

De rol van monstertransport en biologische variatie in erythrocytair kaliumverlies in het ontstaan van pseudo-hyperkaliëmie

M.J. VOS^{1,*}, M.J. FOKKERT^{1,*}, N. JONKER², J.W. BOUWHUIS³, S.H. DIEPEVEEN³,
J.A. van APELDOORN⁴ en L.D. DIKESCHEI¹

Afkoeling van afgenomen bloedmonsters beneden kamertemperatuur leidt tot een temperatuurs- en tijdsafhankelijke vermindering van opname van kaliumionen door erythrocyten en daarmee tot een verhoging van de plasma kaliumconcentratie door continu passief verlies van kaliumionen uit erythrocyten. Wij hebben onderzocht in welke mate dit fenomeen een rol speelt binnen ons transportproces met als doel het terugdringen van pseudo-hyperkaliëmie. Daarnaast is in kaart gebracht wat de te verwachten stijging van de plasma kaliumconcentratie is bij verschillende temperaturen en incubatieperiodes.

Kaliumuitslagen van bloedmonsters afgenomen binnen en buiten het ziekenhuis werden uit het laboratorium informatie systeem verkregen. Bepaling van de toename in kaliumconcentratie werd verricht in het laboratorium door afkoeling van bloed gevolgd door analyse op een bloedgasapparaat.

Bloedmonsters voor een kaliumbepaling die zijn afgenomen buiten het ziekenhuis moeten onder goed geconditioneerde omstandigheden worden vervoerd en bij voorkeur binnen 2 uur worden verwerkt. Echter, bij de familiale vorm van pseudo-hyperkaliëmie zal ook onder deze omstandigheden een vals verhoogde kaliumuitslag kunnen worden gevonden wat het correct bepalen van de kaliumconcentratie in bloedmonsters afgenomen buiten het ziekenhuis tot een blijvende uitdaging maakt.

Als klinisch chemisch laboratorium krijgen wij een aantal maal per jaar vragen van huisartsen en medisch specialisten over incidenteel hoge kaliumuitslagen bij patiënten waarbij geen klinisch bewijs bestaat voor hyperkaliëmie. Hyperkaliëmie wordt gedefinieerd als een kaliumconcentratie groter dan 5,0 mmol/L. Een kaliumwaarde boven de 6,0 mmol/L wordt als een ernstige hyperkaliëmie beschouwd waarvoor onmiddellijke behandeling noodzakelijk wordt geacht. Veelal wordt een gestuwde afname of hemolyse door het afnameproces als mogelijke oorzaak benoemd

naast andere mogelijke pre-analytische oorzaken (1). Echter, in de meeste gevallen blijkt van bovenstaande oorzaken geen sprake waardoor de behandelend arts geen handvat kan worden geboden om een toekomstige pseudo-hyperkaliëmie te herkennen en te voorkomen. Om de oorzaak van pseudo-hyperkaliëmieën te achterhalen, hebben wij de afname- en verwerkingsprocedure van bloedmonsters afgenomen buiten het ziekenhuis in de regio Zwolle onderzocht. Het is bekend dat afkoeling van afgenomen bloed tot een verhoging van de plasma kaliumconcentratie kan leiden door lekkage van kalium uit erythrocyten (2-4). Echter, de mate waarin dit binnen ons transportproces een rol speelt was niet bekend. Het laboratorium van Isala bestrijkt een adherentiegebied van 600.000 inwoners en heeft een oppervlakte van ruim 1000 km² waarbij de tijd tussen bloedafname en laboratoriumuitslag kan oplopen tot 6 uur. Er werd onderzocht wat de rol van de buitentemperatuur en transporttijd is op het ontstaan van hyperkaliëmie en de mogelijke rol hiervan bij SEH-opnames met de diagnose pseudo-hyperkaliëmie. Hieruit kwam naar voren dat ons transportproces in hoge mate beïnvloed wordt door de buitentemperatuur en dat een lage transporttemperatuur tot een toegenomen plasma kaliumconcentratie leidt. Daarnaast blijkt binnen de patiëntenpopulatie grote variatie te bestaan in de mate van erythrocytair kaliumverlies bij lage temperatuur.

Methoden

Patiënten

Kaliumuitslagen uit de maanden juli en november 2013 werden verkregen uit de database van het laboratorium informatiesysteem GLIMS en gesorteerd op interne (bloedafnamelocatie Isala) en externe afnames (huisartspraktijken en afnames aan huis). De verkregen data werden geanonimiseerd verwerkt. Voor patiënten waarbij een SEH-opname noodzakelijk was wegens hyperkaliëmie (tabel 1) werd in overleg met de behandelend arts vervolgonderzoek ingezet naar de oorzaak. Hiervoor werd éénmalig 5 mL bloed afgenomen bij de desbetreffende patiënten.

Erythrocytenafkoelingsexperiment

Om het effect van lage temperatuur op de lekkage van kalium uit erythrocyten te bepalen werd per patiënt het afgenomen bloed (BD Vacutainer lithium heparine (17 IU/mL), zonder gel) verdeeld in 1 mL porties in 1,5 mL reactievatjes. De monsters werden bij verschillende temperaturen geïncubeerd in een Thermomixer

Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala¹; Zwolle Certe Medisch Laboratorium, Assen²; Interne Geneeskunde, Isala, Zwolle³; Groepspraktijk Huisartsen Heerde⁴

**gedeeld eerste auteurschap*

Correspondentie: dr. L.D. Dikkeschei, Klinisch Chemisch Laboratorium, Isala, Postbus 10400, 8000 GK Zwolle

E-mail: L.D.Dikkeschei@isala.nl

(Eppendorf) uitgerust met een metalen houder voor 1,5 mL-reactievatjes. Bepaling van de kaliumconcentratie vond plaats op de aangegeven tijdstippen gemeten met een ABL800 FLEX bloedgasapparaat (Radiometer). Ter uitsluiting van hemolyse als oorzaak van de toename van de kaliumconcentratie werd aan het begin en einde van het experiment het vrije hemoglobine en de lactaat dehydrogenase activiteit bepaald met behulp van een COBAS 8000 analyseapparaat (Roche).

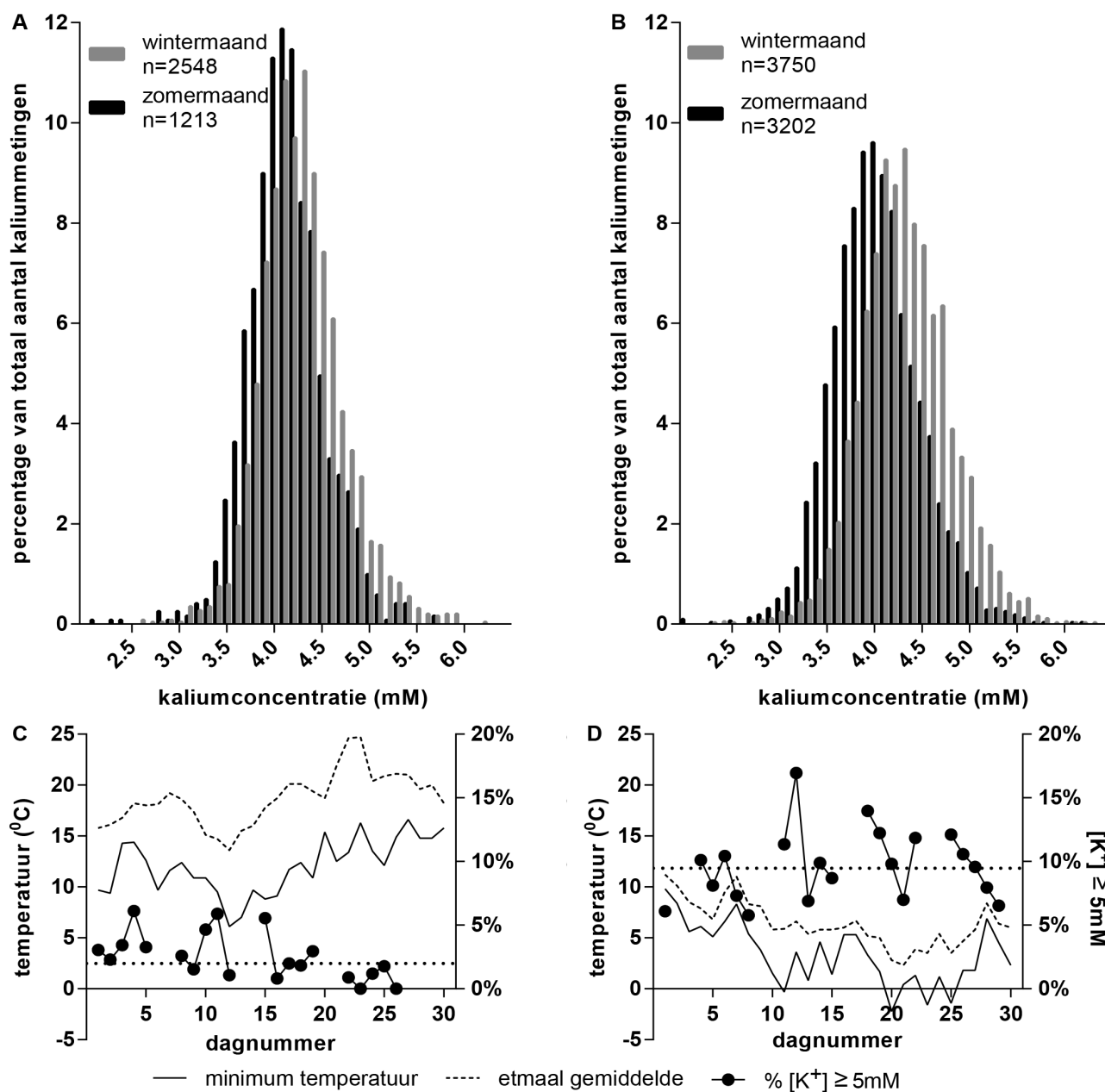
Temperatuurlogging

De temperatuur in de gebruikte transportkoffers (Transposafe Medicooltainer T-loc EPP) werd per

minuut gemeten met behulp van Escort iLog temperatuurloggers. Temperatuurloggers werden aan het einde van de werkdag uitgegeven. De volgende dag werd bij binnenkomst op het laboratorium het databestand met temperatuurgegevens uitgelezen.

Statistiek

De kaliumuitslagen gemeten in juli en november 2013, afgenomen binnen en buiten het ziekenhuis, werden geanalyseerd met behulp van de Kolmogorov-Smirnov test. Een P-waarde <0,05 werd als significant beschouwd.



Figuur 1. (A) Een frequentieverdeling van kaliumconcentraties gemeten in juli en november 2013 (intern afgenomen) laat een significante verschuiving zien van de gemiddelde waarde met 0,15 mmol/L tussen beide maanden en een toename van 3,3% van kaliumconcentraties > 5 mmol/L in november. (B) Voor kaliumconcentraties in monsters afgenomen buiten het ziekenhuis neemt de gemiddelde kaliumwaarde significant toe met 0,35 mmol/L met daarbij een stijging van 7,5% van kaliumconcentraties > 5 mmol/L. (C) Monitoring van het percentage hyperkaliëmieën ($\geq 5\text{mmol/L}$) per werkdag en de daarbij gemeten minimumtemperatuur en etmaal gemiddelde temperatuur voor de maanden juli 2013 en (D) november 2013.

Tabel 1. Overzicht van SEH-patiënten met hyperkaliëmie.

Casus	Geslacht	Leeftijd	Hyperkaliëmie waarde (mM)	Heranalyse K op SEH (mM)	Opgegeven oorzaak in EPD	Gemiddelde buitentemperatuur (°C)
1	V	75	6,5	4,4	niet opgegeven	7,3
2	V	19	8,1	3,4	hemolytisch monster	5,9
3	V	64	9,7	4,0	gestuwde afname	-4,9
4	M	53	6,5	4,7	gestuwde afname	4,9
5	M	62	7,4	3,7	gestuwde afname	3,2

Resultaten

Het effect van de buitentemperatuur op kaliumuitslagen

Om de mogelijke rol van de omgevingstemperatuur op de kaliumuitslagen binnen ons transportproces in kaart te brengen werden twee maanden met elkaar vergeleken waarvan de gemiddelde minimumtemperatuur sterk verschild. Voor de maand juli 2013 betrof de gemiddelde minimum buitentemperatuur 12,2 °C, voor de maand november 2013 betrof deze 3,4 °C (KNMI-meetpunt Heino). Van deze twee maanden werden de kaliumuitslagen, afgenomen binnen en buiten het ziekenhuis, geanalyseerd. De frequentieverdeling van kaliumconcentraties in monsters afgenomen binnen het ziekenhuis vertoonde een significant verschil in de gemiddelde kaliumconcentratie van 0,15 mmol/L tussen zomer- en wintermaand en een toename van hyperkaliëmieën van 3,3% (figuur 1a). De frequentieverdeling van de kaliumconcentraties in extern afgenomen monsters toonden een significant verschil tussen beide maanden van 0,35 mmol/L en een toename van hyperkaliëmieën van 7,5% in de wintermaand ten opzichte van de zomermaand (figuur 1b). Wanneer per afnamedag in de verschillende maanden werd gekeken naar het aantal hyperkaliëmieën bij afnames buiten het ziekenhuis liet de maand juli een gemiddeld aantal hyperkaliëmieën zien van 2% (figuur 1c). Voor de maand november betrof dit 9,5% waarbij op één dag het percentage hyperkaliëmieën zelfs 17% betrof (figuur 1d). Een lage buitentemperatuur gaat dus gepaard met een toename van de gemiddelde kaliumconcentratie en een stijging van het aantal hyperkaliëmieën. Voor bloedafnames buiten het ziekenhuis bleek zowel de gemiddelde toename van de kaliumconcentratie als de toename van hyperkaliëmieën groter dan voor bloedafnames binnen het ziekenhuis.

Tijd- en temperatuurafhankelijke stijging van de plasma kaliumconcentratie

Bovenstaande resultaten suggereren dat afkoeling van afgenomen bloedmonsters tijdens het transportproces afwijkingen kan veroorzaken in de kaliumanalyse. Om het effect van transporttemperatuur en tijdsduur inzichtelijk te maken werd gehepariniseerd bloed van drie vrijwilligers blootgesteld aan verschillende temperaturen. Hieruit bleek dat verlaging van de temperatuur tot verhoging van de plasma kaliumconcentratie leidde en dat de mate van verhoging afhankelijk was van de tijdsduur van afkoeling (figuur 2). Tevens is te zien dat per individu de mate van verhoging variabel is. Het vrije hemoglobine en de lactaat dehydrogenase (LDH) activiteit, een enzym dat in hoge concentratie in erythrocyten aanwezig is, waren

niet verhoogd in afgekoelde monsters in vergelijking met niet-afgekoelde monsters wat hemolyse als verklaring voor de stijging in kaliumconcentratie onwaarschijnlijk maakt (data niet getoond). Voor de parameter kalium lijkt de optimale transporttemperatuur tussen 15-23 °C te liggen. Bij deze temperaturen wordt een maximale afwijking van de meetwaarde van minder dan 5% verwacht voor een maximale transporttijd van 2 uur.

Het effect van de buitentemperatuur op de transporttemperatuur

Een lage buitentemperatuur lijkt de kaliumconcentraties te beïnvloeden ondanks het gebruik van geïsoleerde transportkoffers. Door middel van continue temperatuurlogging werd het effect van lage buitentemperatuur op de transporttemperatuur in kaart gebracht. De transportkoffers werden na werktijd achtergelaten in de auto. Tijdens de nacht, met een buitentemperatuur rond het vriespunt, bleek de temperatuur in de koffers sterk te dalen (figuur 3a). Tijdens de bloedafnameroute werd een stijging van de temperatuur gezien die echter niet de optimale transporttemperatuur bereikte (grijze arcering). Opslag van de koffers in huis tijdens de nacht had een positief effect op de transporttemperatuur (figuur 3b) waarbij de gewenste transporttemperatuur gedurende de bloedafnameroute werd bereikt. Hieruit blijkt dat afgenomen bloedmonsters afhankelijk van het tijdstip van afname voor langere tijd blootgesteld worden aan temperaturen lager dan 15 °C wanneer opslag van transportkoffers niet in een verwarmde omgeving plaatsvindt. Eerder uitgebreid onderzoek naar de stabiliteit van metabolieten, ionen en enzymen in afgenomen bloed toonde aan dat een maximale transporttijd van 6 uur tussen 20-23 °C niet tot significante veranderingen in de kaliumconcentratie leidt (5). Voor transporttemperaturen tussen de 15-20 °C adviseren wij een maximale transporttijd van 2 uur tot aan verwerking.

SEH-opnames en versnelde kaliumlekkage

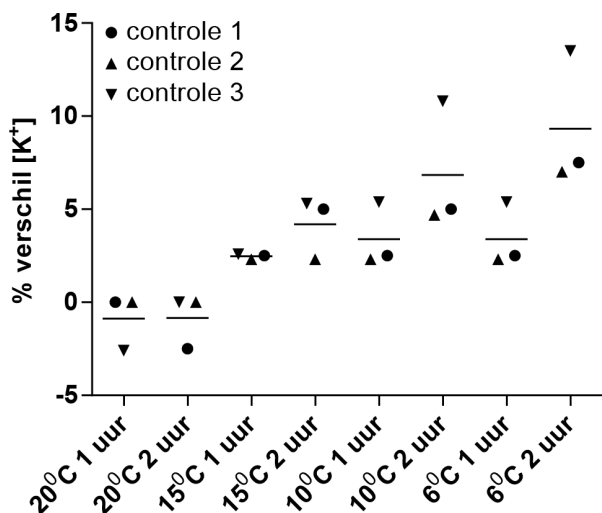
Bij SEH-opnames wegens hyperkaliëmie, zonder klinische verschijnselen, wordt vaak bij herhaalde meting van de kaliumconcentratie in het ziekenhuis een concentratie binnen het referentiegebied gemeten (3,5-5,0 mmol/L) waarna de diagnose pseudo-hyperkaliëmie wordt gesteld. Dit is vanuit het standpunt van de patiënt gezien vaak een zeer stressvolle gebeurtenis en gaat daarnaast gepaard met onnodige kosten voor zowel de gezondheidszorg als de patiënt. Van vijf SEH-casus van patiënten met pseudo-hyperkaliëmie (tabel 1) werd onderzocht of afkoeling van erythrocyten inderdaad de extreem hoge kaliumuitslag kon verklaren.

Bloed van vijf patiënten werd op het laboratorium blootgesteld aan 23 °C of 6 °C. Bij 23 °C was in de twee controles een lichte afname in de kaliumconcentratie waarneembaar terwijl twee patiëntmonsters (casus 3 en 5) een lichte stijging lieten zien afhankelijk van de incubatieperiode (figuur 4a). Afkoeling naar 6 °C liet bij zowel de controles als de patiënten een stijging zien van de plasma kaliumwaarde afhankelijk van de tijdsduur (figuur 4b). De pseudo-hyperkaliëmie van casus 2 kon achteraf worden verklaard door een vergeten bloedafnamebuis die pas 24 uur na afname op het laboratorium werd afgeleverd zonder dat dit bij het laboratorium bekend was. Casus 4 had een hoge uitgangswaarde waarbij langdurige koeling van het monster, eerder dan bij de controles, tot een pseudo-hyperkaliëmie zou hebben geleid. Voor casus 1 kon geen verklaring worden gevonden naast langdurige koeling als oorzaak voor de hyperkaliëmie. Opmerkelijk genoeg lieten twee patiënten (casus 3 & 5) een extreem snelle stijging zien, waarbij na 180 minuten koeling bij 6 °C een kaliumconcentratie werd bereikt groter dan 7 mmol/L. Ook hier werd geen aanwijzing voor hemolyse gevonden als oorzaak van de extreem snelle

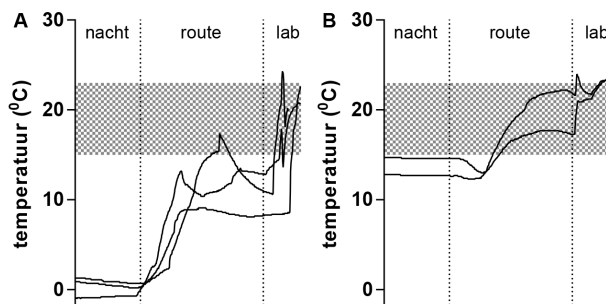
kaliumstijging. Echter, bij deze patiënten kan bij een lage transporttemperatuur een relatief snelle stijging van de plasma kaliumconcentratie worden verwacht.

Beschouwing

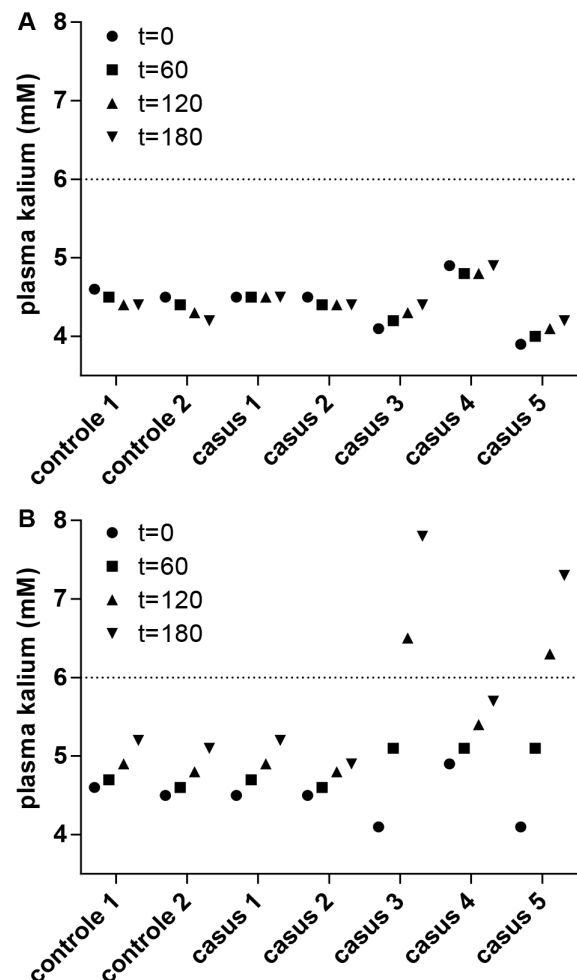
Vals verhoogde kaliumuitslagen zijn een bekend fenomeen bij zowel huisartsen, internisten als SEH-artsen waarbij stuwings vaak als oorzaak wordt genoemd. Dit is echter een oorzaak die achteraf niet te bewijzen valt en die door correcte scholing van bloedafnamemedewerkers tot een minimum beperkt kan worden. Afkoeling van niet gecentrifugeerde volbloedmonsters kan echter een veel groter effect hebben op de kaliumconcentratie. Het is bekend dat er seizoensafhankelijke verschillen bestaan in de gemiddelde kaliumconcentratie en dat dit veroorzaakt wordt door temperatuurverschillen (6). De mate waarin temperatuur onze transportprocessen beïnvloedt bleek onverwacht groot, waardoor tijdens herfst- en wintermaanden een toename in het aantal hyperkaliëmieën zichtbaar was ondanks het gebruik van geïsoleerde transportkoffers. Ook binnen het ziekenhuis afgenomen bloedmonsters lieten een klein maar significant



Figuur 2. Voor het bepalen van de invloed van de factoren tijd en temperatuur op de plasma kaliumconcentratie werd bij drie controlepersonen bloed afgenomen en blootgesteld aan de aangegeven temperatuur en tijdsduur.



Figuur 3. (A) Continue temperatuurregistratie vond plaats in drie transportkoffers van verschillende medewerkers die gedurende de nacht werden opgeslagen in de auto waarmee de volgende dag een bloedafnameroute werd gereden. (B) Als mogelijke oplossing voor de sterke temperatuurdaling 's nachts werden 2 koffers 's nachts opgeslagen in huis en in de auto op de achterbank vervoerd in plaats van in de kofferruimte. De grijze arcering geeft de optimale transporttemperatuur aan.



Figuur 4. Van de onderzochte casus (tabel 1) werd het effect van bewaarduur (0-180 minuten) en temperatuur in kaart gebracht. (A) Bij 23° C werd voor casus 3 en 5 een matige stijging in kaliumconcentratie waargenomen afhankelijk van de tijdsduur. (B) Bij 6° C bleken zowel de controles als casus een grote toename in de kaliumconcentratie te laten zien, waarbij voor casus 3 en 5 een extreme stijging was waar te nemen.

verschil zien in de gemiddelde kaliumconcentratie van een patiëntenpopulatie tussen een winter- en zomermaand van 0,15 mmol/L. Hieruit kan worden opgemaakt dat de kaliumopname en -verlies door erythrocyten tijdens het vervoer van afgenomen bloed tot aan het tijdstip van verwerking op het laboratorium, ook binnen het ziekenhuis wordt beïnvloed door temperatuurverschillen.

Wij troffen binnen de onderzochte casus, waarbij sprake was van een SEH-opname wegens hyperkaliëmie, twee casus met extreem snelle lekkage van kaliumionen bij lage temperatuur. Dit fenomeen is eerder beschreven in de literatuur met de term familiale pseudo-hyperkaliëmie, een dominant overerfbare eigenschap waarvan een drietal varianten bekend zijn (7-10). De prevalentie van één van deze varianten werd recent geschat op 1:500 op basis van het voorkomen van een genetisch polymorfisme in het ABCB6 transporteiwit wat een rol heeft in porfyriene transport (11). Eerder zijn er twee andere mutaties in dit eiwit beschreven in personen met dominante familiale pseudo-hyperkaliëmie. Op basis van deze aminozuursubstituties wordt gespeculeerd dat dit leidt tot kleine conformatie veranderingen waardoor kation lekkage mogelijk wordt via de substraat translocatieroute van het ABCB6 eiwit (12). Een andere hypothese is dat deze mutaties zorgen voor kation permeabiliteit door veranderingen in interactiepatronen met andere eiwitten (12). Deze studie laat zien dat de door ons gebruikte transportkoffers niet in staat zijn een geconditioneerd omgeving voor transport te realiseren. Om langdurige afkoeling van afgenomen bloedmonsters te voorkomen zijn wij overgegaan tot het introduceren van serviceplekken binnen ons afnamegebied. Op deze plekken wordt gedurende de afname route monstermateriaal afgegeven en opgeslagen bij kamertemperatuur. Tevens zijn een aantal serviceplekken voorzien van een centrifuge zodat in afgegeven monstermateriaal bloedcellen en plasma direct kunnen worden gescheiden, wat lekkage van kalium uit erythrocyten voorkomt. Daarnaast is het verplicht om bij een verwachte nachttemperatuur lager dan 15 °C de gebruikte transportkoffers in huis te zetten om afkoeling te voorkomen. In gevallen van verdenking op familiale pseudo-hyperkaliëmie wordt middels bovengenoemd afkoelprotocol de kaliumtoename bij lage temperatuur in kaart gebracht. Bij een positieve uitslag wordt met de behandelend arts en patiënt afgesproken toekomstige bloedafnames voor het bepalen van de kaliumconcentratie enkel in het ziekenhuis plaats te laten vinden. Met de invoering van deze aanpassingen zijn wij van mening dat het effect van lage temperaturen op het voorkomen van hyperkaliëmie tot een minimum kan worden beperkt.

Dankbetuiging

Dit onderzoek werd ondersteund door de Hein Hogerzeil Stichting, een initiatief van Isala en de Huisartsenvereniging Regio Zwolle. MF en LD werden ondersteund vanuit het NirionPlus project (Europees Fonds voor Regionale Ontwikkeling). Verder danken wij Groepspraktijk Huisartsen Dalfsen voor de samenwerking gedurende dit onderzoek.

Referenties

1. Stankovic AK, Smith S. Elevated serum potassium values: the role of preanalytic variables. *Am J Clin Pathol.* 2004; 121: S105-112.
2. Sodi R, Davison AS, Holmes E, Hine TJ, Roberts NB. The phenomenon of seasonal pseudohypokalemia: effects of ambient temperature, plasma glucose and role for sodium-potassium-exchanging-ATPase. *Clin Biochem.* 2009; 42: 813-818.
3. Seamark D, Backhouse S, Barber P, Hichens J, Salzmann M, Powell, R. Transport and temperature effects on measurement of serum and plasma potassium. *J R Soc Med.* 1999; 92: 339-341.
4. Trull AK, Jackson C, Walsh S, Thornton A, Culank LS, McHugh J. The perennial problem with potassium. *Ann Clin Biochem.* 2004; 41: 47-52.
5. Jensen EA, Stahl M, Brandslund I, Grinsted P. Stability of heparin blood samples during transport based on defined pre-analytical quality goals. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 46: 225-234.
6. Sinclair D, Briston P, Young R, Pepin N. Seasonal pseudo-hyperkalaemia. *J Clin Pathol.* 2003; 56: 385-388.
7. Stewart GW, Corral RJ, Fyffe JA, Stockdill G, Strong JA. Familial pseudohyperkalaemia: a new syndrome. *Lancet.* 1979; 2: 175-177.
8. Iolascon A, Stewart GW, Ajetunmobi JF, Perrotta S, Delaunay J, Carella M, et al. Familial pseudohyperkalemia maps to the same locus as dehydrated hereditary stomatocytosis. *Blood.* 1999; 93: 3120-3123.
9. Carella M, d'Adamo AP, Grootenboer-Mignot S, Vantghem MC, Esposito L, D'Eustacchio A, et al. A second locus mapping to 2q35-36 for familial pseudo-hyperkalaemia. *Eur J Hum Genet.* 2004; 12: 1073-1076.
10. Delaunay J. The hereditary stomatocytoses: genetic disorders of the red cell membrane permeability to monovalent cations. *Semin Hematol.* 2004; 41: 165-172.
11. Bawazir WM, Flatt JF, Wallis JP, Rendon A, Cardigan RA, New HV et al. Familial pseudohyperkalemia in blood donors: a novel mutation with implications for transfusion practice. *Transfusion.* 2014; 54: 3043-3050.
12. Andolfo I, Alper SL, Delaunay J, Auriemma C, Russo R, Asci R et al. Missense mutations in the ABCB6 transporter cause dominant familial pseudohyperkalemia. *Am J Hematol.* 2013; 88: 66-72.

Summary

Vos MJ, Fokkert MJ, Jonker N, Bouwhuis JW, Diepeveen SH, van Apeldoorn JA, Dikkeschei LD. The role of specimen transport and biological variation in red blood cell potassium loss in pseudohyperkalemia. Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk. 2016; 41: 188-192

Potassium loss from erythrocytes is increased in blood samples subjected to low temperature. We determined the effect of this phenomenon on our blood sample transport service with the goal to reduce the incidence of pseudohyperkalemia. Potassium results from blood samples drawn within and outside a hospital setting were collected from our laboratory information system. Determination of erythrocytes potassium loss was performed in a laboratory setting by controlled cooling of blood samples followed by analysis on a blood gas analyzer. Blood samples drawn for potassium analysis should be transported within a narrow temperature range and preferably be processed within 2 hours to prevent significant effects on potassium concentration. However, in the case of familial pseudohyperkalemia elevated potassium concentrations can only be prevented by direct processing or measurement of blood samples.