

6. Dati F, Scumann G, Thomas L, Aguzzi F, Baudner S, Bienvenu J, Blaabjerg O, et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against IFCC/BCR/CAP reference material (CRM470). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 517-520.

Summary

What is wrong with the measurement of caeruloplasmin? Status quo after recalibration. Klasen IS, Kat Angelino C de, Baadenhuijsen H. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 140-145.

After the introduction of the new protein reference serum CRM 470 by the BCR (Bureau Communautaire de Référence), the between laboratory coefficients of variation (CV's) observed in the Netherlands External Quality Assessment surveys for the measurement of serum proteins are favourably diminished. However, the introduction of this new reference serum was relatively of little influence on the CV's of caeruloplasmin. The results of the two largest suppliers involved still form two different populations. The possible causes of this are discussed here and are followed by recommendations for the usage of buffer, antiserum and calibration serum.

Key-words: CRM470; caeruloplasmin; nephelometry; radial immuno diffusion

Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 145-147

De invloed van heparine op de meting van geïoniseerd calcium: bloedafname systemen nader bekeken

H.J. HUIJGEN, H.J.S. OOSTROM, J.L.S. DOLS en G.T.B. SANDERS

Alvorens op het Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie de meting van geïoniseerd calcium (iCa^{2+}) in bloed aan het bepalingenpakket werd toegevoegd, is onderzocht of de regulier gebruikte hepariniseerde bloedafnamebuizen en spuitjes voor deze bepaling geschikt zijn, aangezien heparine iCa^{2+} kan binden, leidend tot een vals-verlaagde uitslag.

Bij zeven vrijwilligers werd bloed afgenomen in alle gebruikte typen monsterbuizen, inclusief een serumbuis. Het gemiddelde verschil tussen de iCa^{2+} concentratie in plasma of volbloed en de iCa^{2+} concentratie in serum kon zo per type monsterbuis worden bepaald. De sterkste daling (-7,3%) werd gemeten in de monsters met de hoogste heparine concentratie (32 U/ml). Alleen metingen verricht in bloedmonsters afgenomen met de bloedgasspuit (heparine hoeveelheid 7 Units) leidden tot iCa^{2+} concentraties die niet significant afwijkend waren van de iCa^{2+} concentraties in serum ($p > 0,05$).

Dit resultaat heeft in ons ziekenhuis tot de afspraak geleid dat de meting van iCa^{2+} alleen wordt uitgevoerd in bloedmonsters afgenomen met de ziekenhuisbreed ingevoerde bloedgasspuit.

Trefwoorden: heparine; plasma; geïoniseerd calcium; pré-analytische fase

Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, Academisch Medisch Centrum, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam

Correspondentie: Drs. H.J. Huijgen, Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie, F1-217, Academisch Medisch Centrum, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam.
Ingekomen: 04.02.98

Onlangs is het Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie (LAKC) van het Academisch Medisch Centrum (AMC) uitgerust met bloedgasanalyzers die voorzien zijn van een natrium, kalium en calcium ion-selectieve elektrode. Hierdoor werd het mogelijk om op verzoeken vanuit de kliniek (intensive care afdeling volwassenen) tot het meten van geïoniseerd calcium (iCa^{2+}) in bloed in te gaan. Voordat met de invoering van deze bepaling werd gestart is eerst de invloed van heparine hierop onderzocht, als een belangrijk onderdeel van de pré-analytische fase. Van heparine is bekend dat het in staat is om iCa^{2+} te binden, waardoor deze vrije calcium fractie wordt verlaagd (1, 2). Wij hebben daarom van alle, door het LAKC geaccepteerde, hepariniseerde bloedafname systemen (zie tabel 1) vastgesteld of deze een significante verlaging van iCa^{2+} veroorzaken ten opzichte van de iCa^{2+} meting in serum: de gouden standaard. Aangezien ook andere laboratoria in Nederland met deze problematiek te maken zouden kunnen hebben of krijgen, hebben wij besloten om de in deze studie verkregen resultaten te rapporteren.

Uitvoering

Zeven vrijwilligers werden veneus geprikt met een vleugelnaald/butterfly inclusief slangetje (Vacutainer ref. 607261, Becton & Dickinson BV, Leiden, Nederland). In één afname werden achtereenvolgens de monsterbuizen A t/m D, de bloedgasspuiten (E, F) en de Microtainer tubes (G, H) gevuld. Een overzicht van deze bloedafname systemen samen met de heparine concentratie staat vermeld in tabel 1. Voor het vullen van de bloedgasspuitjes en de Microtainer tubes werd het vacuumsysteem opzetstuk van het slangetje verwijderd. De heparinebuis (B) werd direct na afname 10 minuten bij 1550 g gecentrifugeerd en

Tabel 1. Geteste bloedafname systemen

Code	Type buis, cupje of spuit	Monster volume	Heparine concentratie U/ml
A	Vacutainer System, Hemogard Z 4,5 ml ref. 36624, B&D (plain tube)	4,5 ml (vol)	0
B	Vacutainer System, Hemogard LH 4,5 ml, ref. 367684, B&D (LiHep 143 IU)	4,5 ml (vol)	32
C	Vacutainer System, Hemogard LH 4,5 ml, ref. 367684, B&D (LiHep 143 IU)	4,5 ml (vol)	32
D	Vacutainer System, Hemogard LH 7,0 ml, ref 367685, B&D (LiHep 143 IU)	7,0 ml (vol)	20
E	Arterial Blood Sampler, Rapidlyte Auto-Venting 3cc, Ciba Corning (LiHep 7 IU)	2 ml	4
F	Arterial Blood Sampler, Rapidlyte Auto-Venting 3cc, Ciba Corning (LiHep 7 IU)	1 ml	7
G	Microtainer Brand Tube with LiHep 800 µl, No. 365971, B&D (LiHep 10-30 IU)	800 µL	13-38
H	Microtainer Brand Tube with LiHep 800 µl, No. 365971, B&D (LiHep 10-30 IU)	400 µL	25-75

A: serum; B: plasma; C t/m H: volbloed; LiHep: Lithium heparine; B&D: Becton en Dickinson BV Vacutainer Systems, Leiden, Nederland.

de stolbuis (A) 30 minuten na afname. Serum en plasma werden niet afgepipetteerd. Alle metingen, zowel in serum (A), plasma (B) als volbloed (C t/m H), werden binnen 15 minuten na afname of centrifugatie in enkelvoud uitgevoerd met een Ciba Corning bloedgasanalyzer type 865 (Ciba Corning Diagnostics Corp., Medfield, MA, USA) met een nauwkeurigheid van de pH en iCa^{2+} meting van respectievelijk 0,07 en 1,8% (bepaald volgens EP5 protocol, NCCLS richtlijnen).

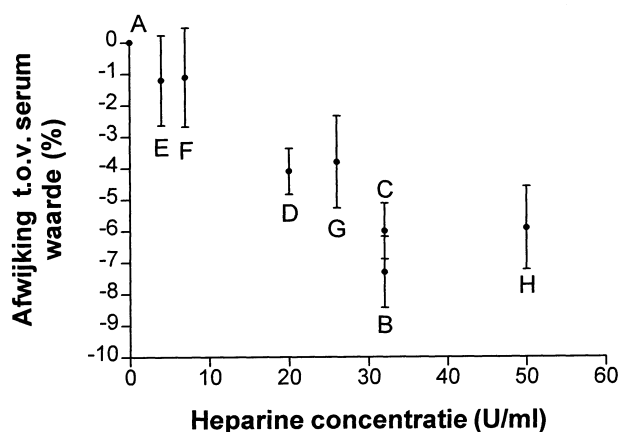
Het verschil tussen de gemeten actuele iCa^{2+} concentratie in plasma of volbloed en de iCa^{2+} concentratie in serum werd voor elke gehepariniseerde monsterbuis per bloedafname berekend. Uit de 7 bloedafnames (7 vrijwilligers) kon vervolgens de gemiddelde afwijking met bijbehorende standaard deviatie (SD) per type monsterbuis worden bepaald. Of de iCa^{2+} concentratie in de gehepariniseerde monsterbuizen significant afwijkt van de iCa^{2+} concentratie in de serumbuis is vastgesteld met de Wilcoxon test (gepaard, significantie niveau 0,05).

RESULTATEN en DISCUSSIE

In figuur 1 staan de gemiddelde afwijkingen inclusief de SD's voor de iCa^{2+} concentratie in gehepariniseerd plasma en volbloed ten opzichte van de iCa^{2+} concentratie in serum grafisch weergegeven. De procentuele afwijkingen, verschil gedeeld door iCa^{2+} concentratie, zijn berekend aan de hand van iCa^{2+} concentraties in serum, variërend van 1,15 tot 1,23 mmol/l. Omdat volgens de fabrikant de hoeveelheid heparine in de Microtainer cupjes varieert (zie tabel 1) is in figuur 1 voor dit afname systeem de gemiddelde heparine concentratie uitgezet, namelijk 26 en 50 U/ml. In 46 van de 49 metingen (7 vrijwilligers maal 7 gehepariniseerde afnamebuizen) werd een lagere iCa^{2+} concentratie gemeten dan in de serummonsters.

De drie heparinemonsters waarin een hogere iCa^{2+} concentratie werd gemeten, in alle drie gevallen +0,01 mmol/l, waren alle afgenomen met de bloedgasspuiten. Alleen metingen verricht in bloedmonsters afgenomen met dit afnamesysteem leidden tot iCa^{2+} concentraties die niet significant afwijkend waren van de iCa^{2+} metingen in serum (E: $p=0,08$; F: $p=0,13$). De sterkste daling van de iCa^{2+} concentratie werd gemeten in de monsters met de hoogste heparine concentratie: de 4,5 ml lithiumheparine buizen (B,C) en de half gevulde Microtainer tubes (H).

De concentratie van de vrije calciumfractie wordt mede bepaald door de pH van het bloedmonster. Stijging van de pH, vaak door verlies van CO_2 , veroorzaakt daling van de iCa^{2+} concentratie. Er zijn daarom algoritmen ontwikkeld om de gemeten iCa^{2+}



Figuur 1. De invloed van heparine op de meting van iCa^{2+} . De punten geven de gemiddelde afwijking \pm SD in de iCa^{2+} concentratie gemeten in gehepariniseerd bloed of plasma weer, ten opzichte van de iCa^{2+} concentratie gemeten in serum. De letters in de figuur corresponderen met de letters genoemd in tabel 1.

concentratie terug te rekenen naar de iCa^{2+} concentratie bij pH 7,4. Een veel gebruikte vuistregel is dat iedere 0,1 eenheid pH verandering voor 5% verandering in de concentratie iCa^{2+} zorgt. De in dit experiment gemeten pH's in de gehepariniseerde volbloed buizen C, D, E en F zijn significant lager dan de pH's gemeten in serum (maximaal gemiddeld verschil 0,05 pH eenheden \pm 0,02 (SD), gemiddelde pH serum buis A 7,41 en gemiddelde pH heparine buis C 7,36). Tussen serum en plasma werd geen significant verschil in pH aangetoond ($p=0,33$). Het pH verschil tussen serum of plasma en volbloed heeft een meettechnische oorzaak, namelijk een verschil in het liquid-junction potentiaalverschil tussen de vloeistof van de referentie elektrode en het monster (serum/plasma versus volbloed) (3). De aanwezigheid van erythrocyten in het volbloedmonster zorgt voor een stijging van het liquid-junction potentiaal wat zich vertaalt in een daling van de pH. Dit fenomeen geldt uiteraard ook voor de calcium meting. Hierbij veroorzaakt de aanwezigheid van erythrocyten in het bloedmonster een stijging van de gemeten iCa^{2+} concentratie (vergelijk monster B en C in figuur 1), waarbij de mate van stijging afhankelijk is van het type referentie elektrode (3). Uit de resultaten van deze studie blijkt echter dat dit liquid-junction potentiaal fenomeen door de aanwezigheid van heparine in de volbloedmonsters volledig gecorrigeerd wordt. Per saldo treedt een daling van de iCa^{2+} concentratie op. In de Microtainer tubes werd geen significant lagere pH gevonden (G: pH verschil 0,01 $p=0,14$; H: pH verschil 0,00 $p=0,73$). De verklaring hiervoor is de manier van bloedafname. De cupjes zijn druppelsgewijs gevuld na ontkoppelen van het vacuumsysteem opzetsstuk. Hierdoor trad verlies op van CO_2 , stijging van de pH en dus compensatie van de normaliter in volbloed gemeten lagere pH.

Conclusie

Samengevat kan geconcludeerd worden dat van alle door het LAKC geaccepteerde gehepariniseerde bloedafnamesystemen alleen de bloedgaspuit met daaraan toegevoegd 7 units lithiumheparine geschikt is voor de meting van iCa^{2+} in bloed. De hoeveelheid heparine is zelfs zo gering dat ook een half gevulde bloedgaspuit niet tot onacceptabele afwijkingen in

de iCa^{2+} concentratie leidt. Een mogelijke tweede kandidaat is de Microtainer tube, mits geheel gevuld. Twee nadelen van laatstgenoemde afnamesysteem, dat in ons ziekenhuis bij kinderen wordt gebruikt, zijn de wisselende heparine concentratie en de grote kans op CO_2 verlies. Bij een moeizame bloedafname zal hierdoor de pH tot onacceptabele hoge waarden stijgen. Daarom is in het AMC tussen het LAKC en kliniek afgesproken dat de meting van iCa^{2+} alleen wordt uitgevoerd in bloedmonsters afgenomen met de ziekenhuisbreed ingevoerde bloedgaspuit.

Literatuur

1. Sachs Ch, Rabouine Ph, Chaneac M, Kindermans C, Dechaux M, Falch-Christiansen T. Pre-analytical errors in ionized calcium measurements induced by the use of liquid heparin. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 167-73.
2. Van Ingen HE, Huijgen HJ, Kok WTh, Sanders GTB. Analytical evaluation of Kone Microlyte determination of ionized magnesium. *Clin Chem* 1994; 40: 52-5.
3. Durst RA, Siggaard-Andersen O. Electrochemistry. In "Tietz Textbook of Clinical Chemistry", 2e editie, hoofdstuk 5. Philadelphia: WB Saunders company, 1994.

Summary

The influence of heparin on the measurement of ionized calcium: sample tubes examined. Huijgen HJ, Ostrom HJS, Dols JLS and Sanders GTB. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 145-147.

Recently we started in the Laboratorium voor Algemene Klinische Chemie (LAKC) with the determination of ionized calcium (iCa^{2+}) in blood. Since heparin is known for binding iCa^{2+} , we first established the suitability of the regularly used heparinized sample tubes for this determination.

Blood was obtained from seven volunteers using all different types of sample tubes accepted by the LAKC, including one serum tube. The mean difference between the iCa^{2+} concentration in plasma or wholeblood, and the iCa^{2+} concentration in serum was established per sample tube type. The strongest decrease in iCa^{2+} (-7.3%) was found in samples with the highest heparin concentration (32 U/ml). Only measurements performed in bloodsamples obtained with the arterial blood syringes (amount of heparin 7 Units) did not lead to iCa^{2+} concentrations lower than those in serum ($p>0.05$).

This finding resulted in the agreement that iCa^{2+} measurements will only be performed in bloodsamples obtained with the hospital-wide introduced arterial blood syringe.

Key-words: heparin; plasma; ionized calcium; blood specimen collection