

Karianne Matberg
Stine Karoline Martinsen

Holdbarhetsstudie - kjølig oppbevaring av prøver til analyse av PT-INR

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Liv Thommesen, Ane Molden & Ellen A. Gylland
Mai 2020

Karianne Matberg
Stine Karoline Martinsen

Holdbarhetsstudie - kjølig oppbevaring av prøver til analyse av PT-INR

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Liv Thommesen, Ane Molden & Ellen A. Gylland
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet i samarbeid med Avdeling for Medisinsk Biokjemi ved Sykehuset Levanger for bioingeniørutdanningen ved NTNU i Trondheim. Vi vil rette en takk til de ansatte ved laboratoriet, og en særlig takk til faglige veiledere Ane Ingeborg Molden og Ellen Annette Gylland, for hjelp vi har fått til opplæring og oppfølging i det praktiske arbeidet på laboratoriet. Det har vært spennende og lærerikt å få delta på dette prosjektet og få praktisere selvstendighet i større grad, og å få bryne seg på utfordringer knyttet til utbruddet av Covid-19 pandemien.

En stor takk rettes også til Liv Thommesen for veiledning gjennom prosessen. Vi vil også takke Arne Åsberg for rådgivning og godt samarbeid i det statistiske arbeidet.

Sammendrag

I dette forsøket ble det utført en holdbarhetsstudie hvor det ble undersøkt om blodprøver oppbevart kjølig (5°C) kunne gi et signifikant endret analysesvar i forhold tilsvarende prøve oppbevart i romtemperatur. Dette ble gjennomført med bakgrunn i at primærhelsetjenesten benytter seg av postvesenet for å sende prøver til spesialhelsetjenesten, og at de i forbindelse med dette blir utsatt for kjøligere temperaturer enn anbefalt (under 6°). Temperatur mellom 6°C og 1°C vil føre til økt aktivering av faktor VII, degradering av plateintegritet og utfelling av Von Willebrand multimerer. Da Owrens PT-INR analyse (standardisert metode for PT-INR analyse i Norge) er mest følsom for faktor VII kan dermed kjølige temperaturer påvirke analysert PT-INR verdi.

Det ble samlet inn tre natriumcitrat-glass fra hver pasient som deltok, hvor ett glass ble benyttet som romtemperert prøve for analysering ved alle tidspunkt. De to resterende glassene ble fordelt i mindre rør og oppbevart som fullblod i kjøleskap frem til sentrifugering og analysering. Både romtempererte og tilhørende kjølige prøver ble analysert etter 0, 7, 17, 24 og 48 timer. Romtemperert prøve analysert etter null timer ble benyttet som referanseprøve for beregningene i ettertid.

Etter behandling av rådata ble det fastslått at holdbarhetskriteriene ble oppfylt for prøver oppbevart i romtemperatur og for prøver oppbevart kjølig. Dermed kan prøver oppbevart ved 25°C og 5°C i opp til 48 timer kunne anses som reliable og valide. Primærhelsetjenesten kan dermed fortsette å sende PT-INR prøver i posten, uavhengig av oppbevaringstemperatur og fortsatt kunne stole på påfølgende resultater. Det anbefales likevel å oppbevare prøvene i romtemperatur for å hindre degradering av koagulasjonsfaktorer, spesielt da faktor VII.

Abstract

A study of sustainability was conducted to examine if blood samples stored cool (5°C) could give significantly different results compared to the corresponding blood sample stored at room temperature. The background for this study was that the primary healthcare service uses postal deliveries for transport of patient materials to the special healthcare service. During the shipment the samples got exposed to temperatures below the recommended value (below 6°C).

Temperatures between 1°C and 6°C may lead to increased activation of Factor VII, degradation of platelet integrity and precipitation of Von Willebrand multimers. Since the analysis of Owrens PT (the standard method for analysis of PT-INR in Norway) is most sensitive towards Factor VII, low temperatures could inflict the analyzed PT-INR value.

A total of three samples were collected from each of the participants in the study and one of the samples was stored at room temperature for analysis at all time points. For two samples each of them were divided into four before stored in the fridge until the time of centrifuge and analysis. Both samples stored at room temperature and samples stored cool were analyzed after 0, 7, 17, 24 and 48 hours. The sample analyzed after 0 hours was used as a reference for the following calculations.

The calculations of the raw data enabled the establishment of criteria for sustainability for both the samples stored cool and in room temperature. We found that samples stored at 5°C and 25°C were reliable and valid. The primary healthcare unit can continue to send samples for analysis of PT-INR with the postal service. It is, however, still recommended that samples for analysis of PT-INR is stored at room temperature to prevent degradation of factors, especially Factor VII.

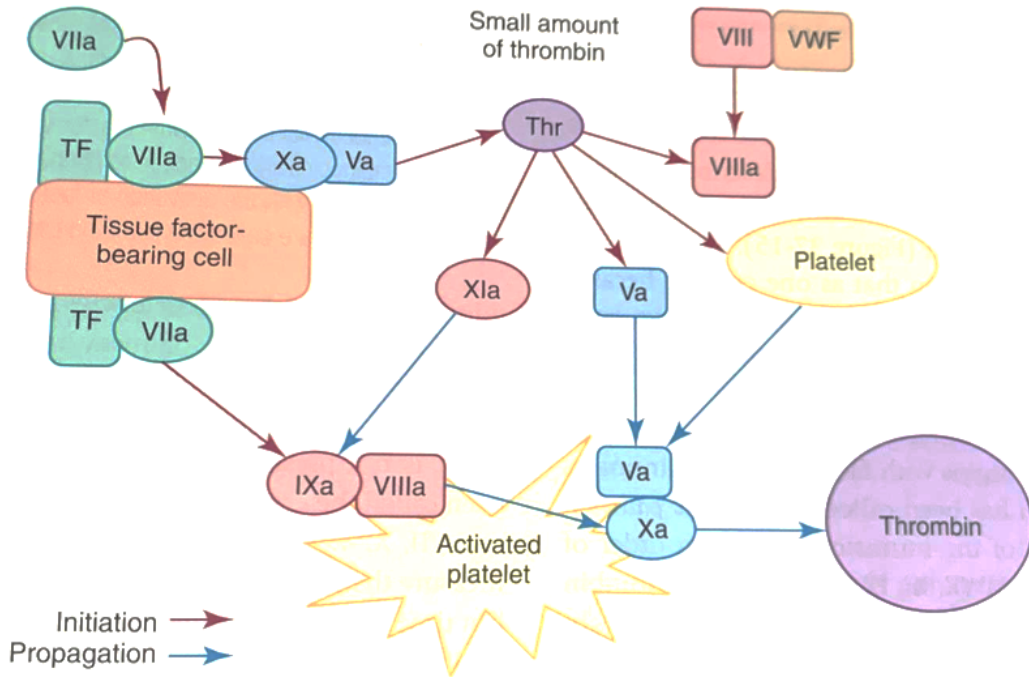
Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
1.0 INNLEDNING	1
PROTROMBINTID OG ANALYSE AV PT-INR.....	3
<i>Analytisk og biologisk variasjon for analyse av PT-INR</i>	11
MOTIVASJON FOR STUDIET.....	12
<i>Tidligere studie</i>	12
2.0 MATERIALE OG METODE	13
REKRUTTERING AV DELTAKERE	14
FREMANGSMÅTE FOR UTFØRELSE	14
OM STA-R EVOLUSION (ORION) OG SPA+-REAGENSET	16
<i>Metodeprinsipp</i>	16
STATISTISKE ANALYSER.....	18
3.0 RESULTATER	21
4.0 DISKUSJON	24
KONKLUSJON	27
REFERANSER	28
VEDLEGG	29
TEMPERATUR-LOGG(1)	29
PROSEDYRE: STA-R EVOLUTUION, PT-INR I PLASMA (EQS-ID 5669)(2)	29
INFORMASJONSSKRIV TIL PASIENTER(3).....	29
ANALYSERESULTATER (LEGGES INN NÅR DET ER UTFYLT)(4)	29
REGNEARK, EXCEL MED SAMMENLIGNING AV MAREVAN OG DOAK(5)	29
REGNEARK, EXCEL MED BEREGNING AV PROSENTVIS FORSKJELL MELLOM TEMPERATURER OG SEM(6).....	29
REGNEARK, EXCEL MED BEREGNING AV ULIKE P-VERDIER(7).....	29

1.0 Innledning

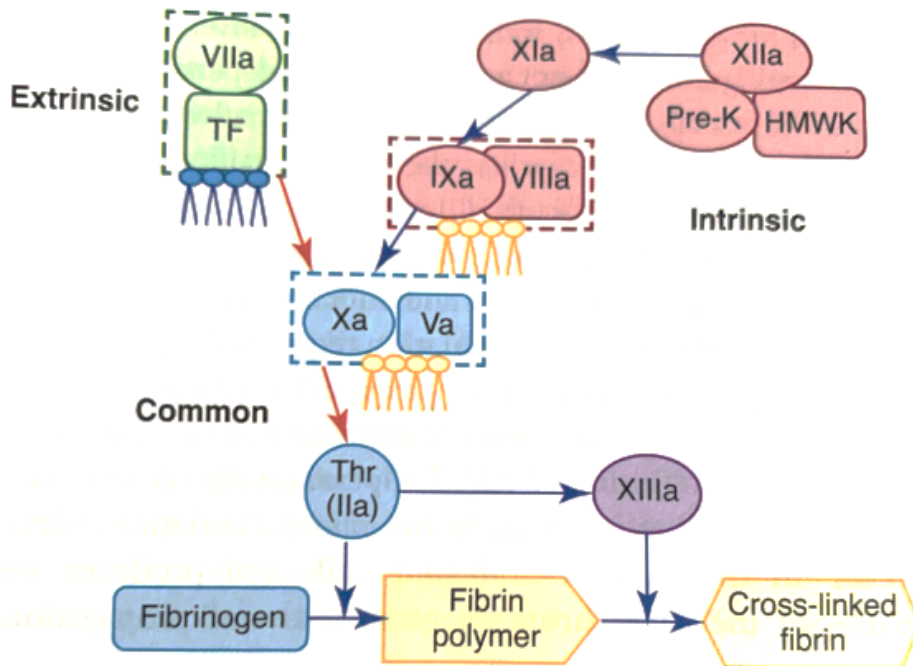
Store deler av koagulasjonssystemet er allerede kjent og kartlagt, men dets totale oppbygging og funksjon med alle bidragsyttere er ikke fullstendig kjent. Kunnskaper har blitt opparbeidet om sentrale faktorer og deres interaksjon med hverandre fra en blødning oppstår, til blodet er koagulert og skaden er reparert.

Ved skade på endotel i blodkar kommer vevsfaktor (tissue factor; TF), som normalt befinner seg på innsiden av endotelcellene, i kontakt med blodbanen og aktivert faktor VII (VIIa, ved påsettelse av a bak faktoren betyr det at det er den aktiverte varianten av faktoren) bindes til TF, som vises i figur 1. Komplekset med TF og VIIa aktiverer videre faktor X (Xa) og faktor IX (IXa). En liten mengde trombin blir generert ved at cellebundet Xa kombineres fullstendig med Va, og trombinet aktiverer videre trombocytter (PLT), faktor V, VIII og XI som starter dannelse av fibrintråder (lange filament som danner et nettverk av tråder). IXa og VIIIa bindes til overflaten av PLT for å aktivere X, og Xa sammen med Va danner protrombinase, et enzym som katalyserer omdannelse av protrombin til trombin. Den store mengden trombin er med på å danne fibrin, og bidrar til å danne en plateplugg og stanse blødningen, som da er hensikten med koagulasjonskaskaden.



Figur 1: Skisse over koagulasjonskaskaden (1)

For å kunne undersøke ulike faktorer og komponenter som bidrar i koagulasjon, er en avhengig av å kunne simulere en kaskade og videre aktivere de faktorene som er til stede i plasmaet i prøven. Koagulasjonskaskaden har to ulike aktiveringsveier for faktor X; ekstrinsisk og intrinsisk, som vist på figur 2. Begge veiene medfører dannelse og aktivering av X, og dannelse av Xa- og Va-kompleks samt reaksjonen videre er lik koagulasjonskaskaden i kroppen.



Figur 2: Ekstrinsisk og intrinsisk aktivering av koagulasjonskaskaden (1)

Plasma-koagulanter kan være serinproteaser eller kofaktorer (forutenom faktor XIII, som er en transglutaminase). Serinproteaser er proteolytiske enzymer i trypsinfamilien og inkluderer prokoagulanten trombin (faktor IIa), faktor VIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa og pre-K (1).

Protrombintid og analyse av PT-INR

Protrombintid internasjonalt normalisert ratio (PT-INR) er en blodprøve som måler tiden det tar før blodet koagulerer. Prøven er mest brukt til å overvåke effekt av blodfortynnende medikamenter som Marevan, men kan også brukes ved enkelte blødertilstander, nedsatt leverfunksjon eller vitamin K-mangel. Protrombintid (PT) måles ved å bruke citratplasma fra pasient, som tilsettes PT-reagens.

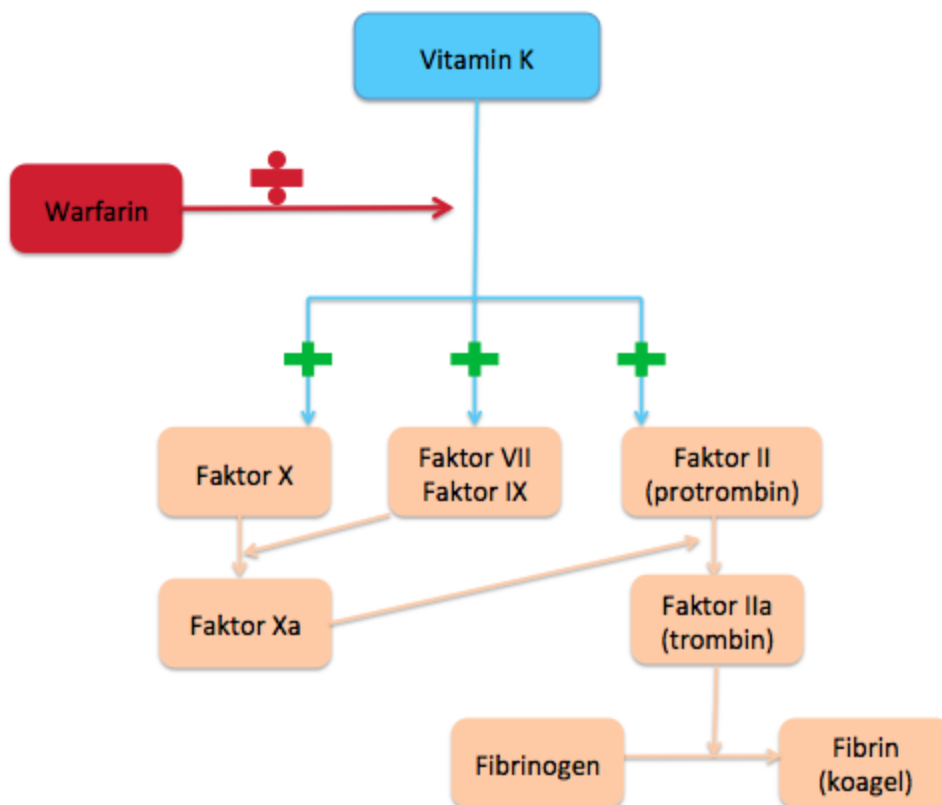
INR er en normalisert verdi for protrombintiden etter Verdens Helseorganisasjons (WHO) standardprøve. Denne blir benyttet for at resultater skal kunne sammenlignes på tvers av institusjoner, laboratorier og metoder. For å få INR-verdiene inn i analyseinstrumentet brukes det to kalibratorer med oppgitt koagulasjonstid, slik at en regresjonslinje kan beregnes. Ligningen for denne regresjonslinjen brukes så i beregningen instrumentet foretar ut ifra koagulasjonstiden

hver enkelt prøve har. PT-INR rapporteres derfor som en ratio mellom pasientens PT og PT målt i standardprøven til WHO. Forholdet mellom disse to verdiene kalles Internasjonal Sensitivitetsindeks (ISI), og sammenhengen mellom INR- og ISI-verdi vises ved denne formelen:

$$INR = \left(\frac{PT_{Pasi\text{entpr}\ddot{o}ve}}{PT_{Standardpr\ddot{o}ve}} \right)^{ISI}$$

Normalverdi på PT-INR er 1,0. Med en verdi på for eksempel 3, vil det si at koagulasjonstiden er tredoblet fra normaltiden.

Legemiddelet Marevan benytter virkestoffet Warfarin, som er en vitamin-K antagonist. Warfarin har en antikoagulerende effekt ved at de hemmer vitamin-K og dermed syntese av de vitamin-K avhengige koagulasjonsfaktorene II, VII, IX og X i lever som vist i figur 3. Marevan kalles da en indirekte koagulasjonshemmer, da det hemmer dannelsen av koagulasjonsfaktorer og i stedet for å hemme selve koagulasjonsfaktoren (direkte koagulasjonshemmer). Ved å gjennomføre en behandling med Marevan som antikoagulant, er målet over tid å senke nivået av vitamin K-avhengige koagulasjonsfaktorer til ca 20-30% av det som er normalt for pasienten. Reduksjon av faktor II og X utgjør hoveddelen av den antikoagulerende effekten til Warfarin (2), som i figur 3. Den hemmende effekten på faktor VII og faktor IX er ikke hovedmålet, da de kun fungerer som aktivatorer for faktor X, men er en del av den totale antikoagulerende effekten til Warfarin.



Figur 3: Den antikoagulerende effekten til Warfarin

(https://storage.googleapis.com/snl-no-media/media/139825/standard_Skjermbilde_2019-12-10_kl._16.32.51.png)

Grunnet noe ulik biologisk halveringstid av faktorene, sees full effekt av behandling først etter 4-8 dager, og effekten vedvarer i 4-5 dager etter avsluttet behandling. Faktor VII har en halveringstid på 4-6 timer, dette fører til at INR vil være i terapeutisk område før fullstendig effekt av marevan-behandling er oppnådd, da det er Faktor VII PT-INR analysen er mest følsom for. Faktor II og X har en halveringstid på omtrent 2-3 dager i plasma, det vil derfor ta rundt 4-5 dager etter behandlingsstart før ønsket nivå av faktorene i plasma nås, og steady state oppnås. Det er disse faktorene som utgjør hoveddelen av den antitrombotiske effekten (2).

Warfarin er en racemisk blanding av (S)- og (R)-form og absorberes fullstendig. Det har en halveringstid på omtrent 40 timer, gjøres mer vannløselig i lever, og skilles ut renalt. S-enantiomeren er den mest potente hemmeren av målenzymet vitamin-epoksid reductase, og hemmer hovedsakelig 3-5 ganger bedre enn R-enantiomeren. Anslagsvis står S-enantiomeren for 60-70% av den hemmende effekten, mens R-enantiomeren står for det resterende. Disse brytes

ned av cytokrom P450 (CYP)-systemet i leveren, der den viktigste metabolitten av warfarin er CYP2C9, som hovedsakelig står for den oksidative omdanningen av S-enantiomeren. R-enantiomeren brytes hovedsakelig ned av CYP1A2 og CYP3A4, der metabolittene som dannes er lite eller ikke aktive. CYP2C9 er et gen med stor grad av polymorfisme hos mennesker og kan påvirke hvor hurtig warfarin metaboliseres. Det burde derfor vurderes genotyping av dette genet ved warfarinbehandling, i alle fall om legemiddelresponsen er annerledes enn forventet. (2)

Marevan kan benyttes over en kortere periode, for eksempel postoperativt eller over lang tid (profylaktisk) for å forhindre trombedannelse i vener og arterier. Startdose (initialdose) er en bestemt dose (7,5 mg første og andre dag), men vedlikeholdsdose varierer svært mye på grunn av store individuelle forskjeller. Det er derfor svært viktig å overvåke dosering av Marevan nøye. Dersom pasienten har hatt en venøs trombose bør PT-INR verdien ligge i området 2,0-3,0 INR. Har pasienten derimot fått innsatt en mekanisk hjerteklaff eller hatt en arteriell trombose, er det hensiktsmessig at INR-verdien ligger noe høyere på 2,5-3,5 INR. Dersom pasienten benytter Marevan bør uansett blødningsfare, andre sykdommer og pasientens generelle tilstand tas med i betraktningen.

Den terapeutiske serumkonsentrasjonen av Warfarin er 1-5µg/ml, men det er mer hensiktsmessig å måle INR-verdi, da man heller ønsker å måle effekten av medikamentet. For å kunne opprettholde en så jevn INR-verdi som mulig er det viktig å ta medikamentet til omtrent samme tid hver dag, og kostholdsvaner *kan* spille inn på virkningen av Warfarin, da spesielt vitamin-K holdige matvarer. Det er derfor viktig med et jevnt inntak av vitamin-K-rike grønnsaker, da for høyt eller lavt inntak *kan* gi endret virkning av Marevan. Dette kan være problematisk for en del pasientgrupper, for eksempel pasienter med demens, alkohol- eller rusmiddelmissbrukere eller pasienter med forstyrrelser i en eller flere organ-grupper. Det er også en rekke medikamenter, reseptbelagte og reseptfrie, som kan hemme eller øke effekten av Marevan, slik at interaksjonen mellom andre legemidler og Marevan også må overvåkes nøye (3).

Bruk av Marevan kan gi en rekke bivirkninger, men den vanligste bivirkningen er blødninger fra forskjellige organer, for eksempel i mage-tarmkanalen. Dersom det skulle forekomme forgiftning/overdose av Marevan, kan det sees som blødninger fra slimhinner og/eller tannkjøtt, samt blekhet og en del andre symptomer forbundet med blødning. Dersom forgiftningen er stor,

kan det uten behandling forekomme hemorragisk sjokk og død. Ved milde forgiftninger kan nedtrapping av Marevan dosen være nok, men ved større forgiftninger ville behandlingen innebære intravenøs tilførsel av vitamin-K1 og eventuelt erytrocytter (3).

Tidligere var det en rekke pasientgrupper som benyttet Marevan som antikoagulant, og noen av de benyttet det profylaktisk. De ulike pasientgruppene hadde varierende grad av indikasjon på behov for behandling med Warfarin sortert som under. Intensiteten på Warfarin-behandlingen varierer også ut ifra indikasjonen (2).

Tidligere indikasjoner på behov for behandling med Warfarin ble det skilt mellom sikre og usikre kliniske indikasjoner. Sikre kliniske indikasjoner innebar dyp venetrombose (DVT) og lungeemboli (LE), revmatisk mitralklaffefeil, mekanisk hjerteventil, kardiomyopati og elektrokonvertering av atrieflimmer. Usikre kliniske indikasjoner innebar atrieflimmer, profylakse etter hjerteinfarkt og cerebrovaskulær sykdom (4).

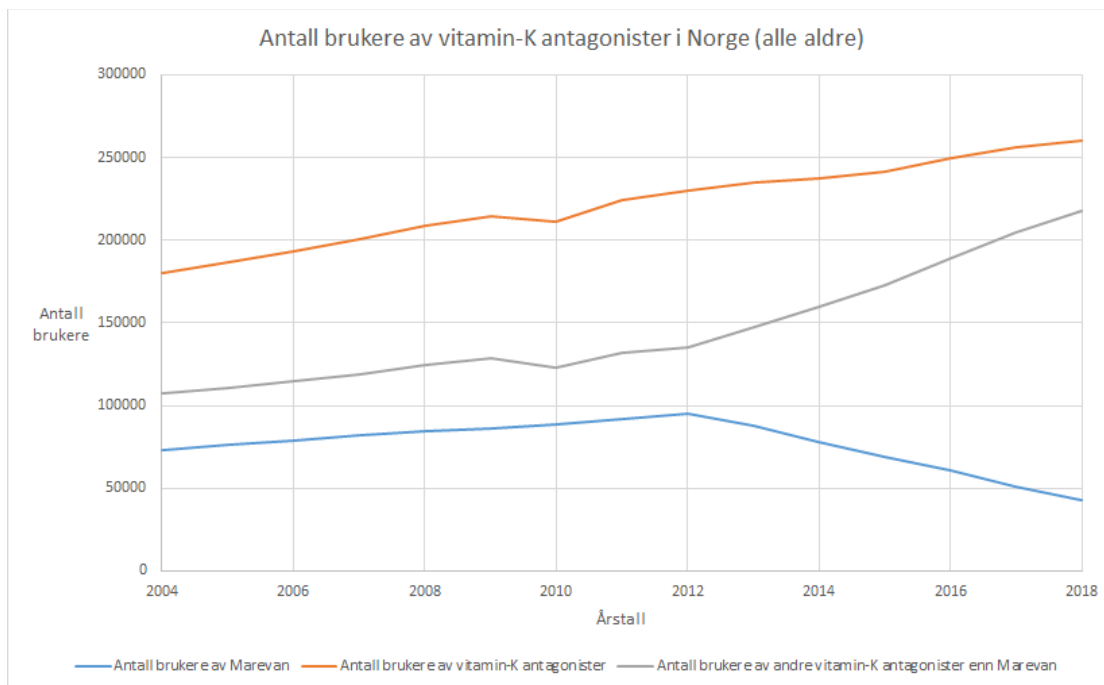
Dyp venetrombose (DVT) oppstår som oftest i leggen. Behandling med heparin etterfulgt av vitamin K antagonister brukes for å løse opp tromben og hindre nydannelse av flere tromber. Warfarin er blant de vanligste typene som brukes til dette formålet. Hvis en trombe fra bena eller bekkenet løsner og følger blodstrømmen til lungene vil den kunne medføre en lungeemboli. Også denne behandles med antikoagulant for å løse opp tromben. Ved DVT og lungeemboli må antikoagulant brukes over tid for å hindre dannelse av flere tromber, da dannelsen av slike indikerer at man gjerne er predisponert for å danne tromber (5). Atrieflimmer vil si uregelmessig og ofte høy hjerterytme, og kan gi større risiko for hjerneslag. Derfor brukes antikoagulantia profylaktisk for å hindre trombedannelse som kan forårsake hjerneslag. Revmatisk mitralklaffefeil er når åpningen til mitralklaffen er blitt forsnevret. Dette skjer som regel i forbindelse med giktfeber, der hjerteklaffen over tid forkalkes og snøres sammen. Hos pasienter med mitralklaffefeil er det brukt antikoagulantia hvis pasient har atrieflimmer og/eller har tidligere emboli (6).

Siden 2012 har direktevirkende orale antikoagulasjonsmidler DOAK; trombinhemmer (dabigatran) og Xa-hemmer (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban) blitt valgt i stedet for Warfarin

hos mange pasienter med atrieflimmer. Nå benyttes antikoagulanter av pasienter med DVT eller lungeemboli, og da i minimum tre måneder etter sykdommen inntraff. Det kan også benyttes av pasienter etter operasjon og fire til fem uker etter operasjon dersom det er for å behandle slitasjegikt i hofter og/eller knær. Som før anbefales det at pasienter med atrieflimmer å benytte antikoagulant, og dersom pasienten i tillegg har hatt hjerneslag, anbefales det bruk av antikoagulant livet ut. Antikoagulanter kan også brukes av pasienter som har alvorlig hjertesvikt, kunstige hjerteklaffer og noen pasienter med koagulasjonsforstyrrelser. Ofte er det også hensiktsmessig å gi antikoagulant profylaktisk til pasienter som har atrieflimmer eller økt risiko for slag. Økte risikoer for slag innebærer blant annet høy alder, diabetes, angina/hjertesvikt og høyt blodtrykk.

Warfarin er som kjent forbundet med en del bivirkninger og krever nøye overvåking av INR-verdien til pasienten for å unngå blødninger eller dannelse av nye tromber, slik at det har vært ønskelig å finne andre og bedre medikamenter som kan erstatte Marevan. De nye medikamentene i tablettform som per september 2019 er tilgjengelige i Norge er dabigatran (Pradaxa), argatroban (Argatra, Novastan) rivaroksaban (Xarelto), apiksaban (Eliquis) og edoksaban (Lixiana). Denne typen medikamenter går under fellesbetegnelsen DOAK, og bruk og overvåking av dosering av disse er noen annerledes enn ved bruk av Marevan. Ved bruk av de nye medikamentene tas en fast dose hver dag, og pasienten trenger ikke å måle effekten av disse ved hjelp av blodprøver, slik det er ved bruk av Marevan. Foreløpig er det kun medikamentet dabigatran hvor det er en tilgjengelig motgift i Norge, så dersom det skulle forekomme en forgiftning av noen av de øvrige medikamentene er det ingen motgift tilgjengelig slik som det er for Marevan (3).

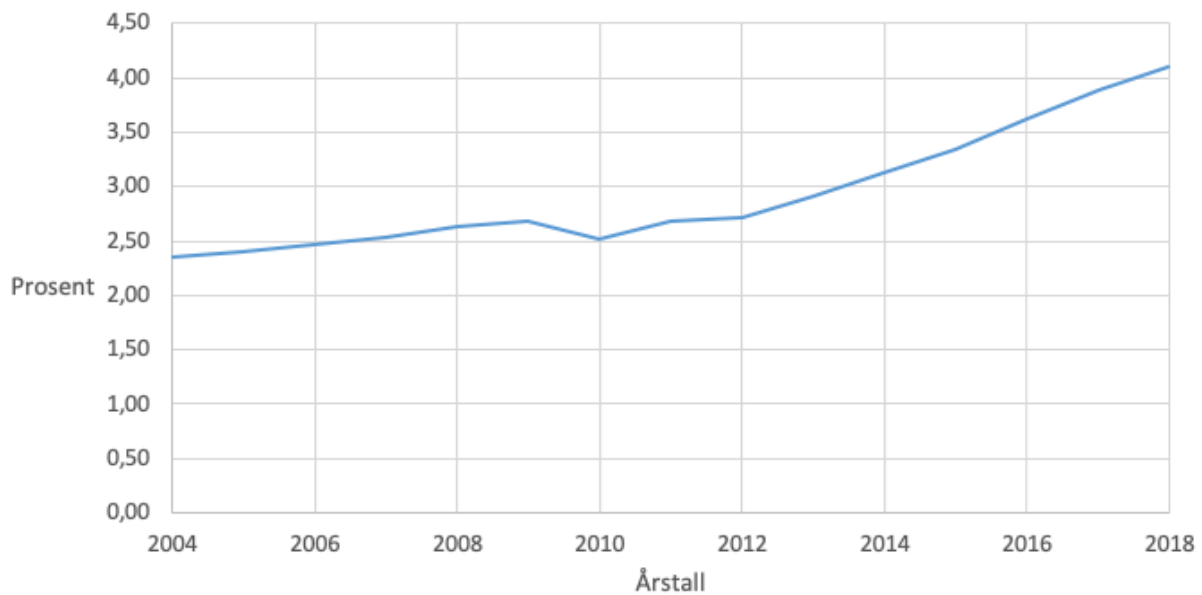
Ser man på bruk av Marevan i perioden 2004 til 2018 ser en at den har avtatt betraktelig, da spesielt fra omkring 2012 (blå linje, figur 4), til tross for at bruk av vitamin-K hemmende medikamenter har økt jevnt gjennom hele perioden (oransje linje, figur 4).



Figur 4: Utviklingen av bruk av Marevan sammenlignet med andre antikoagulanter (vitamin-K antagonister) i perioden 2004-2018 (alle aldre). Blå linje representerer antall brukere av Marevan, oransje linje representerer totalt antall brukere av vitamin-K antagonister, og grå linje representerer antall brukere av andre vitamin-K antagonister enn Marevan

Den grå linjen i figur 4 viser antall brukere som benytter *andre* vitamin-K antagonister enn Marevan. Omtrent på samme tid som bruk av Marevan plutselig avtar omkring 2012, øker denne pasientgruppen betraktelig. Dette gjenspeiles også dersom man ser på antall prosent av befolkningen i alle aldre som benytter andre vitamin-K antagonister enn Marevan (figur 5), som er omtrent doblet i perioden 2004 til 2018.

Prosent av befolkningen som benytter andre vitamin-K antagonistener enn Marevan



Figur 5: Prosentvis økning av andelen av befolkningen som benytter andre antikoagulanter (vitamin-K antagonistener) enn Marevan i perioden 2004 til 2018 (alle aldre)

(7)

Som man kan se så har bruken av Marevan avtatt, selv ved en befolkningsvekst og bruk av antikoagulerende medikamenter (her: vitamin-K antagonistener) har økt totalt. Likevel er det noen pasienter som benytter Marevan som antikoagulant. Dette kan skyldes at det er større krav til at DOAK tas hver dag til faste tidspunkt i større grad enn for bruk av Marevan, og for en del pasienter kan det være problematisk som nevnt tidligere. I og med at det finnes en behandling og motgift mot Marevan, og at det ikke er like nøye med dosering i forhold til tid på døgnet og å huske tabletten hver dag grunnet lang halveringstid, er det flere i de nevnte pasientgruppene som fremdeles benytter Marevan i stedet for DOAK. (vedlegg 5)

Analytisk og biologisk variasjon for analyse av PT-INR

Før en skal analysere PT-INR i pasientplasma er det viktig å ta hensyn til forskjellige varianter av variasjoner, både i prøvematerialet, men også instrumentelle variasjoner. De ulike typene variasjoner endres ut ifra hvilken analytt som undersøkes, men for analyse av PT-INR er de ulike prosentvise variasjonene presentert i tabell 1 som er viktigst.

Tabell 1: Analytisk og biologisk variasjon for analyse av PT-INR

Analytisk variasjon	2,6% ved INR=1,0
Intraindividuell (biologisk) variasjon	4,0%
Totalvariasjon (analytisk og biologisk)	4,8%

Tallene som er oppgitt er variasjonskoeffisienter, og gjelder over et tidsrom på dager-måneder. Dersom konsentrasjonen av Warfarin i pasientens plasma har oppnådd “steady state” med en INR-verdi i området 2,0-3,0, er den intraindividuelle (biologiske) variasjonen på 9,6%. Det vil altså si at den variasjonen øker med økende INR-verdi.

Prøvetaking til analyse av PT-INR krever ingen spesielle forberedelser av pasienten, i form av faste eller inntak av spesielle matvarer (8).

Blodprøver til analyse av PT-INR kan oppbevares usentrifugert i opptil 48 timer (satt holdbarhet for gjeldende laboratorier), ved en temperatur på 18-24°C. Ved lagring på 1°C til 6°C vil faktor VII aktiveres, blodplatenes integritet vil ødelegges gjennom ukontrollert aktivering og forårsaker utfelling av store Von Willebrand faktor multimerer (et protein som består av flere monomerer). Ved frakt fra legekantor til laboratoriet via posten kan man ved hjelp av termometer som sendes sammen med leveransen av pasientprøver se at temperaturen ved flere tilfeller vil synke så lavt på vinteren (1).

Motivasjon for studiet

Omtrent daglig mottar sykehuslaboratorier prøver til analyse av PT-INR. Da mottas en ikke-sentrifugert blodprøve tatt på natriumcitrat-glass, som ved ankomst sentrifugeres av ansatte ved laboratoriet. En del prøvetakere i primærhelsetjenesten sender sine prøver med post eller med budbilstjeneste. Spesielt på vinterstid er det et problem med postgang, da det ifølge prosedyre for analysering av prøver til PT-INR er oppgitt at prøvene skal være oppbevart ved romtemperatur frem til analyse. (vedlegg 2)

Det forekommer av temperatur-logg (vedlegg 1) at prøvene blir liggende, sannsynligvis i en postkasse utendørs, i lave temperaturer over lengre tid. Dette bryter da med prosedyren for analysering av prøver for PT-INR, men de analyseres sammen med de andre prøvene.

Som nevnt benyttes både vanlig postgang og budbil for å sende prøver fra primærhelsetjenesten til sykehuset i Levanger. Disse prøvene settes på kjølerom for å klargjøres for analyse dagen etter, og her er det spesielt viktig at prøver for analyse av PT-INR tas ut og settes i romtemperatur. I denne prosessen kan det skje feil ved at citratglass til analyse av PT-INR blir satt kjølig til senere på dagen eller dagen etterpå. Problemet ble belyst etter samtaler med spesialbioingeniør som er ansvarlig for prøvemottak- og forsendelse.

Det er derfor ønskelig å undersøke hvorvidt den kjølige oppbevaringen i postkasse, under transport og/eller i kjølerom har en signifikant innvirkning på prøveresultatet, og om man får pålitelige analyseresultat fra prøver som ved feil er blitt oppbevart kjølig. At det er forskjell på om prøven er sentrifugert og avpipettert eller ikke før forsendelse er ikke av interesse, da det gir merarbeid for prøvetakere som sender disse til laboratoriet. Det er derfor ikke relevant å undersøke om det er forskjell mellom avpipettert plasma og fullblod med tanke på kjølig oppbevaring.

Tidligere studie

Det er tidligere gjort en lignende studie hvor det ble tatt prøver til analyse av PT-INR av 24 pasienter, hvor alle prøvene ble tatt samme dag (9). Prøvene ble delt inn gruppevis etter hvilke

preanalytiske forhold de ble utsatt for. Gruppe A ble oppbevart på røde blodlegemer i romtemperatur og sentrifugert før analyse etter 0, 2, 4, 6, 24, 48 og 72 timer. Gruppe B ble oppbevart på røde blodlegemer i kjøleskap og kjølesentrifugert før analyse etter 0, 2, 4, 6, 24, 48 og 72 timer. I gruppe C ble prøvene sendt i post med kjøleelement, og sentrifugert og analysert ved mottak (24 timer). I gruppe D ble prøvene sendt i post etter det var blitt sentrifugert og avpipetert sammen med et kjøleelement, og analysert ved mottak (24 timer). Prøve A etter null timer ble brukt som referanseprøve ved vurdering av resultatene av de øvrige preanalytiske forholdene.

Som forfatter av artikkelen selv skriver er det et begrenset antall prøver med i studien, slik at det er ønskelig å benytte minimum 30-40 prøver dersom man skal kunne trekke noen konklusjon (etter anbefaling av Arne Åsberg, lege ved St.Olavs Hospital). Det er også beskrevet i prosedyre for analyse av PT-INR (vedlegg 2) at prøven er holdbar i opptil 48 timer etter prøvetaking. Derfor er det ikke hensiktsmessig å bruke prøver oppbevart lengre enn den tiden, da prøver oppbevart lengre må forkastes i utgangspunktet, uavhengig av temperatur.

Det ble også benyttet prøver hvor INR-verdien lå i området 1,3-3,0 med unntak av en prøve med INR=10,4. Området er noe for lavt og smalt, da det terapeutiske området for behandling med Marevan ligger på INR= 1,5-3,5. Det er derfor hensiktsmessig å bruke prøver som befinner seg i, og i nærheten av det terapeutiske området (9).

2.0 Materiale og metode

Før oppstart av prosjektet ble det sendt inn et meldeskjema for prosjektet til Norsk Senter for Forskningsdata (NSD) da det skulle behandles humant biologisk materiale. Meldeskjema ble godkjent før oppstart av prosjektet.

Rekruttering av deltakere

For å rekruttere deltakere til prosjektet ble det på forhånd funnet ut av ansatte ved laboratoriet hvilken avdeling/lokasjon det ble rekvirert mest analyser av PT-INR ved, og omtrent INR-verdi hos de aktuelle pasientene. Det ble da funnet at pasienter tilhørende hjertemedisinske avdelinger var mest aktuell, men også noen pasienter tilhørende medisinsk avdeling for mage-tarm sykdommer som hadde leversykdommer. I tillegg ble polikliniske pasienter som benytter antikoagulerende medikamenter (marevan) rekruttert. Noen av de rekrutterte pasientene praktiserte overvåking av INR-verdi selv, men kom inn på poliklinikk for å kontrollere INR-verdien ved bytte av forbruksmateriell. Det ble også under opplæring av bruk av instrumentet kartlagt omtrentlig hvor mange prøver som ble analysert i det aktuelle området for INR (1,5-3,5) hver dag, for å kunne gi et estimat for omtrent daglig arbeidsmengde.

Det ble funnet aktuelle pasienter i logg på analyseinstrumentet av vakthavende personell ved laboratoriet, og de undersøkte om det var bestilt blodprøver av pasientene følgende dag eller senere samme dag. Pasientene det allerede var rekvirert blodprøver til, ble spurt om de ønsket å ta del i prosjektet, og det ble innhentet informert muntlig samtykke fra pasienten før det ble tatt tre ekstra citrat-glass til prosjektet. Dersom pasienten ønsket det, ble det gitt utfyllende informasjon skriftlig (vedlegg 2).

Fremgangsmåte for utførelse

Det ble levert tre citrat-rør fra hver pasient, hvor de ble gitt et prøvenummer og ført inn i et koplings skjema (vedlegg 3) av en ansatt ved laboratoriet. Pasientens navn og fødselsnummer ble lagret der i tilfelle det skulle oppstå et uforventet høyt analysesvar over grense gitt av laboratoriet (INR >4,8), slik at rekvirent måtte kontaktes, eller dersom pasienten ønsket å trekke seg fra prosjektet. Skjemaet ble oppbevart innelåst og utilgjengelig for offentligheten og for studentene.

Prøvematerialet fra to av citrat-glassene ble fordelt i fire mindre plastrør, etter å ha vært forsiktig vent et par ganger for å sikre blanding av blodceller og plasma. Dette fordi prøvematerialet ble lagret over tid i stativ, og det førte til sedimentering av blodcellene i prøveglasset. Det ble også sjekket for eventuelle koagel-dannelser under vending. Deretter ble de mindre plastrørene merket

med tilhørende prøvenummer og inkubasjonstid for oppbevaring i kjøleskap. Prøvene ble samlet inn av ansatte som hadde dagvakt frem til klokken 13.45 og oppbevart på arbeidsbenk frem til da. Uavhengig av prøvetidspunkt ble analysering etter null timer satt til klokken 14.00 av praktiske årsaker.

De fire mindre rørene ble satt i kjøleskap i et eget stativ klokken 14.00, og oppbevart i kjøleskap ved 5°C frem til sentrifugering og analysering. Det resterende citrat-røret ble lagret i romtemperatur (RT), og ble analysert sammen med de kjølige prøvene med tilsvarende prøvenummer. Etter 7, 17, 24 og 48 timer ble dermed både kjølige og romtempererte prøver analysert, med to paralleller for hver prøve.

Tabell 2: Oversikt over analyse-tidspunkt for prøver oppbevart i romtemperatur (RT) og i kjøleskap

Antall timer etter første analysering	0	7	17	24	48
Analyserings-tidspunkt	14.00 (kun RT)	21.00	07.00 (+ett døgn)	14.00 (+ett døgn)	14.00 (+to døgn)

Det ble av praktiske årsaker lagt inn et slingringsmonn omkring analyse-tidspunkt på en halv time. Alle prøvene, både de som ble oppbevart i romtemperatur og de som ble oppbevart kjølig, ble sentrifugert etter prosedyre; ved romtemperatur i 2200 g i 10 minutter. Dette for best mulig å simulere hvordan reelle pasientprøver som kan ha blitt oppbevart feil også behandles. Etter endt analyse ble prøveglassene kastet etter gjeldende regler for avfallshåndtering.

Før analysering og/eller ved bytte av reagens ble det gjort en kontroll av instrumentet; en normal og en patologisk høy. Resultatene (INR-verdi) ble notert i et skjema hvor den gjennomsnittlige verdien for verdiene ble beregnet (vedlegg 4).

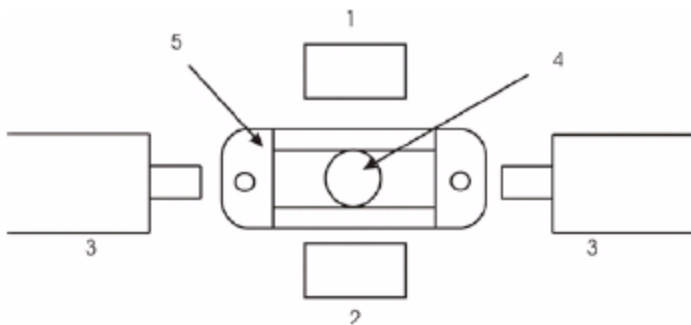
Om STA-R Evolusion (Orion) og SPA+-reagenset

Instrumentet som ble benyttet i dette prosjektet var en STA-R Evolution, her kalt Orion. Instrumentet ble benyttet i daglig drift i laboratoriet, og utførte analysene PT-INR, APTT og fibrinogen.

Metodeprinsipp

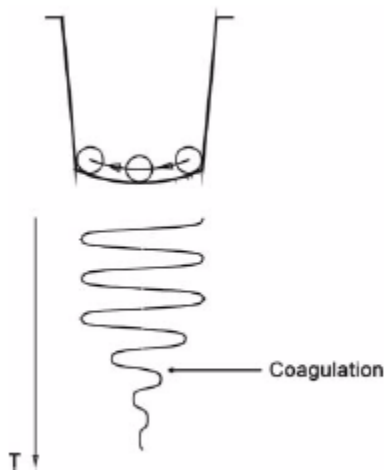
For å kunne gi et kvantitativt resultat på analysene benytter instrumentet kronometri. Prinsippet baserer seg på å måle metallkulens endring i svingningens amplitude (hvor mye metallkulen svinger fra den ene siden i kyvetten til den andre). Amplituden til metallkulens svingninger synker som følge av økende viskositet i prøven i kyvetten, da det blir tyngre for kulen å bevege seg i mediet. Det er kulens bevegelse og endringen i viskositet som ligger til grunne for å kunne måle koagulasjonstid i prøvene. Dette skyldtes to skinner som svinger inn under kyvetten, og at det alternerer et elektromagnetisk felt fra side til side. Frekvensen til skiftet av det magnetiske feltet og frekvensen til svingningen til kulen er omtrent lik, slik at det sikret god sensitivitet i analysen.

For hver prøve ble det magnetiske feltet endret og tilpasset av programvaren i instrumentet som en funksjon av viskositeten i prøven og hvilken type koagel som skal testes (svak koagel for fibrinogen og reptilase, normal koagel for de øvrige analysene, som PT-INR). Selve analyseenheten består av en emitterende coil(2) og en mottaks-coil(1), samt en drive-coil(3) på hver side av kyvetten(5) som inneholder en metallkule(4).



Figur 6: Analyseenhet i STA-R Evolution, sett ovenifra (bilde fra brukermanualen)

Dersom viskositeten i prøven er konstant, vil amplituden i kulens svingninger også være konstant. Da viskositeten i prøven øker ved koagulasjon, avtar amplituden i kulens svingninger. En algoritme blir benyttet for å bruke den synkende amplituden til å bestemme koagulasjonstid, som vist i figur 5.



Figur 7: Kyvette sett forfra som viser hvordan kulens amplitude i svingningene avtar, benyttes til å beregne koagulasjonstid (bilde fra brukermanualen til STA-R Evolution)

STA-SPA+-reagenset benyttes til analyse av faktor II, VII og X, på STA-instrumenter omtaltes dette som Owrens PT. SPA-reagens består av to reagenser som blandes i et 15ml glass før bruk og etter romtemperering: reagens 1 består av frysetørret tromboplastin, som er fremstilt fra en blanding av kaninhjernevev og bovint plasma. Tørrstoffet har mangel på faktor II, VII og X, og

det bovine plasmaet bidrar med faktor V og fibrinogen til reaksjonen. ISI-verdien for reagenset bestemmes mot den internasjonale referansestandard RBT/16. Reagens 2 består av en kalsiumholdig fortynningsvæske.

Å analysere Owrens PT kan være nyttig ved visse kliniske tilstander og overvåking av behandling med vitamin-K antagonister, som for eksempel medfødt eller ervervet mangel på faktor II, VII eller X, eller K-hypovitaminose som kan være forårsaket av mangel på tilførsel via kosthold eller uregelmessigheter i opptak av eller metabolisme av vitamin-K. Owrens PT er også nyttig ved overvåking av bruk av vitamin-K antagonister medikamentelt.

Denne metoden har noen få begrensninger, hvor de mest relevante er mistenklige prøver med spor av mikrokoagler, som vil forkorte koagulasjonstiden på grunn av analytisk aktivering av alle faktorene. Disse vil kunne få en lavere INR-verdi enn forventet. Prøver med større koagler som forlenger koagulasjonstiden fordi koagelet forbruker faktorer og fibrinogen. Eller ved medikamentell bruk av hepariner hvor analysen ikke påvirkes av ufraksjonerte hepariner der konsentrasjonen er under 1 IU/ml, og lette hepariner der konsentrasjonen er under 1,5 anti-Xa IU/ml. (8)

Statistiske analyser

Det ble analysert to paralleller for hver prøve som vist i vedlegg 6, hvor den gjennomsnittlige verdien og % avvik mellom parallellene for hver prøve ble beregnet.

Det ble så beregnet hvor stort %avvik som kunne tillates ut ifra formelen:

$$0 \pm 1,96 \cdot 2^{0,5} \cdot SA$$

Verdien 1,96 er variasjonskoeffisienten for et 95% konfidensintervall (som er benyttet her), 2 er antallet paralleller som ble undersøkt, og den er opphøyd i 0,5 for å kunne beregne kvadratroten. SA var det gitte tillate standardavviket i tabell 1. Når de gitte verdiene var satt inn fikk en resultatet:

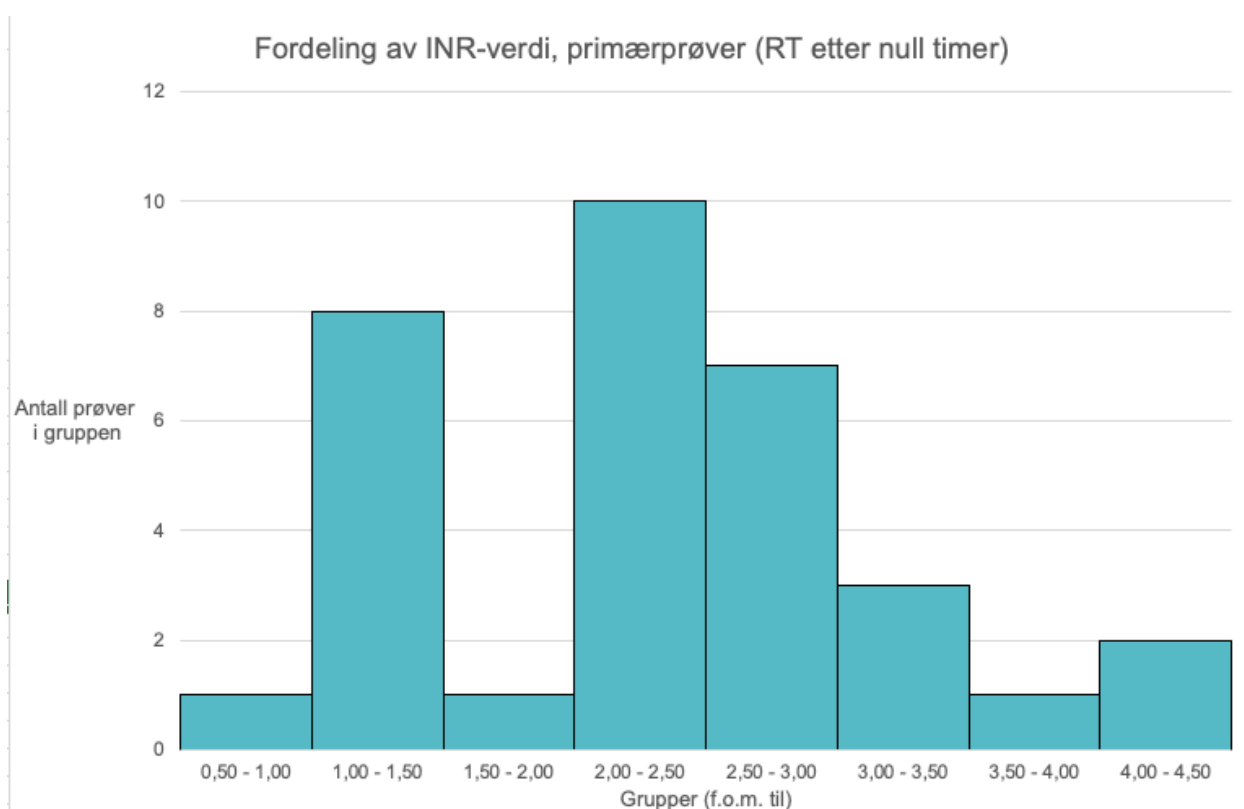
$$0 \pm 1,96 \cdot 2^{0,5} \cdot 2,6\% = 7,2\%$$

Dette betydde da at det kunne tillates opp til 7,2% avvik mellom parallellene før analyserekken måtte forkastes.

De beregnede gjennomsnittsverdiene ble benyttet i alle beregninger videre.

Alle gjennomsnittsverdiene for primærprøvene (prøver oppbevart i RT i null timer) ble sortert i stigende rekkefølge, og det ble laget grupper hvor hver gruppe var i størrelsesorden 0,5 INR.

Frekvensen av forekomst av verdiene ble funnet, for å kunne undersøke fordelingen av verdiene av alle prøver som ble benyttet (figur 6).



Figur 8: Fordeling av INR-verdi på primærprøver (oppbevart i RT i null timer) i studien

Videre ble den prosentvise forskjellen i INR-verdi mellom de romtempererte- og de kjølig oppbevarte prøvene beregnet for alle prøver og tidsintervaller (vedlegg 6), slik at dette kunne visualiseres grafisk. Dette ble gjort samtidig som standardfeil (SEM) ble beregnet for alle prøver og tidsintervaller. Disse to metodene ble benyttet for å undersøke hvor stor prosentvis forskjell

det var mellom de prøvene som var oppbevart i romtemperatur og de prøvene som var oppbevart kjølig.

Det ble generert flere p-verdier ved hjelp av et statistikkprogram (her: ExCel) for å sammenligne ulike datasamlinger. Prøvene oppbevart i romtemperatur ble sammenlignet med prøver oppbevart kjølig etter 7, 17, 24 og 48 timer. Det ble også sett på differansene mellom prøvene oppbevart i romtemperatur etter 7, 17, 34 og 48 timer og tilhørende initialprøve, og det samme ble sett på hos prøvene oppbevart kjølig. Til slutt ble også prøvene oppbevart i romtemperatur og prøvene oppbevart kjølig sammenlignet, uavhengig av oppbevaringstid.

For å undersøke den faktiske holdbarheten ble Batch vs. A-metoden hentet fra NOKLUS sin hjemmeside benyttet (10). I NOKLUS-dokumentet ble det laget et data-ark for prøver oppbevart i romtemperatur og et data-ark for prøver oppbevart kjølig, for å kunne kartlegge hver enkelt prøves utvikling i INR-verdi over tid. De gjennomsnittlige INR-verdiene for hvert tidsintervall ble lagt inn i det respektive regnearket, og det ble beregnet gjennomsnittlig prosentvis endring, standardavvik og standardfeil (SEM) i forhold til utgangsverdien (oppbevart i RT ved $t=0$) for alle prøvene. Det ble da gjort en grafisk fremstilling av prøvenes utvikling i figur 7 og 8.

Samtidig ble det laget et diagram hvor % tillat bias og % tillat totalfeil ble lagt inn. Her ble det benyttet 10% tillat bias ($100\% \pm 10\%$) og 20% tillat totalfeil ($100\% \pm 20\%$) etter anbefaling av Arne Åsberg (medisinsk biokjemi ved St.Olavs, personlig meddelelse). Diagrammet kan ses i figur 9 og 10.

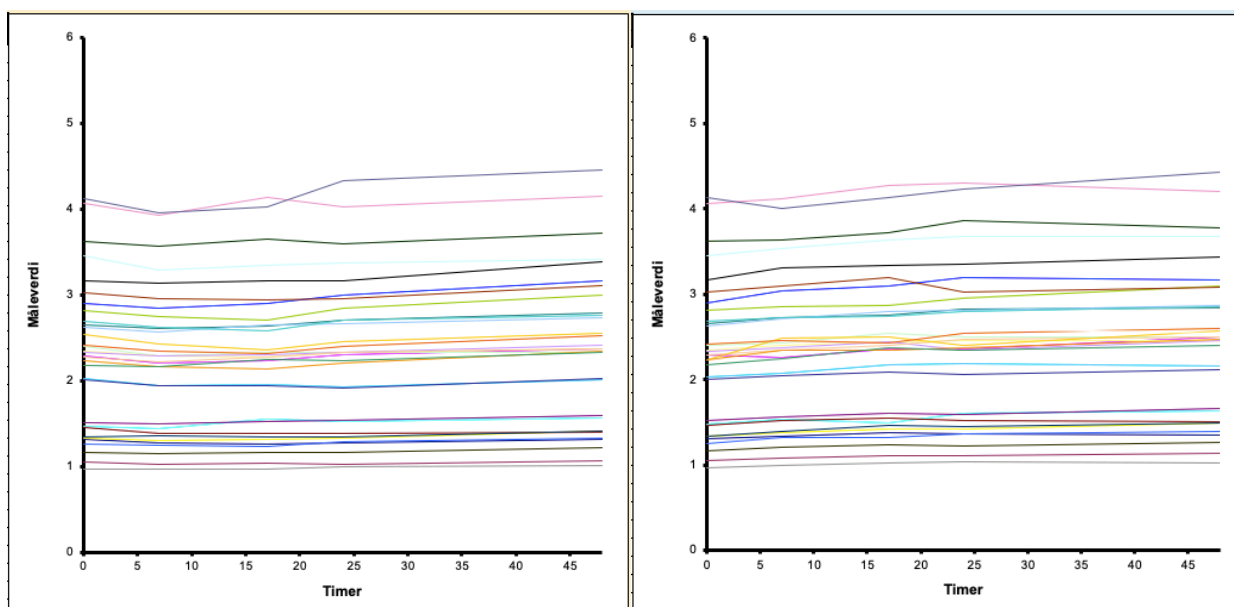
For å kunne avgjøre om materialet oppbevart i romtemperatur og kjølig er holdbart, ble det først avgjort om 90% konfidensintervallet befant seg innenfor grenser for % tillat bias for alle tidspunktene. I tillegg måtte alle enkeltverdiene ligge innenfor grensene for tillatt totalfeil, dersom materialet skulle være holdbart. For at materialet skulle kunne kalles holdbart var begge disse kravene nødt til å være oppfylt (11).

3.0 Resultater

Hensikten med denne studien var å undersøke om og i hvilken grad pre-analytisk oppbevaringstemperatur over tid påvirker PT-INR verdien. Blodprøvene ble derfor fordelt og oppbevart henholdsvis 7, 17, 24 og 48 timer i romtemperatur og kjøleskap ved rundt 5°C.

Gjennomsnittsverdien av alle analyserte paralleller ble ført inn i et regneark tilhørende Batch vs. A-metoden gitt av NOKLUS (10), og utviklingen for hver enkelt prøve der INR-verdien kan sees som en funksjon av tiden passert som de fargede linjene i figur 9 og 10.

Figur 9 og 10: Oversikt over måleverdi hvor hver linje representerer hver enkelt prøves endring i INR-verdi over tid.

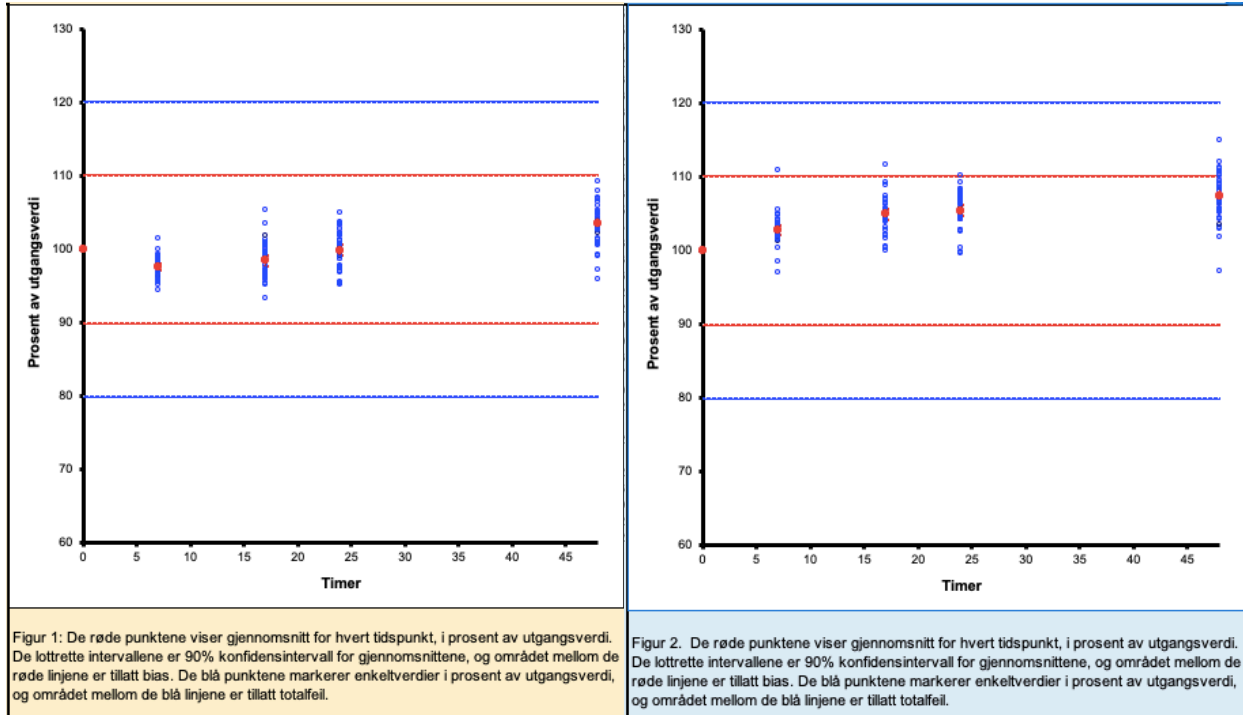


Figur 9: Måleverdier av INR for romtempererte prøver.

Figur 10: Måleverdier av INR for kjølig oppbevarte prøver.

Som en kan se ut ifra figur 9 og 10 oppfører prøvene med lave INR-verdier (1,0-1,5) seg relativt likt, med lite forandring og forholdsvis flate kurver. For de prøvene med høyere INR-verdier er det større variasjoner i løpet av de 48 timene forsøket er utført. Disse endringene i verdi blir tydeliggjort i større grad i figur 11 og 12, hvor de røde punktene er gjennomsnittlig verdi i prosent av utgangsverdien for alle prøvene etter 0, 7, 17, 24 og 48 timer.

Figur 11 og 12: Gjennomsnitt for hvert måletidspunkt (røde punkter), individuelle målinger i prosent av utgangsverdi (blå punkter), 90% konfidensintervall (loddrette intervall), tiltatt bias (området mellom de røde vannrette linjene) og tillatt totalfeil (området mellom de blå vannrette linjene).



Figur 11: Prosentvis endring av PT-INR verdier for prøver oppbevart i romtemperatur i opp til 48 timer.

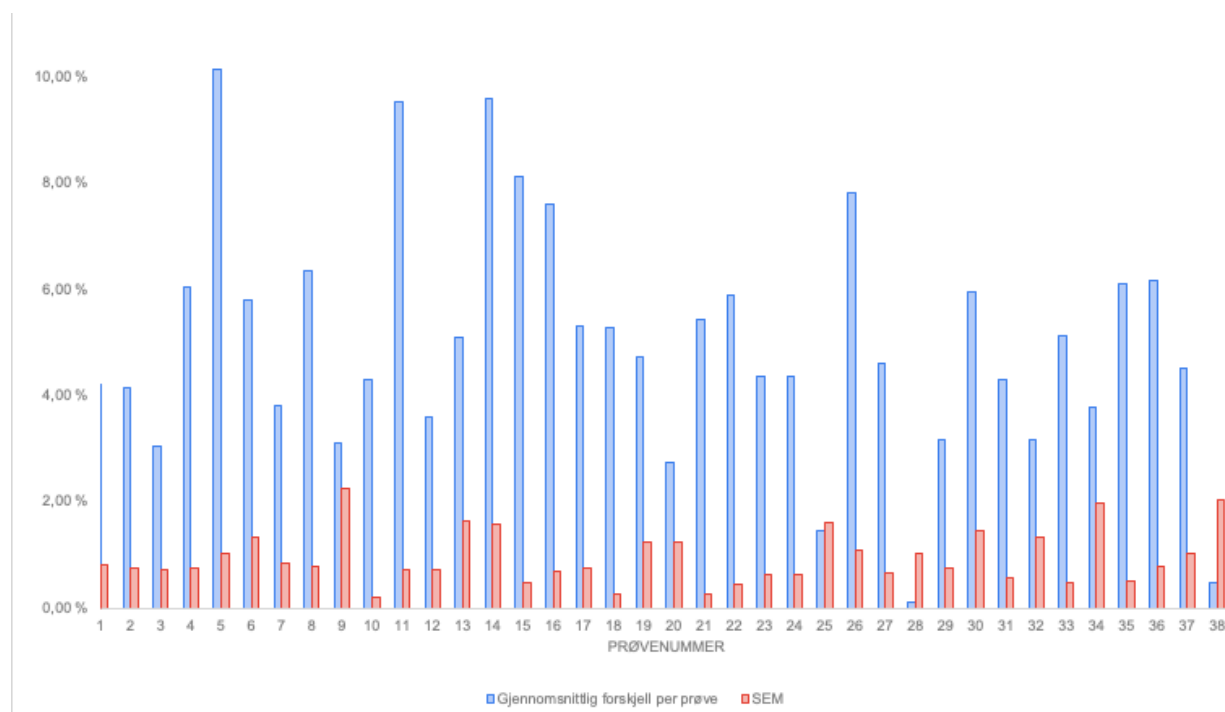
Figur 12: Prosentvis endring av PT-INR verdier for prøver oppbevart kjølig

Forskjellen på hvordan prøvene oppbevart i RT og de oppbevart kommer i figur 11 og 12 tydeligere frem, særlig dersom man trekker en linje mellom de røde punktene i diagrammene. For prøvene oppbevart i RT ser en at etter 7 har INR-verdien sunket for alle prøvene med relativt liten spredning av resultater (blå loddrette punkter). Deretter stiger verdiene sakte frem til 48 timer er gått. Prøvene som er oppbevart kjølig stiger umiddelbart fra utgangsverdien (100% ved $t=0$), og det sees noe større spredning av prøvesvarene omkring gjennomsnittet enn for prøvene oppbevart i RT.

Som vi ser i figur 11, med verdier for prøver oppbevart i romtemperatur, er samtlige PT-INR verdier innenfor tillatt bias ved gitte tidsintervall fra 0 til 48 timer. Da 90% KI for hvert enkelt tidsintervall på prøvene er innenfor gitt %bias er også dette kriteriet oppfylt. Alle enkeltverdier

er også innenfor tillatt totalfeil, noe som vil si at alle holdbarhetskriteriene er oppfylt og det er bekreftet at PT-INR prøvene kan oppbevares i opp til 48 timer i romtemperatur.

I figur 12, med verdier for prøvene oppbevart i kjølig temperatur, kan vi se at noen enkeltverdier er utenfor gitt %bias, men da 90%konfidensinterval samt gjennomsnittsverdien for hvert enkelt tidsrom er innenfor tillatt %bias er fortsatt holdbarhetskriteriet oppfylt. Når ingen av enkeltverdiene er utenfor tillatt totalfeil kan man dermed anse holdbarhetskriteriene som oppfylt og at PT-INR prøvene kan oppbevares i opptil 48 timer i kjøleskapstemperatur (5°C).



Figur 13: Gjennomsnittlig forskjell i INR-verdi mellom romtemperert og kjølig oppbevart prøve (for alle tidsintervaller), samt standardfeil av gjennomsnittet (SEM) for alle prøver

Det ble også beregnet gjennomsnittlig differanse i INR-verdi mellom prøvene lagret i romtemperatur og tilhørende prøver lagret kjølig. De er satt opp skjematisk sammen med tilhørende SEM-verdier i figur 13. Det er her tydelig at verdiene har stor variasjon i forhold til hverandre. Selv om begge lagringsmetodene oppfylder holdbarhetskriteriene vil gitte INR-verdier variere kraftig ut ifra om de er lagret romtemperert eller kjølig. Dette er noe en burde vurdere å

ta hensyn til ved prøver utsatt for kalde temperaturer (under 6°C) ved beregning av dosering av Marevan.

Tabell 3: p-verdier mellom ulike oppbevaringstemperaturer og tidsintervaller

	p-verdi (tosidig)			
	7 timer	17 timer	24 timer	48 timer
Forskjell mellom temperaturene per tidsrom	$1,54 \cdot 10^{-10}\%$	$6,71 \cdot 10^{-11}\%$	$1,73 \cdot 10^{-6}\%$	$2,79 \cdot 10^{-5}\%$
Total p-verdi: forskjell mellom temperaturene	$6,92 \cdot 10^{-28}\%$			

(vedlegg 7)

Det ble gjennomført en tosidig t-test for å sammenligne INR-verdier målt etter å ha blitt utsatt for ulike oppbevaringstemperaturer i alle gitte tidsintervaller. I tabell 3 vises de beregnede p-verdiene for forskjell mellom oppbevaringstemperaturene per tidsrom og totalt sett. Nullhypotesen for samtlige t-tester kan forkastes, da $p < 5\%$, og det er dermed en signifikant forskjell mellom prøver oppbevart i RT og kjølig.

4.0 Diskusjon

Alle prøver som ble benyttet fra hver enkelt pasient ble tatt i en og samme prøvetaking, slik at det ble sikret like preanalytiske forhold for alle tre citrat-rørene som ble benyttet per prøvenummer. Det vil si at bruk av staseslange under prøvetaking og medikamenter og kosthold, samt blanding av citrat-glass etter prøvetaking ikke skal kunne påvirke analyserekken for hver enkelt pasient. Eventuelle avvik fra prosedyre vil dermed spille likt inn på alle glassene tatt fra samme pasient.

Ideelt skulle hver enkelt prøve som ble samlet inn blitt fordelt i mindre plastrør, og primærprøve oppbevart i romtemperatur skulle blitt sentrifugert og analysert umiddelbart etter prøvetaking.

Det var ikke mulig å gjennomføre grunnet smittevernstiltak påført etter utbruddet av COVID-19 pandemien. Av samme årsak ble det også redusert bemanning på laboratoriet, slik at hvis alle prøvene i praksis skulle blitt analysert ved varierende tidspunkt ville det blitt utfordrende å holde oversikt over alle prøvene.

Det ble også innført streng adgangskontroll til lokalene hvor prosjektet ble utført og det var dermed ønskelig at en ikke gikk inn og ut av lokalet oftere enn nødvendig, slik at tidene for analysering etter primærprøve klokken 14.00 ble noe endret. I utgangspunktet var det ønskelig å analysere prøvene 0, 8, 16, 24 og 48 timer etter prøvetaking. For å unngå unødig belastning av personalet dersom prøvene hadde måttet bli analysert på kvelds- eller nattevakt, samt at det skulle være overkommelige tidspunkt for analyse for den som skulle gjennomføre de, ble tidspunktene for analysering endret til 0, 7, 17, 24 og 48 timer.

Forskjellig fra den opprinnelige planen var også oppbevaringstid på arbeidsbenk før analyse av primærprøven. Dersom prøvene som ble analysert ble tatt tidligst 07.30 (tid for “morgenrunde”, standard tidspunkt for rekvirering av prøver før legevisitt), ville de stått lagret i seks og en halv time i romtemperatur på arbeidsbenk før analyse. Opprinnelig skulle prøvene bli analysert med jevne intervaller etter hvert som de kom inn til laben, slik at tiden på benk skulle forkortes betraktelig. Som forklart over ble dette ikke overkommelig på grunn av tiltak knyttet til utbruddet av Covid-19.

Lengre oppbevaringstid på arbeidsbenk kan ha påvirket analyseresultatet til primærprøven (RT ved $t=0$) grunnet forbruk av koagulasjonsfaktorer i prøvematerialet under oppbevaring. Koagulasjonsfaktor VII har kort halveringstid, og er også den faktoren som analysemetoden er mest følsom for. Det er dermed en reell mulighet for at oppbevaring på arbeidsbenk i seks og en halv time vil kunne påvirke analyseresultatet, og dermed ikke gi et like representativt bilde på problemstillingen som ønskelig. Etter så lang ventetid kan mengden faktor VII ha blitt redusert i så stor grad i forhold til utgangsverdien, at det kan gi en signifikant endring av PT-INR verdien (4). Likevel er det en realitet at prøverørene gjerne blir stående over så lang tid når de blir sendt fra primærhelsetjenesten til spesialhelsetjenesten. En kan dermed ikke ta hensyn til reduksjon av faktor VII, da alle de sendte prøvene vil ha oversteget den gitte halveringstiden uansett. Det er

viktig å påpeke at det er påvist økt aktivering av faktor VII ved oppbevaring mellom 6°C og 1°C. I utgangspunktet vil man forvente at dette, sammen med den korte halveringstiden for faktor VII samt analysens følsomhet for nettopp denne faktoren, skal føre til at prøvene ikke er holdbare i kjølig temperatur. Til tross for at holdbarhetskriteriene for de kjølige oppbevarte prøvene er oppfylt, er dette noe som en burde ha i bakhodet ved valg av oppbevaringstemperatur.

Protrombin, faktor II er en varmestabil faktor som har en halveringstid på omtrent 60 timer, og ville ikke blitt påvirket av oppbevaring på arbeidsbenk før analyse. Halveringstiden er omtrent 24 timer, så oppbevaring på arbeidsbenk i romtemperatur før analyse av primærprøven har liten eller ingen betydning. Faktor X kan lagres i opptil to måneder ved 4°C, og har en halveringstid på omtrent førti timer. Den kan derimot aktiveres via både den indre og ytre koagulasjonsveien, slik at det er usikkert hvor påvirket faktoren kan bli av eventuell aktivering av andre faktorer når prøveglasset lagres på benk før analyse av primærprøven. (12)

Statistikken i Batch vs. A-metoden viser at med de gitte holdbarhetskrav for prøvematerialet er godkjent for prøver oppbevart i RT og kjølig. Dette til tross for at det er påvist signifikant forskjell i analyseresultatene for de to ulike oppbevaringstemperaturene. Dette ble satt lys på ved beregning av SEM-verdi mellom de respektive oppbevaringsforholdene og utførelse av paret T-test for ulike oppbevaringsvillkår og tid. Selv om det er påvist en signifikant forskjell mellom analyseverdiene gitt etter ulike oppbevaringstemperaturer er oppfyller begge temperaturforholdene holdbarhetskriteriene. Analyseresultatene skal dermed kunne ansees som reliable og valide, uavhengig om de er oppbevart romtemperert eller kjølig i forkant av sentrifugering og analysering.

For å ha en mer styrket studie kunne en hatt større antall prøver (>40), og hatt flere prøver med PT-INR verdier over det terapeutiske området (>3,5 INR). Likevel oppfyller antallet prøver som er tatt med i studien minimumskravet for antall prøver som skal benyttes i en holdbarhetsstudie (11).

Konklusjon

Holdbarhetskriteriene er oppfylt for prøver oppbevart i romtemperatur og for prøver oppbevart kjølig, noe som tilsier at oppbevaringstemperatur ved 25°C og 5°C i opp til 48 timer ikke gir signifikant endring i PT-INR-verdier i forhold til initialverdien. Primærhelsetjenesten kan dermed fortsette å sende PT-INR prøver i posten, uavhengig av oppbevaringstemperatur og fortsatt kunne stole på at resultatene er reliable og valide. Det anbefales likevel å oppbevare prøvene i romtemperatur for å hindre degradering av koagulasjonsfaktorer, spesielt da faktor VII.

Referanser

1. Elaine M. Keohane, Larry J. Smith, Walenga Jeanine M. Rodak's hematology: clinical principles and applications. 5th. ed. St. Louis: Saunders; 2016. xiv+898.
2. Sandset PM, Reikvam Å, Den Norske legeforening. Warfarinbehandling i praksis: tryggere antikoagulasjon. 2. utg. Oslo: Den norske legeforening; 2010. 72 s. (Skriftserie for leger: Utdanning og kvalitetsutvikling).
3. Marevan «Takeda» - Felleskatalogen [Internett]. [sitert 15. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/marevan-takeda-561230>
4. Brosstad F, Ly B, Sandset PM. Hemostase: blødning, trombose, emboli [Internett]. Revidert utgave. Oslo: Nycomed Pharma; 1995. 107 s. Tilgjengelig på: https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2013081208205
5. Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. The Lancet. 26. mars 2005;365(9465):1163–74.
6. Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, mfl. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012)The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). Eur Heart J. 1. oktober 2012;33(19):2451–96.
7. Norgeshelsa [Internett]. [sitert 16. april 2020]. Tilgjengelig på: <http://www.norgeshelsa.no/norgeshelsa/>
8. Urdal P, Brun A, Åsberg A, Stakkestad JA, Norsk forening for medisinsk biokjemi. Brukerhåndbok i medisinsk biokjemi. 4. utg. Haugesund: Akademisk fagforl; 2009. 635 s.
9. Holdbarhet og oppbevaring av blodprøver til PT-INR | Bioingeniøren [Internett]. [sitert 29. april 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.bioingenioren.no/fag/fag-i-praksis/eldre-artikler/fag-holdbarhet-og-oppbevaring-av-blodprover-til-pt-inr/>
10. Holdbarhetsdatabase [Internett]. [sitert 14. mai 2020]. Tilgjengelig på: <https://www.noklus.no/helsepersonell-sykehus-og-private-laboratorier/holdbarhetsdatabase/>
11. 22_holdbarhet-protokoll_hvordan-utføre-holdbarhetsforsøk.pdf [Internett]. [sitert 11. mai 2020]. Tilgjengelig på: https://www.noklus.no/media/3wsfzsfz/22_holdbarhet-protokoll_hvordan-utf%C3%B8re-holdbarhetsfors%C3%B8k.pdf
12. Barbara A. Brown. Hematology: principles and procedures. 6th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. xvii+453.

Vedlegg

Temperatur-logg(1)

Prosedyre: STA-R Evolutuion, PT-INR i plasma (EQS-ID 5669)(2)

Informasjonsskriv til pasienter(3)

Analyseresultater (legges inn når det er utfylt)(4)

Regneark, ExCel med sammenligning av Marevan og DOAK(5)

Regneark, ExCel med beregning av prosentvis forskjell mellom temperaturer og SEM(6)

Regneark, ExCel med beregning av ulike p-verdier(7)

