgang verantwortlich für die höhere Konzentration intrazellulärer Bestandteile im Plasma gegenüber dem Serum. Auch führt ein intravasaler Leukozytenzerfall z. B. zu einer Lysozymerhöhung bei myeloischen und monozytären Leukämien.

Ursachen der Hämolyse

Bei der visuellen präanalytischen Inspektion zentrifugierter Blutproben ist in etwa 60% der Fälle eine Hämolyse die Ursache der Zurückweisung von Proben. In einer Studie /4/ zeigten 3,3% der für klinisch-chemische Untersuchungen ins Labor gesendeten Proben eine Hämolyse. Bei Abklärung der Ursache waren nur 3,2% der hämolytischen Proben durch eine in vivo-Hämolyse bedingt.

In vitro-Hämolyse

Die wesentlichen Fehler, die eine in vitro-Hämolyse bewirken, werden bei der Probennahme gemacht (Tab. 1). Weitere Fehlermöglichkeiten sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 1: Häufige Probennahme-bedingte Hämolysen /4/

- Zu starke Aspiration, insbesondere, wenn oberflächliche Venen punktiert werden. Dabei soll die Aspiration mittels dünner Nadeln weniger Hämolyse verursachen als durch weitlumige, da dann die Flußrate gering und somit die Fließgeschwindigkeit, Turbulenz und Hämolyse klein sein sollen /5/.
- Partielle Obstruktion eines venösen oder arteriellen Katheters. Das hat eine verstärkte Aspiration zur Folge, wenn die Probennahme mit einer Spritze erfolgt.
- Probennahme mit einer Spritze und anschließender Aufteilung der Probe auf mehrere Probenröhrchen.

Tab. 2: Häufige Ursachen für Hämolyse nach Probennahme

- Kräftiges Schütteln des Blutes
- Zentrifugation des Blutes vor kompletter Gerinnung
- Zentrifugation teilgeronnener Proben von antikoagulierten Patienten
- Erzeugung von Unter- oder Überdruck im Probenröhrchen
- Verdünnung des Blutes mit hypotoner Lösung
- Einfrieren und Auftauen von Vollblut
- Lagerung oder Transport von Vollblut über mehrere Tage bei Raumtemperatur /6/

In vivo-Hämolyse

Die in vivo-Hämolyse ist bevorzugt durch Antikörper, biochemisch durch Pharmaka oder toxische Substanzen, hereditärer (z. B. Hämoglobinopathie, Enzymdefekt, Sphärozytose) oder infektiös (z.B. Malaria) bedingt. Bei Verdacht auf in vivo-Hämolyse sollte Plasma untersucht werden, um eine zusätzliche in vitro-Hämolyse auszuschließen /1/.

Erkennung von Hämolys

Visuell ist eine Hämolyse in nicht ikterischen Proben an einer Rotfärbung von Serum und Plasma sicher erkennbar, wenn die Konzentration des freien Hämoglobins über 300 mg/l beträgt /3/. Die Quantifizierung des freien Hämoglobins unterhalb dieser Konzentration erfolgt immunnephelometrisch /7/ oder spektrometrisch mit einer Zweiwellenlängenmethode (z.B. ACA). Die oberen Grenzwerte für Plasma sind 20 mg/l, für Serum 50 mg/l.

Veränderungen im Plasma/Serum durch Hämolyse

Aus Blutzellen freigesetzte Bestandteile, deren Konzentration intrazellulär mehr als 10fach höher als extrazellulär ist, können im Plasma/Serum bei in vivo- und in vitro-Hämolyse deutlich ansteigen. Das betrifft insbesondere Kalium, LDH und die AST. Meßgrößen, die im Serum höher gemessen werden als im Plasma, entstammen den Thrombozyten, z. B. Kalium, Neuron-spezifische Enolase, saure Phosphatase. Die Indikatoren für das Vorliegen einer Hämolyse sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Indikatoren für Hämolyse

- Rotfärbung von Plasma oder Serum
- Unerwartete Erhöhung von Kalium, LDH, AST, saurer Phosphatase, Neuron-spezifischer
- Enolase
- Erniedrigung von Haptoglobin
- Anstieg des indirekten Bilirubins
- Erhöhung des Retikulozytenindex Hämolysen /4/
- Zu starke Aspiration, insbesondere, wenn oberflächliche Venen
- punktiert werden. Dabei soll die Aspiration mittels dünner Nadeln weniger Hämolyse verursachen als durch weiltumige, da dann die

Flußrate gering und somit die Fließgeschwindigkeit, Turbulenz und Hämolyse klein sein sollen /5/.

- Partielle Obstruktion eines venösen oder arteriellen Katheters. Das hat eine verstärkte Aspiration zur Folge, wenn die Probennahme mit einer Spritze erfolgt.
- Probennahme mit einer Spritze und anschließender Aufteilung der Probe auf mehrere Probenröhrchen.

Differenzierung von in vivo- und in vitro-Hämolyse

Wenn auch die in vitro-Hämolyse ungleich häufiger ist als die in vivo- Form, ist die Feststellung letzterer klinisch bedeutsam, da sie pathologischen Ursprungs ist und die zu bestimmenden Meßgrößen für Diagnose, Verlauf und Therapie einer Erkrankung relevant sind. Ein Zurückweisen der Probe oder von Analysenanforderungen wie bei der sicher festgestellten in vitro-Hämolyse ist medizinisch nicht sinnvoll. Deshalb muß eine Unterscheidung der Hämolyseform durchgeführt werden.

In vivo freigesetztes Hämoglobin wird von Haptoglobin gebunden und in das retikuloendotheliale System, bevorzugt der Milz, transportiert. Freies Hämoglobin ist im Plasma erst meßbar, wenn die Transportkapazität des Haptoglobins erschöpft ist. Es ist dann kein Haptoglobin mit immunnephelometrischen oder immunturbidimetrischen Methoden meßbar. Im Referenzbereich liegende Haptoglobinkonzentrationen können gemessen werden bei gleichzeitigem Vorliegen einer Akute-Phase-Reaktion (CRP erhöht) und bei Patienten mit Hypersplenismus. Hyperhaptoglobinämien bei Erhöhung von freiem Hämoglobin im Plasma und Hämoglobinurie sind beim Plasmozytom beschrieben /8/. Beim HELLP-Syndrom kann zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Haptoglobinkonzentration im Plasma noch normal sein, fällt aber innerhalb der darauffolgenden 10 Tage ab /9/.

Bei Verdacht auf ein hämolytisches Syndrom sind der Abfall des Haptoglobins und der Anstieg von LDH, des indirekten Bilirubins und des Retikulozytenindex abhängig vom Ausmaß der Hämolyse. Während bei ausgeprägter Hämolyse Veränderungen von LDH, indirektem Bilirubin und Haptoglobin innerhalb von 24 h auftreten können, erfolgt der Anstieg des Retikulozytenindex frühestens nach 2 Tagen. Eine Erhöhung des indirekten Bilirubins tritt erst auf, wenn die Hämolyserate, die normalerweise 0,8% beträgt, auf über 5% gesteigert ist. Eine LDH-Erhöhung, die eine Verschiebung des LDH-Musters mit guter Nachweisbarkeit von LDH1 und LD_b verursacht, wird bei intravasaler Hämolyse erst gefunden, wenn der Retikulozytenindex größer als 10% ist. Bei einer LDH-Aktivität von 165 U/l, bewirkt eine in vitro-Hämolyse, die ein freies Hämoglobin von 800 mg/l im Serum verursacht, einen gleichzeitigen LDH-Anstieg von 58% /10/. Massive intravasale Hämolysen mit einem Abfall des Hämatokrits um mehr als ein Viertel innerhalb von 12 h führen zu einer Hypertriglyzeridämie. Ein verminderter Triglyzeridmetabolismus, bedingt durch eine reduzierte Mikrozirkulation und/oder die Mobilisation freier Fettsäuren und deren Reesterifizierung zu Triglyzeriden sollen die Ursache sein /11/.

Kriterien zur Unterscheidung von in vivo- und in vitro-Hämolyse sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4: Differenzierung der Hämolyseformen /1/

In vitro-Hämolyse

- Parallele Erhöhung von Hämoglobin (Rotfärbung von Plasma/Serum), Kalium, LDH, AST, aber Haptoglobin und Retikulozytenindex normal.
- Unerwartete Erhöhung von Kalium, aber keine Rotfärbung von Plasma/Serum; LDH im Referenzbereich. Tritt z. B. auf bei mehrtägiger Lagerung von Vollblut.

In vivo-Hämolyse

- Parallele Erhöhung von Hämoglobin (Rotfärbung von Plasma/Serum) und LDH ohne parallelen Anstieg von Kalium.
- Keine Rotfärbung von Plasma/Serum, aber Erniedrigung von Haptoglobin und eventuell Erhöhung von LDH, von indirektem Bilirubin und/-oder des Retikulozytenindex.
- Keine Rotfärbung des Serums, aber Erhöhung von LDH, Kalium und saurer Phosphatase. Im Plasma kein Anstieg dieser Meßgrößen. Tritt z. B. auf bei Zuständen mit Thrombozytose

Hämolyse als Störfaktor

- Aus Blutzellen in das Plasma/Serum freigesetzte Substanzen können aus folgenden Gründen zur Veränderung einer zu bestimmenden Meßgröße führen:
 - Erhöhung oder Verminderung der Konzentration der Meßgröße aufgrund eines Konzentrationsgradienten zwischen Erythrozyten und Plasma.
 - Störung der chemischen Reaktion einer Methode durch eine aus Blutzellen freigesetzte Substanz. So stört die Peroxidaseaktivität von Hämoglobin die Bilirubinbestimmung und freigesetzte Adenylatkinase die Bestimmung der CK.
 - Optische Interferenz durch Veränderung des molaren Extinktionskoeffizienten des zu messenden Substrates oder Produktes der Analysenreaktion durch Hämoglobin. Hämoglobin absorbiert stark Licht bei 415 nm (Soret-Bande). Hämolyse addiert Absorption und bewirkt eine scheinbare Erhöhung der gemessenen Konzentration.

Die Störung klinisch-chemischer Tests durch Hämolyse ist vielfach publiziert worden /12–14/. Eine Auflistung häufig gestörter Meßgrößen zeigt Tab. 5.

Tab. 5: Störungen von Meßgrößen bzw. Methoden durch Hämolyse

Meßgröße/Methode

Hinweis Aspartataminotransferase (AST)

Die Aktivität der AST im Erythrozyten ist 40mal höher als im Plasma. Bei Serumaktivitäten im Entscheidungsbereich verursacht eine in vitro-Hämolyse von 1,5 g/l falsch hohe Werte durch AST-Addition/12/.

Bilirubin

Zu niedrige Konzentrationen werden mit der Jendrassik-Gróf-Methode gemessen, da die Pseudoperoxidaseaktivität von Hämoglobin die Diazofarbstoffbildung hemmt. Die Hemmung tritt auf, wenn die freie Hämoglobinkonzentration im Serum höher als 0,8 g/l ist /12/.

Creatinkinase (CK)

Aus Erythrozyten freigesetzte Adenylatkinase erhöht die enzymatisch gemessene CK- und CK-MBAktivität. Die zum Reaktionsgemisch addierte Adenylatkinase kann nicht mehr durch vorhandenes AMP und Diadenosinpentaphosphat gehemmt werden. Es resultiert eine Erhöhung des Meßsignals.

Eisen

Potentiell ist Hämoglobin eine große Quelle für Eisen. Da aber die Eisen-Porphyrinbindung stärker als die Eisen-Transferrinbindung ist und die Eisenbestimmungsmethoden das Transferrin-gebundene Eisen messen, ist der additive Eiseneffekt bei Hämolyse gering /14/.

Gesamteiweiß

Der additive Effekt von Hämoglobin zum Gesamteiweiß ist zwar gering, aber signifikant.

Harnsäure

Erst hohe Hämoglobinkonzentrationen bewirken erniedrigte Serumwerte. Die Uricase-Katalase-Methode (Kageyama-Reaktion) ist störanfälliger als die Uricase-Peroxidase-Methode (Trinder-Reaktion).

Kalium

Die Kaliumkonzentration im Erythrozyten ist etwa 25mal höher als im Plasma. Auch bei durch Rotfärbung nicht sichtbarer in vitro-Hämolyse (< 0,3 g freies Hämoglobin/l) steigt die Kaliumkonzentration an. Das ist z. B. der Fall bei mehrstündigem Stehen von Vollblut mit niedrigen Glucosewerten bei Raumtemperatur.

Anorganisches Phosphat

Blutzellen haben einen hohen Phosphorgehalt, der aber organisch als Ester gebunden ist. Die Addition organischer Phosphatester zum Serum kann dort zu einer Freisetzung von anorganischem Phosphat führen, woraus falsch hohe Phosphatkonzentrationen resultieren können. Serum sollte deshalb innerhalb von 2 h von den Erythrozyten getrennt werden.

Serumeiweiß- Elektrophorese

Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexe wandern zwischen der α_2 - und α -Globulinfraktion, freies Hämoglobin als diffuse rötliche Bande in der α -Globulinfraktion.

Immunoassays

Wie die Meßgrößen der klinischen Chemie sind auch Immunoassays von den Diagnostikaherstellernauf Störungen durch Hämolyse geprüft und enthalten entsprechende Angaben. Nicht selten erfolgt die Prüfung auf den Störfaktor Hämolyse nur durch die Zugabe von Hämoglobin, meist wird humanes Methämoglobin verwendet. Bei vermuteter Störung eines Immunoassays durch Hämolyse darf jedoch nicht Hämoglobin mit Hämolyse gleichgesetzt werden, da außer Hämoglobin auch andere Inhaltsstoffe von Blutzellen den Immunoassay stören können. Es ist deshalb wichtig, beim Diagnostikahersteller nachzufragen wie die Prüfung auf Hämolyse erfolgte

Literatur

1. Guder W. Haemolysis as an influence and interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 125–6.
2. Guder W. Einflußgrößen und Störfaktoren bei klinisch-chemischen Untersuchungen. *Internist* 1980; 21: 533–42.
3. Guder W, Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt M, Töpfer G, Wisser H, Zawta B. Die hämolytische, ikterische und lipämische Probe. Empfehlungen zur Erkennung und Vermeidung klinisch relevanter Störungen. *DG Klinische Chemie-Mitteilungen* 1999; 30: 167–77.
4. Carraro P, Servidio P, Plebani M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or clinical challenge? *Clin Chem* 2000; 46: 306–7.
5. Moss G, Staunton C. Blood flow, needle size and hemolysis. Examining an old wives' tale. *N Engl J Med* 1970; 282: 967.
6. Heins M, Heil W, Withold W. Storage of serum or whole blood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 231–8.
7. Lammers M, Gressner AM. Immunnephelometric quantification of free hemoglobin. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25:363–7.
8. Lohse A, Schmitz-Reinhard B. Hyperhaptoglobinämie bei Plasmozytom und Hämolyse. *Dtsch Med Wschr* 1985; 110: 1433–4.
9. Wilke G, Rath W, Schutz E, Armstrong VW, Kuhn W. Haptoglobin as a sensitive marker of hemolysis in HELLP-syndrome. *Int J Gynecol Obstet* 1992; 39: 29–34.

10. Podlasek SJ, McPherson RA. New lactate dehydrogenase-IgM complexes. *Laboratory Medicine* 1989; 20: 617–9.
11. Druml W, Grimm G, Laggner AN, Schneeweiß B, Lenz K. Hyperlipidemia in acute hemolysis. *Klin Wochenschr* 1991; 69: 426–9.
12. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 127–39.
13. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem* 1986; 32: 470–5.
14. Grafmeyer D, Bondon M, Machon M, Levillain P. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analyzers. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 31–52.